



ORIGINAL

## Contaje absoluto de linfocitos como factor pronóstico en la leucemia aguda linfoblástica del niño

A. Anoceto Martínez\*, A. González Otero, E. Guerchicoff de Svarch, A. Arencibia Nuñez, J.C. Jaime, E. Dorticos, S. Sarduy y L. González

Instituto de Hematología e Inmunología, Reparto Alta Habana, Municipio Boyeros, Provincia La Habana, Cuba

Recibido el 27 de septiembre de 2010; aceptado el 1 de julio de 2011

Disponible en Internet el 8 de setiembre de 2011

### PALABRAS CLAVE

Contaje absoluto de linfocitos, Factores pronósticos, Leucemia aguda linfoblástica

### Resumen

**Introducción:** Estudios recientes sugieren el contaje absoluto de linfocitos (CAL) como un nuevo indicador pronóstico en enfermedades malignas, de forma que aquellos pacientes que posean CAL superiores en determinados momentos del tratamiento, tendrán mayores posibilidades de supervivencia. En particular se ha visto la influencia de las células T y las células naturales asesinas en la inmunidad de pacientes con cáncer.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio retrospectivo en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica tratados en el Instituto de Hematología e Inmunología entre los años 1995 y 2008 (105 pacientes), con el objetivo de evaluar la influencia del conteo absoluto de linfocitos como factor pronóstico en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG) a los 5 años.

**Resultados:** Evolucionaron desfavorablemente 24,8% y la mediana del CAL determinado los días 15 y 28 de tratamiento de estos pacientes fue de 1.000 células/ $\mu$ l. Los pacientes con CAL el día 15 (CAL-15) y 28 (CAL-28)  $<1.000$  y  $\geq 1.000/\mu$ l, mostraron una SLE de 51% vs 83% y 55% vs 82% ( $p=0,02$  y  $p=0,04$ ), respectivamente. Igualmente la SG para aquellos con CAL-15 y CAL-28  $\geq 1.000/\mu$ l fue 89% y 86% contra un 59% y 66% para valores  $<1.000$  ( $p=0,001$  y  $p=0,01$ ), respectivamente.

Al realizar el análisis multivariado junto a otros factores de riesgo como la edad, el estudio molecular, la respuesta al tratamiento y el contaje inicial de leucocitos, el CAL-15 mostró significación estadística tanto para la SLE ( $p=0,006$ ) como para la SG ( $p=0,001$ ).

**Conclusiones:** El CAL fue un predictor significativo de supervivencia y recaída. Además tuvo un comportamiento independiente como factor pronóstico.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [lgpinedo@infomed.sld.cu](mailto:lgpinedo@infomed.sld.cu) (A. Anoceto Martínez).

**KEYWORDS**

Absolute lymphocyte count;  
Prognostic factor;  
Acute lymphoblastic leukemia

## Absolute lymphocyte count as a prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia

**Abstract**

**Introduction:** Recent studies have suggested that the absolute lymphocyte count (ALC) may be a prognostic indicator in malignant diseases, in that those patients who have higher ALC at certain times during treatment may have a better chance of survival. The influence of T cells and natural killer cells in the immune system of the patient with cancer as a response to cancer cells is particularly noted.

**Materials and Method:** We prospectively assessed the prognostic value of absolute lymphocytic count (ALC) in 105 pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL), treated in the Cuban Immunology and Hematology Institute from 1995 to 2008. ALC was studied at days 15 (ALC-15) and 28 (ALC-28) of treatment.

**Results:** In our patients, 1000 cells/uL was the median ALC value for patients who relapsed or died. Using 1000/uL we found that ALL patients with an ALC-15 <1000 cells/ $\mu$ l had a 5-year relapse free survival (RFS) of 51%. In contrast, an ALC-15 >1000 cells/uL showed an excellent prognosis, with a 5-year RFS of 83% (p=0.02). Similarly in our study, an ALC-28 <1000 cells/ $\mu$ l predicted a 5-year overall survival (OS) of 66%, whereas an ALC-28 >1000 cells/ $\mu$ l predicted excellent outcome, with a 5-year OS of 86% (p=0.01). Importantly, ALC is also a strong predictor in multivariate analysis with known prognostic factors.

ALC is a simple, statistically powerful measurement for patients with de novo ALL.

**Conclusions:** The results, when combined with previous studies, demonstrate that ALC is a powerful new prognostic factor for a range of malignancies.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

Las leucemias agudas constituyen la enfermedad maligna más común en pediatría con una frecuencia de 30% en pacientes menores de 15 años. La leucemia linfocítica aguda (LLA) es 4 veces más frecuente que la de origen mieloide y representa tres cuartas partes del total<sup>1</sup>.

A pesar de los avances terapéuticos, las leucemias aun constituyen la causa principal de muerte por enfermedades malignas. Cerca de 25% de los pacientes con LLA presentan una recaída y cuando esta ocurre en un momento precoz y con infiltración medular, la supervivencia es menor de 10%<sup>2</sup>.

Los regímenes de tratamiento en la LLA se basan en indicadores pronósticos específicos que permiten estratificar los pacientes en diferentes grupos de riesgo. Estos indicadores al inicio de la enfermedad lo conforman la edad del paciente, el conteo de leucocitos, el inmunofenotipo y las alteraciones citogenéticas como las translocaciones t(9;22) y t(4;11), hipodiploidías entre otras. Otros factores que pueden modificar los grupos de riesgo se incluyen en la respuesta al tratamiento. Entre estos tenemos la respuesta al esteroide el día 8 de tratamiento y el aspirado medular del día 15 y 33 de la inducción<sup>3-5</sup>.

Estudios recientes sugieren el conteo absoluto de linfocitos (CAL) como un nuevo indicador pronóstico en enfermedades malignas, de forma que aquellos pacientes que posean CAL superiores en determinados momentos del tratamiento, tendrán una mejor respuesta y supervivencia<sup>2,6-9</sup>. Esto se hace extensivo a pacientes trasplantados de forma autóloga por varias enfermedades malignas<sup>10-14</sup>. En particular se ha demostrado el papel de linfocitos T y de las células naturales asesinas (NA) autólogas en la supervivencia global y libre de enfermedad de

pacientes con LMA, donde aquellos que poseían una actividad de las células NA elevada postratamiento, las posibilidades de recaer o fallecer eran menores<sup>15</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos evaluar la influencia del CAL como factor pronóstico, así como su independencia en el análisis multivariado, de pacientes tratados por LLA entre los años 1995 y 2008, en el servicio de clínica pediátrica del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI).

**Material y métodos****Pacientes**

Se analizaron los pacientes diagnosticados con LLA entre los años 1995 y 2008 tratados en el servicio de clínica pediátrica del IHI. El universo lo conformaron 123 pacientes de los cuales 18 fueron excluidos del estudio por omisión de datos en las historias clínicas, inicio del tratamiento fuera de la institución y pérdida del seguimiento.

**Factores pronósticos**

Las variables consideradas de buen pronóstico fueron la edad entre 1 y 10 años, el conteo inicial de leucocitos menor de  $20 \times 10^9/L$ , el inmunofenotipo B, el estudio molecular favorable (ausencia de t(9;22), t(4;11) o hipodiploidía) y la buena respuesta al tratamiento de inducción (conteo absoluto de blastos en sangre periférica el día 8 de tratamiento menor de 1.000 células/ $\mu$ l y tener un aspirado medular el día 15 con menos de 25% de blastos y el día 33 con menos de 5% de blastos).

**Tabla 1** Características y distribución de los factores pronósticos en la muestra

Características	Mediana (rango)
Edad al diagnóstico	5 (1-17)
Contaje inicial de leucocitos ( $\times 10^9/L$ )	9 (9-350)
Sobrevida global: 5 años (IC: 95%)	85% (79-91%)
Sobrevida libre de enfermedad: 5 años (IC 95%)	84% (78-90%)
<b>Factores pronósticos</b>	
<b>N (%)</b>	
<b>EDAD (años)</b>	
< de 1 y > de 10	21 (20)
Entre 1 y 10 años	84 (80)
<b>CONTAJE DE LEUCOCITOS</b>	
< $20 \times 10^3/L$	77 (73)
> $20 \times 10^3/L$	28 (27)
<b>ESTUDIO MOLECULAR Y CITOGENÉTICO</b>	
Favorable: t(12;21), Hiperdiploidía	30 (29)
Desfavorable: t(9;22) o t(4;11) o Hipodiploidías	2 (2)
<b>INMUNOFENOTIPO</b>	
Favorable: Precursor B	50 (75)
Desfavorable: Precursor T	17 (25)
<b>CLASIFICACIÓN FAB</b>	
L-1	100 (95)
L-2	3 (2,9)
L-3	2 (2,1)
<b>RESPUESTA AL TRATAMIENTO</b>	
Buena	99 (94)
Mala	6 (6)

Además se determinó el valor del CAL los días 15 y 28 de la inducción; la mediana del CAL de los pacientes que fallecieron y/o recayeron fue el valor utilizado para evaluar la implicación pronóstica, este procedimiento fue similar al desarrollado por otros investigadores acerca del tema<sup>2</sup>.

## Análisis y estadística

Los datos obtenidos fueron almacenados en una base de datos con soporte en el programa Excel y el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS, versión 11,5.

Las curvas de SG y SLE se realizaron por el método de Kaplan y Meier<sup>16</sup>. La significación estadística de la diferencia entre las curvas se analizó con la prueba de Log Rank. El análisis univariado y multivariado se realizó a través de la regresión de Cox<sup>17</sup>. El nivel de confianza se estableció en 95% para una significación estadística de <0,05.

## Resultados

La **tabla 1** muestra las principales características de los pacientes estudiados, incluyendo la distribución de los factores pronósticos. La mediana de la edad fue 5 años y la SLE y SG a los 5 años resultó 84 y 85%, respectivamente. El 80% de los pacientes debutó con edades entre 1 y 10 años y solo 27% presentó conteo de leucocitos superior a  $20 \times 10^9/L$ . En relación a las características de las células tumorales, el

**Tabla 2** Mediana del CAL según la evolución del paciente

Evolución	Mediana del CAL-15	Mediana del CAL-28	Mediana general
Desfavorable	954	1.150	1.000
Favorable	2.218,5	1.722	1.970

CAL-15: conteo absoluto de linfocitos el día 15 de tratamiento; CAL-28: conteo absoluto de linfocitos el día 28 de tratamiento.

origen de precursores B superó al T (75% vs 25%, respectivamente), solo 2 pacientes portaron alteraciones moleculares de mal pronóstico y morfológicamente en 95% de los pacientes, los blastos fueron L-1. La respuesta al tratamiento fue buena en 99% de los casos.

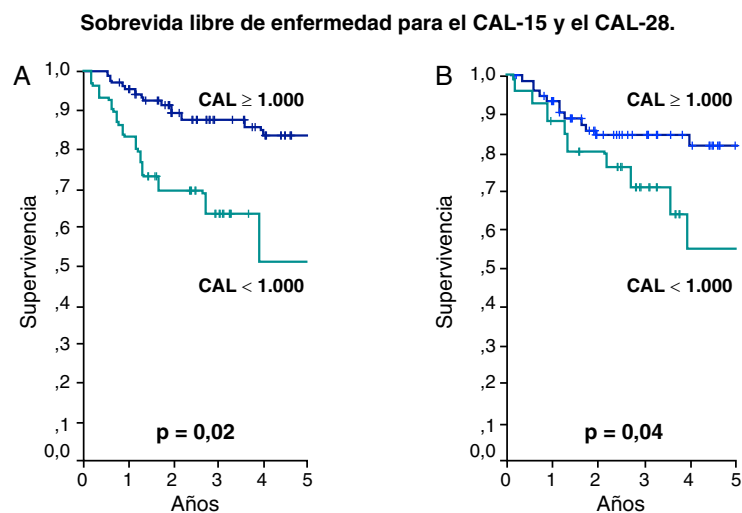
La evolución de los pacientes que recayeron o fallecieron fue considerada como desfavorable y la mediana del CAL de este grupo fue 1.000/uL como se observa en la **tabla 2**. Este valor fue utilizado para determinar la SLE y SG a los 5 años según CAL-15 y CAL-28 menor de 1.000 células/uL contra valores mayores o iguales a esta cifra. De esta forma la SLE para el CAL-15 fue 51% vs 83%, respectivamente ( $p=0,02$ ) y para el CAL-28 fue 55% vs 82%, respectivamente ( $p=0,04$ ) (**fig. 1**). La SG tuvo un comportamiento similar con 59% vs 89% para el CAL-15 ( $p=0,001$ ) y 66% vs 86% para el CAL-28 ( $p=0,01$ ) según conteos <1.000 células/ $\mu L$  y  $\geq$  a 1.000 células/ $\mu L$ , respectivamente (**fig. 2**).

Los análisis univariado y multivariado se exponen en las **tablas 3 y 4**. Variables como el conteo de leucocitos, la respuesta al tratamiento, el estudio molecular, el CAL-15 y el CAL-28 definieron el pronóstico en la SG al realizarse el análisis univariado, sin embargo, solo el estudio molecular y el CAL-15 resultaron significativos para el análisis multivariado ( $p=0,000$  y  $0,001$ , respectivamente) confirniéndoles actividad independiente como factor pronóstico. Estos propios indicadores (CAL-15 y el estudio molecular) tuvieron significación estadística en el estudio multivariable para la SLE.

## Discusión

Estudios recientes han planteado la implicación pronóstica del conteo absoluto de linfocitos en la supervivencia de pacientes con cáncer, de forma tal que aquellos que posean valores elevados en determinados momentos del tratamiento, tienen menores posibilidades de recaer o fallecer<sup>2,6-9,18,19</sup>.

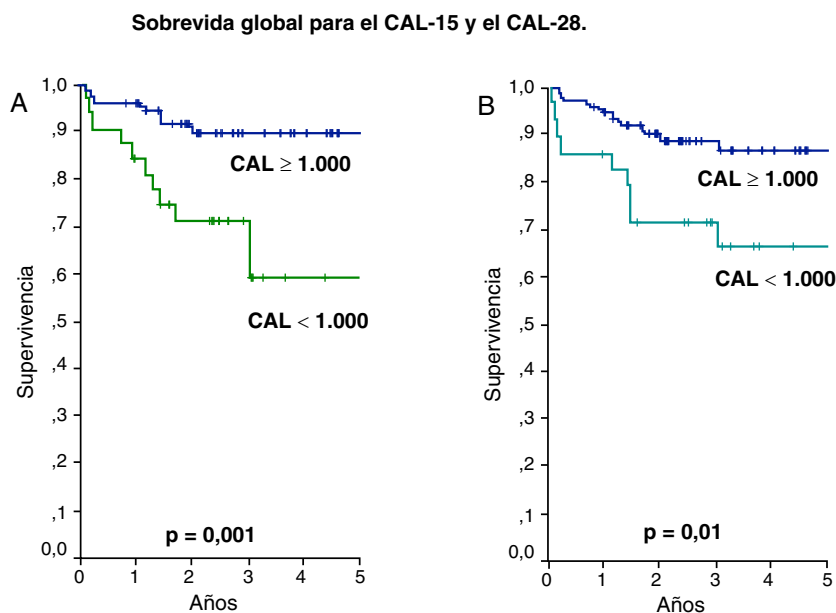
La explicación de tales supuestos se ha atribuido a la participación de los linfocitos autólogos como primera línea de la respuesta inmune contra las células leucémicas. Específicamente se ha probado la actividad antileucémica de las células NA, que además son capaces de madurar sin la presencia del timo y por esto es posible que su recuperación sea más rápida<sup>2,20-23</sup>. Al respecto Lowdell et al han demostrado la importancia de la actividad de las células NA, en promover la remisión prolongada de pacientes con LMA. Igualmente Ohnishi al analizar subpoblaciones de linfocitos en 30 pacientes con LMA, comprobó el papel de las células T citotóxicas y las células NA en la inmunovigilancia de estos enfermos, posterior a la administración de la quimioterapia<sup>24,25</sup>.



**Figura 1** Método de Kaplan Meier para la sobrevida libre de enfermedad (SLE). Pacientes con CAL en los días 15 y 28 menores de 1.000 células/uL contra pacientes con CAL mayor o igual de 1.000 células/uL. (A) Para el CAL-15 la SLE fue de 51 vs 83%, respectivamente ( $p=0,002$ ). (B) Para el CAL-28 la SLE fue de 55 vs 82%, respectivamente ( $p=0,04$ ).

Nuestra investigación demostró que los pacientes pediátricos tratados por LLA, con CAL menor de 1.000 células/uL durante la inducción, tenían un pronóstico de supervivencia pobre. Específicamente la SLE fue significativamente menor en los pacientes con CAL menor de 1.000 células/uL, tanto el día 15 como el 28 de tratamiento (fig. 1, A y B). De forma similar se comportó la SG, con diferencias significativas en la supervivencia para el CAL-15 y 28 (fig. 2, A y B). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Angulo del Centro del Cáncer M D Anderson y Porrata de la Clínica Mayo<sup>2,6,10-13</sup>.

El comportamiento univariado tanto del CAL-15 como el del día 28 (tabla 3) resultó significativo en la SG junto a otros determinantes de riesgo como el estudio molecular, la respuesta al tratamiento y el conteo inicial de leucocitos; sin embargo, al evaluar la implicación pronóstica de forma independiente en el análisis multivariado (tabla 4), solo el CAL-15 y el estudio molecular resultaron significativos para la SG ( $p=0,001$  y  $p<0,0001$ , respectivamente) y la SLE ( $p=0,006$  y  $p<0,0001$ ). De esta forma el CAL-15 se comportó como un predictor independiente de supervivencia y recaída en los pacientes estudiados. Esta conclusión



**Figura 2** Método de Kaplan Meier para la sobrevida global (SG). Pacientes con CAL en los días 15 y 28 menores de 1.000 células/ $\mu$ L contra pacientes con CAL mayor o igual de 1.000 células/ $\mu$ L. (A) Para el CAL-15 la SG fue de 59 vs 89%, respectivamente ( $p=0,001$ ). (B) Para el CAL-28 la SG fue de 66 vs 86%, respectivamente ( $p=0,01$ ).

**Tabla 3** Análisis univariado para la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global

Variables Pronósticas	Sobrevida libre de enfermedad			Sobrevida global		
	p	Wald	IC 95%	p	Wald	IC 95%
Edad	0,267	1,230	0,227–1,509	0,125	2,35	0,174–1,238
Conteo de leucocitos	0,824	0,049	0,327–2,438	0,008*	6,97	0,113–0,725
Respuesta al tratamiento	0,257	0,285	0,100–1,850	0,032*	4,617	0,074–0,887
Estudio molecular	0,000*	16,95	0,036–0,308	0,000*	21,03	0,032–0,252
CAL al día 15	0,005*	7,950	1,466–8,402	0,003*	8,890	1,642–11,00
CAL al día 28	0,049*	3,743	0,989–5,618	0,022*	5,278	1,172–1,172
Inmunofenotipo	0,127	2,328	0,638–36,91	0,878	0,024	0,304–4,023

CAL-15: conteaje absoluto de linfocitos el día 15 de tratamiento; CAL-28: conteaje absoluto de linfocitos el día 28 de tratamiento;  $p^* = p < 0,05$ .

**Tabla 4** Análisis multivariante para la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global

Variables Pronósticas	Sobrevida libre de enfermedad			Sobrevida global		
	p	Wald	IC 95%	p	Wald	IC 95%
Conteo de leucocitos	N.I	N.I	N.I	0,875	0,025	0,135–1,286
Respuesta al tratamiento	N.I	N.I	N.I	0,989	0,000	0,183–5,325
Estudio molecular	0,000*	19,153	0,027–0,251	0,000*	14,362	0,021–0,292
CAL al día 15	0,006*	7,552	1,437–8,728	0,001*	10,609	1,947–14,58
CAL al día 28	0,204	1,613	0,730–4,361	0,300	1,073	0,617–0,786

CAL: conteaje absoluto de linfocitos; CAL-15: conteaje absoluto de linfocitos el día 15 de tratamiento; CAL-28: conteaje absoluto de linfocitos el día 28 de tratamiento; N.I: no incluidas;  $p^* = p < 0,05$ .

es similar a la de investigaciones desarrolladas en la última década<sup>2,6</sup> y por ende queda demostrado el papel del conteo absoluto de linfocitos en predecir una mejor o peor evolución en pacientes con LLA y así, un método sencillo y poco invasivo puede contribuir al mejor manejo de las enfermedades malignas, en particular la leucemia aguda linfoblástica del niño.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk factors for acute leukemia: A review. *Environ Health Perspectives*. 2007;115:138–45.
2. Guillermo AD, Carrie Y, Shana LP, Peter MA, Patrick AZ-M. Absolute Lymphocyte Count is a Novel Prognostic Indicator in ALL and AML. *Cancer*. 2008;112:407–15.
3. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med*. 1998;338:1663–71.
4. Smith MAD, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996;14:4–6.
5. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354:166–78.
6. Behl D, Porrata LF, Markovic SN, Letendre L, Pruthi RK, Hook CC, et al. Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2006;20:29–34.
7. Behl D, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts therapeutic efficacy of rituximab therapy in follicular lymphomas. *Br J Haematol*. 2007;137:409–15.
8. Kim DH, Baek JH, Chae YS, Kim YK, Kim HJ, Park YH, et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21:2227–30.
9. Cox MC, Nofroni I, Ruco L, Amodeo R, Ferrari A, La Verde G, et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2008 September;49:1745–51.
10. Porrata LF, Litzow MR, Tefferi A, Letendre L, Kumar S, Geyer SM, et al. Early lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2002;16:1311–2138.
11. Porrata LF, Inwards DJ, Micallef IN. Early lymphocyte recovery post-autologous haematopoietic stem cell transplantation is associated with better survival in Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. 2002;117:629–33.
12. Porrata LF, Ingle JN, Litzow MR. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:865–71.
13. Porrata LF, Gertz MA, Inwards DJ, Litzow MR, Lacy MQ, Tefferi A, et al. Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2001;98:579–85.
14. Joao C, Porrata LF, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, et al. Early lymphocyte recovery after autologous stem cell transplantation predicts superior survival in mantle-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*. 2006;37:865–71.

15. Lowdell MW, Lamb L, Hoyle C. Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control and treatment of leukaemias. *Br J Haematol.* 2001;114:11–24.
16. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457–81.
17. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc (B).* 1972;34:187–202.
18. De Angulo G, Hernandez M, Morales-Arias J, Herzog CE, Anderson P, Wolff J, et al. Early lymphocyte recovery as a prognostic indicator for high-risk Ewing's sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29:48–52.
19. Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, Witzig TE, Habermann TM, Colgan JP, et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br J Haematol.* 2006;134:596–601.
20. Lotzova E. Definition and functions of natural killer cells. *Nat Immun.* 1993;12:169–76.
21. Pross HF, Lotzova E. Role of natural killer cells in cancer. *Nat Immun.* 1993;12:279–92.
22. Lotzova E, Savary CA. Human natural killer cell development from bone marrow progenitors: analysis of phenotype, cytotoxicity and growth. *Nat Immun.* 1993;12:209–17.
23. Lotzova E, Savary CA, Champlin RE. Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33<sup>-</sup> bone marrow progenitors. *J Immunol.* 1993;150:5263–9.
24. Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol.* 2002;117:821–7.
25. Ohnishi K, Yamanishi H, Naito K, Utsumi M, Yokomaku S, Hirabayashi N, et al. Reconstitution of peripheral blood lymphocyte subsets in the long-term disease-free survivors of patients with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia.* 1998;12:52–8.