



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y CITOGÉNICA  
DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE  
LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**VIRIDIANA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2013**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

**VOCAL:** NANCY MONROY JARAMILLO

**SECRETARIO:** ROSA MARÍA ARANA TREJO

**1er. SUPLENTE:** MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO

**2° SUPLENTE:** ARACELI MENDIETA RERGIS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ONCOHEMATOLOGÍA, S.C.

**ASESOR DEL TEMA:** QFB. ROSA MARÍA ARANA TREJO

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** VIRIDIANA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. RESUMEN</b> .....	12
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	14
1. Antecedentes históricos .....	14
2. Generalidades de las leucemias .....	15
3. Leucemia Mieloide Aguda .....	16
3.1. Epidemiología de la LMA .....	17
3.2. Patogenia.....	18
3.3. Factores de riesgo .....	19
3.4. Características clínicas .....	21
3.5. Clasificación Franco-Americano-Británica .....	22
3.6. Clasificación de la LMA según la Organización Mundial de la Salud.....	23
3.7. LMA en niños y adultos mayores.....	25
4. Morfología y genética de la LMA.....	26
4.1. Diagnóstico .....	28
4.2. Morfología y citoquímica .....	29
4.3. Inmunofenotipo .....	37
4.4. Alteraciones citogenéticas .....	39
4.5. Alteraciones moleculares.....	53
5. Tratamiento.....	56
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	59
1. Generales .....	59
2. Particulares .....	59
<b>IV. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	60
1. Pacientes .....	61

2. Muestras .....	61
3. Material y métodos.....	62
3.1. Morfología: Preparación de laminillas y Tinción de Wright .....	63
3.2. Cariotipo: Cultivo y cosecha de muestras de médula ósea .....	66
3.3. Tinción de bandas G.....	68
3.4. Análisis cromosómico .....	68
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
<b>VI. DISCUSIÓN .....</b>	<b>93</b>
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>98</b>
<b>VIII. APÉNDICE .....</b>	<b>100</b>
<b>IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>103</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Factores de riesgo asociados con la LMA .....	19
<b>Tabla 2.</b> Clasificación FAB de la LMA .....	22
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de la LMA según la OMS .....	23
<b>Tabla 4.</b> Características citoquímicas de los subtipos FAB de la LMA .....	37
<b>Tabla 5.</b> Marcadores inmunofenotípicos útiles en la clasificación de la LMA.....	38
<b>Tabla 6.</b> Pronóstico de LMA relacionado con la citogenética.....	53
<b>Tabla 7.</b> Sensibilidad al ATRA de los rearrreglos encontrados en la LPA.....	57
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje e índice mitótico obtenido en cada procedimiento .....	72
<b>Tabla 9.</b> Resultados de cariotipo e interpretación morfológica de los frotis de médula ósea sin aditivo y médula ósea con heparina .....	74
<b>Tabla 10.</b> Número de muestras recibidas por diagnóstico de recepción.....	85
<b>Tabla 11.</b> Distribución de los 36 casos respecto a la celularidad encontrada.....	86
<b>Tabla 12.</b> Muestras para el análisis citogenético con calidad inadecuada.....	87
<b>Tabla 13.</b> Casos en los que no coincide el diagnóstico de envío con el diagnóstico encontrado en el LAOH.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frotis de médula ósea de pacientes con LMA, M0-M2.....	31
<b>Figura 2.</b> Frotis de médula ósea y sangre periférica de pacientes con LPA.....	32
<b>Figura 3.</b> Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia mielomonocítica, M4. ....	33
<b>Figura 4.</b> Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia monocítica, M5.. ....	34
<b>Figura 5.</b> Frotis de médula ósea de pacientes con eritroleucemia, M6.....	35
<b>Figura 6.</b> Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia megacarioblástica, M7. ....	36
<b>Figura 7.</b> Complejo CBF.....	41
<b>Figura 8.</b> Traslocación <i>AML1/ETO</i> .. ....	42
<b>Figura 9.</b> Rearreglo <i>CBFβ/MYH11</i> .....	44
<b>Figura 10.</b> Función del receptor <i>RARα</i> . ....	45
<b>Figura 11.</b> Traslocación <i>PML/RARα</i> . ....	46
<b>Figura 12.</b> Proteínas que se fusionan con <i>RARα</i> en la LPA. ....	47
<b>Figura 13.</b> El complejo de MLL.....	48
<b>Figura 14.</b> Traslocación <i>AF9/MLL</i> .....	49
<b>Figura 15.</b> Traslocación <i>BCR/ABL</i> .....	49
<b>Figura 16.</b> Traslocación <i>OTT/MKL1</i> .....	50
<b>Figura 17.</b> Traslocación <i>DEK/NUP214</i> . ....	50
<b>Figura 18.</b> Traslocación <i>EVI1/RPN1</i> .....	51
<b>Figura 19.</b> Deleciones y trisomía en LMA. ....	52
<b>Figura 20.</b> Estructura y localización de las mutaciones en <i>FLT3</i> .....	54
<b>Figura 21.</b> Elaboración de un frotis de médula ósea .....	64
<b>Figura 22.</b> Procesamiento de la muestra de médula ósea para obtener el cariotipo.....	69
<b>Figura 23.</b> Índice mitótico, objetivo 10x.. ....	71
<b>Figura 24.</b> Cariotipo del caso 1.....	79
<b>Figura 25.</b> Cariotipo del caso 2.....	80

<b>Figura 26.</b> Cariotipo y metafase del caso 16..	81
<b>Figura 27.</b> Cariotipo del caso 18.....	82
<b>Figura 28.</b> Cariotipo del caso 25.....	83
<b>Figura 29.</b> Cariotipo del caso 26.....	84
<b>Figura 30.</b> Celularidad en el frotis de médula ósea con heparina, 10x.....	86
<b>Figura 31.</b> Calidad inadecuada de muestras de médula ósea con heparina.....	88
<b>Figura 32.</b> Frotis de médula ósea del caso 4.....	90
<b>Figura 33.</b> Frotis de médula ósea del caso 15.....	90
<b>Figura 34.</b> Frotis de médula ósea del caso 26.....	91
<b>Figura 35.</b> Frotis de médula ósea sin aditivo del caso 28.....	91



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Casos recibidos clasificados por grupo etario.....	70
<b>Gráfico 2.</b> Casos recibidos clasificados por género.....	70
<b>Gráfico 3.</b> Procesamientos e índice mitótico obtenidos.....	72
<b>Gráfico 4.</b> Resultados citogenéticos.....	77
<b>Gráfico 5.</b> Alteraciones cromosómicas identificadas.....	78

## ABREVIATURAS

**ANBE:**  $\alpha$ -Naftil Butirato Esterasa

**AraC:** Citarabina, Arabinósido de citosina

**ATRA:** Ácido Transretinoico

**CAE:** Cloracetato Esterasa

**CBF:** Factor de Unión Central

**CDR:** Región de Delección Crítica

**CID:** Coagulación Intravascular Diseminada

**CN-LMA:** Leucemia Mieloide Aguda con Cariotipo Normal

**CNNE:** Células Nucleadas No Eritroides

**CSF-2:** Factor Estimulador de Colonias 2

**DNMT:** DNA-Metil Transferasa

**EMR:** Enfermedad Mínima Residual

**EUA:** Estados Unidos de América

**FAB:** Grupo Franco-Americano-Británico

**FISH:** Hibridación *in situ* con Fluorescencia

**GM-CSF:** Factor Estimulante de Colonias de Granulocito-Macrófago

**HAT:** Acetil-transferasa de Histonas

**HDAC:** Desacetilasa de Histonas

**HMT:** Metil-transferasa de Histonas

**IM:** Índice Mitótico

**INC:** Instituto Nacional de Cardiología

**ISCN:** Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética

**ITD:** Duplicaciones Internas en Tándem

**JM:** Dominio Yuxtamembrana

**LA:** Leucemia Aguda

**LAOH:** Laboratorio de Análisis de Oncohematología

**LLA:** Leucemia Linfoide Aguda

**LLC:** Leucemia Linfoide Crónica

**LMA:** Leucemia Mieloide Aguda

**LMC:** Leucemia Mieloide Crónica

**LNLA:** Leucemia No Linfocítica Aguda

**LPA:** Leucemia Promielocítica Aguda

**M1 a M7:** Subtipos FAB de la Leucemia Mieloide Aguda

**MDR-1:** Proteína de Resistencia Multidrogas 1

**MPO:** Mieloperoxidasa

**N-CoR:** Receptor del Co-Represor Nuclear 1

**NK:** *Natural Killer*

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAS:** Ácido Peryódico de Schiff

**Pgp:** Glicoproteína-p

**Ph<sup>1</sup>:** Cromosoma Filadelfia

**RC:** Remisión Completa

**SD:** Síndrome de Down

**SMD:** Síndrome Mielodisplásico

**SMP:** Síndrome Mieloproliferativo

**SNB:** Sudán Negro B

**SP:** Sangre Periférica

**ST:** Síndrome Transitorio

**TK:** Receptores de tirosina cinasa

**TKD:** Dominio Tirosina Cinasa

**t-LMA:** Leucemia Mieloide Aguda secundaria a tratamiento

### Nomenclatura citogenética

<i>Alteración</i>	<i>Nombre</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Descripción</i>
Numéricas	Trisomía	+	Ganancia de un cromosoma
	Monosomía	-	Pérdida de un cromosoma
	Hipodiploidía		Número de cromosomas <46
	Hiperdiploidía		Número de cromosomas >46
	Poliploidía		Incremento del número de cromosomas característico del complemento diploide
Estructurales	Deleción	del	Pérdida de un segmento cromosómico
	Inversión	inv	Giro de 180 °C del material genético dentro del mismo cromosoma
	Isocromosoma	i	Duplicación de todo el brazo de un cromosoma con pérdida del otro brazo
	Traslocación	t	Intercambio de material cromosómico entre 2 o más cromosomas
	Derivado	der	Cromosoma resultante de una alteración estructural

## I. RESUMEN

La leucemia es una neoplasia del sistema hematopoyético caracterizada por la proliferación no regulada de las células producidas en la médula ósea. La leucemia mieloide aguda (LMA), particularmente, es una enfermedad de evolución rápida y agresiva que involucra células blásticas de linaje mieloide.

De acuerdo a la clasificación Franco-Americano-Británica (FAB), la LMA se divide en ocho subtipos (M0 a la M7) basándose en las características morfológicas y citoquímicas de las células leucémicas que se observan en un aspirado de médula ósea.

El estudio citogenético de la médula ósea es una parte fundamental de la evaluación del paciente con leucemia, ya que algunas anomalías cromosómicas se asocian con subtipos específicos, facilitan su diagnóstico y advierten acerca del pronóstico y respuesta al tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad y celularidad de las muestras de médula ósea con heparina para cariotipo de pacientes con diagnóstico de LMA *de novo* que se mandaron al LAOH (Laboratorio de análisis de oncohematología), así como la morfología de los frotis de médula ósea sin aditivo realizados por el departamento de Hematología a estos pacientes y, los datos obtenidos se correlacionaron con su respectivo resultado citogenético.

Para el estudio citogenético se recopilaron muestras de médula ósea en heparina de pacientes con sospecha o diagnóstico de LMA *de novo*, las cuales se procesaron mediante técnicas convencionales, se analizaron al microscopio y el resultado se reportó de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2009 y 2013). Para el estudio morfológico se examinaron frotis de médula ósea sin aditivo de los pacientes con LMA, además se realizaron frotis de la muestra de médula ósea en heparina que fue enviada al LAOH, se tiñeron con colorante Wright y se analizaron al microscopio.

El cariotipo fue viable en el 92% de los casos y el 45% mostró cariotipo con alteraciones. El cultivo de 72 horas presentó los porcentajes más altos de índice mitótico adecuado y regular. En las muestras anticoaguladas de médula ósea con celularidad regular se encontraron la mayoría de los casos con anomalías cromosómicas; además la viabilidad del cariotipo se vio afectada en las muestras que presentaron células degradadas y/o menos del 20% de blastos. Con un porcentaje de 33% cada una, las hipo/hiperdiploidías y la t(15;17) fueron las alteraciones más frecuentes.

Respecto a la correlación entre el diagnóstico de recepción y el encontrado en el LAOH, existió discrepancia morfológica en el 33% de los casos, principalmente entre los subtipos M2, M4 y M5.

El estudio morfológico permite identificar la enfermedad hematológica, sin embargo éste se complementa con el análisis citogenético, el cual provee información necesaria para el adecuado manejo clínico. Es importante que ambos estudios cuenten con la valoración de dos analistas para poder minimizar los errores de interpretación, así su correlación será más certera y el resultado será más confiable en beneficio de la salud del paciente.

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Antecedentes históricos

Desde su descripción inicial, el estudio de las leucemias ha generado una basta investigación debido a la importancia de sus manifestaciones clínicas, su incidencia en la niñez, en algunos casos su pobre supervivencia, la facilidad del análisis de frotis de sangre periférica y médula ósea, y su tratamiento, el cual se adaptó posteriormente a otros tipos de cáncer.

El avance que hoy se tiene en estas investigaciones no hubiera sido posible sin las aportaciones de otros científicos, quienes desde el siglo XIX comenzaron a reportar y describir los primeros casos de pacientes con leucemia. Entre ellos, Alfred Velpeau, Alfred Donné, John Bennett, y Rudolf Virchow son los cuatro citados frecuentemente como "los descubridores de la leucemia"<sup>1</sup>.

Alfred Velpeau fue un cirujano francés que en 1827 reportó el caso de un hombre que padecía de agrandamiento de bazo e hígado. Velpeau describió que *"la sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto"*<sup>1</sup>. Fue el primero en describir los signos de la leucemia en relación con el aumento en el número de leucocitos en la sangre, lo que hoy en día todavía conduce a su diagnóstico.

El bacteriólogo francés Alfred Donné fue el primero en realizar un análisis microscópico preciso y una descripción e ilustración de la alteración de la sangre en la leucemia, detallándola en su obra *"cours de microscopie"* en 1844<sup>1</sup>.

John Bennett fue un patólogo inglés que nombró a esta enfermedad como *"leucocytemia"*<sup>1</sup> en 1845 debido al aumento en el número de glóbulos blancos, como se había descrito previamente en la leucocitosis; sin embargo, él aclaró que la leucocitosis es secundaria a una infección y en la leucocitemia, la acumulación de leucocitos se debe a un desorden primario.

En 1845, Rudolf Virchow publicó su manuscrito sobre "Weisses Blut"<sup>1</sup> en el cual señaló de forma clara el balance invertido entre la cantidad de glóbulos rojos y blancos, llamó a esta enfermedad como "*leukämia*" y fue el primero en distinguir entre leucemia esplénica y linfática. Estas distinciones probablemente hacían referencia a lo que ahora se clasifica como leucemias mieloides y linfoides<sup>1</sup>.

Estudios posteriores ahondaron en las características clínicas, diagnóstico morfológico y clasificación de las leucemias, sin embargo no se conocía nada acerca de su origen patológico. Fue hasta 1960 que Peter Nowell y David Hungerford descubrieron en la médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) un marcador cromosómico que llamaron *cromosoma Philadelphia Ph*<sup>2</sup>, debido a la aparente pérdida del brazo largo del cromosoma 22. Nowell y Hungerford demostraron que este cambio genético se requería para el desarrollo de LMC, aportando un importante marcador para estudiar la patogénesis de la enfermedad así como una herramienta de diagnóstico. En 1973, Janet D. Rowley con técnicas de bandeado cromosómico identificó que la aparente pérdida del material genético del cromosoma Ph<sup>1</sup> era en realidad una traslocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22, t(9;22)(q34;q11)<sup>3</sup>.

## **2. Generalidades de las leucemias**

La leucemia es una neoplasia monoclonal del sistema hematopoyético caracterizada por la proliferación no regulada de las células progenitoras no comprometidas o parcialmente comprometidas de la médula ósea. Este grupo de enfermedades difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuesta al tratamiento<sup>4</sup>.

En 1889, Ebstein<sup>4</sup> sugirió una clasificación para las leucemias, separándolas con base en su agresividad: 1) aguda, la cual si no se trata provoca rápidamente la muerte, en semanas o meses; 2) crónica, una variante menos agresiva que si no se trata causa la muerte en meses o años.



Las leucemias agudas se caracterizan por un defecto en la maduración en donde las células de la clona leucémica proliferan rápidamente sin madurar en la médula ósea, por lo que no pueden funcionar con normalidad. La duración corta de la enfermedad desde el diagnóstico hasta la muerte es lo que la define como “aguda”<sup>4</sup>.

Las leucemias crónicas involucran células maduras en diversos estadios de diferenciación que pueden llevar a cabo algunas de sus funciones normales y su número aumenta más lentamente; su diagnóstico se establece generalmente durante un examen físico de rutina debido a molestias inespecíficas del paciente<sup>4</sup>.

El desarrollo de técnicas de tinción de células sanguíneas permitió describir y diferenciar los glóbulos blancos, y clasificar a la leucemia tomando en cuenta el tipo de linaje celular afectado. De esta manera, las leucemias agudas y crónicas se clasifican a su vez en mieloides y linfoides de acuerdo al origen de la clona leucémica. Estos dos sistemas de clasificación reconocen cuatro tipos de leucemia: leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC)<sup>4</sup>.

Existen otros dos subtipos de leucemia aguda que se presentan con menor frecuencia<sup>5</sup>: las leucemias bifenotípicas son aquéllas en las que existe una sola población blástica que coexpresa marcadores antigénicos mieloides y linfoides; y las leucemias de linaje mixto son entidades en las que las células mieloides y linfoides están presentes simultáneamente, cada una de ellas derivada de una clona separada.

### **3. Leucemia Mieloide Aguda**

La leucemia mieloide aguda, también llamada leucemia mieloblástica o leucemia no linfocítica aguda (LNLA); es una enfermedad clonal que se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación de los progenitores mieloides hematopoyéticos<sup>6</sup>. Estas células inmaduras (blastos) conservan su capacidad

proliferativa neoplásica, por lo que al acumularse en la médula ósea inhiben el desarrollo de la hematopoyesis normal, provocando la aparición de citopenias que son las responsables de los signos y síntomas característicos de la enfermedad.

### **3.1. Epidemiología de la LMA**

La LMA no ocupa los primeros lugares en morbilidad y mortalidad generales pero es de importancia clínica ya que afecta principalmente a adultos mayores y algunos subtipos presentan elevada incidencia y mortalidad en población infantil.

La LMA representa el 25% de todas las leucemias en adultos en el mundo occidental, y por lo tanto es la forma más frecuente de leucemia<sup>7</sup>. A nivel mundial, la incidencia de la LMA en adultos es más alta en los Estados Unidos de América (EUA), Australia y el oeste de Europa, siendo menor en Asia y Latinoamérica<sup>8</sup>; en la población hispana se presenta con mayor frecuencia la leucemia promielocítica aguda (LPA)<sup>9</sup>. La raza blanca presenta un riesgo 1.4 veces mayor de padecer LMA en relación con la raza negra. En EUA durante los años 2000-2003, la tasa de mortalidad para pacientes de raza blanca fue de 2.7 por cada 100 mil habitantes y de 2.2 por cada 100 mil habitantes de raza negra<sup>7</sup>.

La LMA representa el 80% de las leucemias agudas en adultos y del 15%-20% en niños; siendo en éstos últimos, la LLA la más frecuente<sup>7</sup>. La LMA es la leucemia más frecuente en neonatos pero es ante todo una enfermedad de adultos mayores, siendo la mediana de edad al diagnóstico de 65 años<sup>7-9</sup> y su incidencia aumenta con la edad.

En EUA durante los años de 2000-2003, los casos de LMA fueron infrecuentes en pacientes menores de 40 años de edad (<1 caso por cada 100 mil habitantes), hasta llegar a una incidencia de 16 casos por cada 100 mil habitantes en pacientes con 75 años de edad<sup>7</sup>.

En México, según un estudio del Instituto Nacional de Cardiología (INC), las entidades federativas con mayores tasas de mortalidad por leucemias,

corresponden a: Tabasco, Puebla, Distrito Federal, Baja California Sur, Nayarit, Yucatán, Michoacán, Tlaxcala, Jalisco y Colima<sup>8</sup>.

### 3.2. Patogenia

La leucemogénesis es un proceso de muchas etapas que implica una célula hematopoyética susceptible, factores genéticos y las influencias ambientales<sup>7</sup>. Todo lo anterior ocasiona proliferación inapropiada en ausencia de señales de crecimiento, bloqueo de la diferenciación, evasión de la apoptosis, capacidad replicativa ilimitada y alteración en el control de la progresión del ciclo celular.

Se ha propuesto que la cooperación de dos mutaciones (clase I y clase II) que se acumulan en un mismo precursor hematopoyético es necesaria para el desarrollo mieloproliferativo y el bloqueo de la diferenciación en la LMA<sup>10</sup>.

Las mutaciones de clase I dan una ventaja proliferativa y de supervivencia a los precursores mieloides, no tienen efecto sobre la diferenciación y por sí solas no causan leucemia<sup>10,11</sup>; por lo general, resultan de la activación constitutiva de receptores de tirosina cinasa (TK) que de manera normal inducen proliferación celular. Los mecanismos de activación de los TK son: translocaciones, deleciones y mutaciones activantes<sup>7,10,11</sup>.

Las mutaciones de clase II complementan a las mutaciones de clase I, afectan la diferenciación mieloide e interfieren con la apoptosis, por lo que también proveen una ventaja de supervivencia<sup>10,11</sup>. En general, los precursores hematopoyéticos adquieren traslocaciones cromosómicas cuyo producto alterado puede causar la detención de la diferenciación. Las mutaciones de clase II que involucran *core binding factors* (CBF) son las más comunes en la leucemia aguda (LA)<sup>11</sup>.

### 3.3. Factores de riesgo

La LMA es una enfermedad multifactorial; solo en algunos casos es posible identificar algún factor etiológico, ya que la mayoría de los pacientes con LMA *de novo* nunca han estado expuestos a ningún factor de riesgo<sup>6</sup>. En la Tabla 1 se muestran los principales factores de riesgo que se asocian a la LMA.

**Tabla 1. Factores de riesgo asociados con la LMA<sup>7</sup>**

<b>Desórdenes genéticos</b>	Síndrome de Down
	Síndrome de Klinefelter
	Síndrome de Patau
	Ataxia telangiectasia
	Neurofibromatosis
	Anemia de Fanconi
	Síndrome de Bloom
<b>Factores físicos y químicos</b>	Benceno
	Pesticidas
	Quimioterapia
	Radiación ionizante
<b>Virus</b>	Parvovirus B19
<b>Enfermedades hematológicas previas</b>	SMD
	SMP
	LMC
	Anemia aplásica
<b>Neoplasias</b>	Linfoma de Hodking
	Mieloma múltiple
	Cáncer de mama, ovario

LMC, leucemia mieloide crónica; SMD, síndrome mielodisplásico; SMP, síndrome mieloproliferativo

En el caso de pacientes con síndrome de Down, es el exceso de la dosis génica en el cromosoma 21 lo que aumenta el riesgo de padecer leucemia; es posible que uno de estos genes sea *AML1*<sup>12</sup>. Tanto en la anemia de Fanconi como en el síndrome de Bloom, las células hematopoyéticas muestran aberraciones cromosómicas espontáneas debidas al aumento en la fragilidad del DNA y al déficit en su reparación, lo que predispone a las células a acumular mutaciones, originando síndromes preleucémicos<sup>7</sup>.

Algunos estudios muestran que personas con ciertos polimorfismos en genes encargados de metabolizar cancerígenos tienen un alto riesgo de desarrollar LMA<sup>7</sup>. La NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1(NQO1), es una enzima que metaboliza quinonas y reduce el estrés oxidativo. Un polimorfismo en el nucleótido 609 del gen *NQO1* resulta en una disminución en su actividad y se asocia a una predisposición a padecer LMA<sup>7</sup>.

En la exposición crónica al benceno se generan metabolitos que inducen mutaciones en genes que regulan: la proliferación y diferenciación de las células madre, recombinación mitótica y modificaciones epigenéticas. Además, sus efectos en el estroma de la médula podrían promover la proliferación celular y, el estrés oxidativo resultante del metabolismo del benceno podría dañar el DNA y alterar la señalización de las células hematopoyéticas<sup>13</sup>.

En cuanto a la exposición a radiación ionizante, se ha encontrado que los sobrevivientes de la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki muestran una incidencia de 10 -20 veces más alta de padecer leucemia, en particular LMA. Sin embargo, debe considerarse la susceptibilidad individual, dosis, tiempo de exposición y superficie corporal expuesta<sup>6</sup>. La administración de quimioterapia se asocia con una elevada incidencia de LMA; los citostáticos con mayor potencial leucemogénico son los alquilantes y los inhibidores de la topoisomerasa II<sup>7</sup>. Los procesos malignos sólidos (por ejemplo en mama y ovario) se vinculan con un riesgo de leucemia, relacionado quizá con la radiación o la quimioterapia con agentes alquilantes<sup>7</sup>. La LMA puede aparecer debido a la progresión de otras enfermedades hematológicas como los SMD y SMP. En más del 80% de los

casos de LMC se observa una transformación a leucemia aguda (crisis blástica), lo que forma parte de su evolución natural<sup>6</sup>.

Los retrovirus (virus Epstein-Barr y VIH) están claramente implicados en la etiología de muchas leucemias. Algunos estudios sugieren que el parvovirus B19 puede participar en la patogénesis de la LMA<sup>14</sup>.

### **3.4. Características clínicas**

Las manifestaciones clínicas de la LMA son el resultado de la inhibición de la producción de células hematopoyéticas normales y el grado de proliferación y acumulación de los blastos en la médula ósea. Los síntomas más frecuentes son:

- Debilidad, fatiga, palidez y disnea como consecuencia de la anemia.
- Hematomas espontáneos, hemorragia gingival o nasal, hemorragia excesiva tras pequeñas heridas, todo ello secundario a la trombocitopenia.
- Lesiones pustulosas y fiebre con algunas infecciones, secundario a la neutropenia.
- Coagulación intravascular diseminada (CID) en el subtipo LPA o M3<sup>15</sup>. En los subtipos mielomonocítico (subtipo M4) y monocítico (subtipo M5) se presenta infiltración de células leucémicas a la piel (cloromas), mucosa y encías<sup>16</sup>.
- Dolor óseo y articular debido a la proliferación incontrolada de células leucémicas. La esplenomegalia es frecuente pero el aumento de los ganglios linfáticos es raro.
- Niveles elevados de lisozima (subtipos monocíticos), hiperuricemia (recambio celular aumentado).

### 3.5. Clasificación Franco-Americano-Británica<sup>17</sup>

En 1976<sup>17</sup> se publicó una clasificación de la LMA por un grupo de hematólogos de Francia, América y Bretaña (FAB), la cual divide a la LMA en ocho grupos de acuerdo a la morfología celular (grado de madurez y tipo de linaje), citoquímica e inmunofenotipo de las células leucémicas de la médula ósea. Cada subtipo se resume en la Tabla 2.

En este sistema el porcentaje de blastos en médula ósea debe ser de al menos 30% para considerarse como leucemia<sup>17</sup>. Esta categorización solo es de valor en pacientes *de novo* ya que el tratamiento tiende a modificar a las células normales y malignas y hace difícil su identificación.

**Tabla 2. Clasificación FAB de la LMA<sup>17</sup>**

Línea celular	Subtipo	Tipo de leucemia aguda	Incidencia en LMA <sup>17</sup>
<b>Mieloide</b>	M0	Mieloblástica mínimamente diferenciada	1-3%
	M1	Mieloblástica sin maduración	15-20%
	M2	Mieloblástica con maduración	25-30%
	M3	Promielocítica hipergranular	10%
	M3 v	Promielocítica microgranular (variante)	
<b>Mieloide y Monocítica</b>	M4	Mielomonocítica	20-25%
	M4 Eo	Mielomonocítica con eosinofilia en médula ósea	
<b>Monocítica</b>	M5 a	Monocítica pobremente diferenciada	10%
	M5 b	Monocítica diferenciada	
<b>Eritroide y mieloide</b>	M6a	Eritroleucemia, eritroide-mieloide	5%
	M6b	Eritroleucemia, eritroide pura	
<b>Megacariocítica</b>	M7	Megacarioblástica	5-10%

### 3.6. Clasificación de la LMA según la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>18</sup>

Este sistema, publicado en el 2008, y presentado en la Tabla 3, reporta que el porcentaje de blastos para el diagnóstico de la LMA es del 20% o más en médula ósea<sup>18</sup> y que los pacientes con t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13;q22), inv(16)(p13;q22) o t(15;17)(q22;q12) tienen LMA independientemente de su porcentaje de blastos<sup>18</sup>

**Tabla 3. Clasificación de la LMA según la OMS<sup>18</sup>**

<b>Clasificación de las LMA según la OMS</b>	
<b>Leucemia mieloide aguda con translocaciones citogenéticas recurrentes</b>	
LMA con t(8;21)(q22;q22); ( <i>RUNX1 / RUNX1T1</i> )	
LMA con eosinofilia inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); ( <i>CBFB / MYH11</i> )	
Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); ( <i>PML / RARα</i> )	
LMA con t(9;11)(p22;q23); ( <i>MLLT3 / MLL</i> )	
LMA con t(6;9)(p23;q34); ( <i>DEK / NUP214</i> )	
LMA con inv(3)(q21;q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); ( <i>RPN1 / EVI1</i> )	
LMA con mutación <i>NPM1</i> (entidad provicional)	
LMA con mutación <i>CEBPA</i> (entidad provicional)	
<b>LMA con características relacionadas a mielodisplasia</b>	
<b>Neoplasias mieloides asociadas a terapia</b>	
<b>Leucemia mieloide aguda no especificada de otra manera</b>	<b>FAB</b>
LMA mínimamente diferenciada	MO
LMA sin maduración	M1
LMA con maduración	M2
Leucemia mielomonocítica aguda	M4
Leucemia monoblástica y monocítica aguda	M5a, M5b
<b>Leucemias eritroides agudas</b>	
Leucemia eritroide pura	M6b
Eritroleucemia, eritroide / mieloide	M6a
Leucemia megacarioblástica aguda	M7
Leucemia basofílica aguda	
Panmielosis aguda con mielofibrosis	
<b>Sarcoma mieloide</b>	
<b>Proliferaciones mieloides relacionadas con síndrome de Down</b>	
Mielopoyesis anormal transitoria	
Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down	
<b>Neoplasia de células dendríticas blásticas plasmocitoides</b>	



Aunque la clasificación de la FAB es la más utilizada, el sistema de clasificación de la OMS es más útil desde el punto de vista clínico, puesto que da información pronóstica de la enfermedad al incorporar datos citogenéticos y moleculares de los genes involucrados.

Además de las clasificaciones anteriores, se tiene una clasificación de la LMA con base en su origen:

**LMA que evoluciona de desórdenes hematológicos previos (SMD o SMP).** Se asocia con una citogenética de riesgo desfavorable, una mala respuesta al tratamiento y su aparición aumenta con la edad. La incidencia de anomalías cromosómicas es del 75%<sup>19</sup>.

**LMA secundaria al tratamiento (t-LMA).** La t-LMA se relaciona con agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II. La primera se caracteriza por una fase mielodisplásica previa, involucra cariotipos complejos y del(5)/-5 o del (7)/-7 y no responde a la quimioterapia. La segunda no presenta una fase mielodisplásica previa, se presenta en los subtipos M4 o M5, tiene traslocaciones que involucran la banda 11q23 y 21q22, y responde a la quimioterapia. La incidencia de anomalías cromosómicas en t-LMA es de >80%<sup>19</sup>.

**LMA que se origina *de novo*.** Suele asociarse a citogenética de riesgo favorable y presenta mejor respuesta al tratamiento y supervivencia, es la más frecuente en niños y adultos jóvenes. Algunos tipos están claramente relacionados con trastornos de diferenciación, otros se caracterizan por defectos en la proliferación, como la LMA con cariotipo normal (CN-LMA), a menudo con mutaciones en el gen del receptor FLT3<sup>20</sup>. La incidencia de anomalías cromosómicas es más baja en la LMA *de novo* (50-55%)<sup>19</sup>

### 3.7. LMA en niños y adultos mayores

En los niños, los subtipos de LMA más comunes son el M2 y el M7<sup>21</sup> y presentan la pérdida del cromosoma X en la t(8;21) como una alteración secundaria<sup>22</sup>. La t(1;22) ha sido relacionada con niños sin síndrome de Down (SD) que desarrollan el subtipo M7 y tiene un mal pronóstico<sup>23</sup>.

En el 10% de los recién nacidos con SD, la LMA se puede presentar como un síndrome transitorio (ST) donde hay un incremento en el recuento leucocitario, el cual disminuye lentamente después de semanas o meses sin tratamiento<sup>24</sup>. Sin embargo, el 20% de los niños con SD que se recuperan del ST desarrollan la variante M7 dentro de sus primeros cuatro años de vida<sup>24</sup>.

El riesgo de los niños con SD de presentar LMA, en especial el subtipo M7 y ST, se debe a mutaciones en el gen *GATA 1*<sup>24</sup>. Los niños con SD tienen 500 veces más riesgo de padecer M7<sup>12</sup>.

La alteración más común que ocurre en los niños menores de 12 meses son los rearrreglos del gen *MLL* en 11q23. Asimismo, la trisomía 8 es la alteración numérica más frecuente en infantes<sup>22</sup>.

En relación con la morfología, la LMA en el adulto mayor (>65 años) no muestra diferencias con la LMA de los pacientes jóvenes<sup>25</sup>. Varios estudios reportan las mismas tasas de subtipos FAB<sup>26</sup>. Sin embargo, otros trabajos plantean que la frecuencia del subtipo M3 es menos común en los adultos mayores que en la población joven<sup>27</sup>.

Las alteraciones cromosómicas favorables: t(15,17), t(8,21) o inv(16), que se relacionan con una buena respuesta a la quimioterapia intensiva, son más frecuentes en jóvenes que en ancianos<sup>25,27</sup>. En contraste, alteraciones cromosómicas de mal pronóstico, como son del(5)/5q- y del(7)/7q-, son muy comunes en los pacientes de >65 años (más del 35 % de los casos)<sup>27</sup>.

La capacidad de los adultos mayores de resistir la intensidad de una quimioterapia agresiva se ve reducida por la edad, el estado de salud al inicio del

padecimiento, la presencia de enfermedades concomitantes, anomalías cromosómicas desfavorables y el fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR-1)<sup>28,29</sup>.

#### **4. Morfología y genética de la LMA**

Para confirmar el diagnóstico de LMA, se realiza un aspirado de médula ósea. Las extensiones son teñidas con colorante de Wright para identificar la morfología y al menos un 20% de blastos<sup>18</sup>. Además se envían muestras a otras áreas de laboratorio para realizar estudios citoquímicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares con el fin de clasificar correctamente el tipo de leucemia.

En cuanto a la citogenética, el cariotipo en blastos leucémicos ha mostrado ser la herramienta más importante de pronóstico en la LMA<sup>30</sup>. Ciertas anomalías cromosómicas caracterizan la evolución clínica de la enfermedad al asociarse con subtipos de LMA específicos, asimismo ayudan a predecir el pronóstico de la enfermedad desde el diagnóstico y a planear mejor la terapéutica. De esta manera, los estudios citogenéticos definen tres grupos generales de riesgo: favorable, intermedio y adverso<sup>31</sup>. Además el análisis cromosómico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual (EMR).

Las muestras de médula ósea o sangre periférica para el análisis citogenético deben estar anticoaguladas. El anticoagulante de elección es la heparina sódica ya que otros anticoagulantes como el EDTA o el citrato ejercen su acción al quelar  $\text{Ca}^{2+}$  (indispensable en la cascada de la coagulación), al reducir la concentración de este ión en el medio de cultivo, impidiendo la obtención de metafases, pues estos iones son cofactores de las enzimas implicadas en la formación del huso mitótico durante la división celular<sup>32</sup>.

La heparina detiene la coagulación al acelerar la acción inhibitoria de la antitrombina, enzima que neutraliza a la trombina y a otros factores de la coagulación<sup>33</sup>. La trombina es la enzima que actúa sobre el fibrinógeno formando monómeros de fibrina, los cuales al ser insolubles forman parte del coágulo. Esta inactivación se realiza tras la formación de un complejo ternario en donde la heparina, a través de su sitio activo (pentasacárido), se une a la antitrombina<sup>34</sup>. La antitrombina sufre un cambio conformacional que hace más accesible su centro activo, y este complejo se une finalmente a la trombina<sup>34,35</sup>.

Por el contrario, para los estudios hematológicos, el anticoagulante de elección es el EDTA, ya que no altera la morfología eritrocitaria y leucocitaria, de manera que permite una demora de hasta una hora para la realización del frotis sanguíneo después de la extracción<sup>36</sup>. Además, el EDTA inhibe la aglutinación de las plaquetas y facilita su recuento. Sin embargo, un exceso de este anticoagulante afecta a los eritrocitos y a los leucocitos, a los cuales les produce encogimiento y cambios en su forma<sup>37</sup>.

La heparina no es el anticoagulante ideal ya que presenta el inconveniente de que si no se mezcla rápidamente con la sangre extraída pueden formarse microcoágulos<sup>38</sup>. Asimismo, no es recomendable para el frotis sanguíneo porque produce un fondo azul en la lámina, lo que produce artefactos y altera las características tintoriales y morfológicas de las células sanguíneas. Aunque no altera el tamaño de los eritrocitos<sup>39</sup>, la heparina no inhibe completamente la aglutinación de leucocitos y plaquetas<sup>40,41</sup>; y en los neutrófilos se puede observar degeneración nuclear<sup>42</sup>.

#### 4.1. Diagnóstico

En sangre periférica (SP) los valores normales del recuento leucocitario suelen estar entre  $3.9 \times 10^3/\mu\text{L}$  y  $10.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ <sup>43</sup>. En pacientes con LMA, estos valores suelen oscilar entre  $5 \times 10^3/\mu\text{L}$  y  $30 \times 10^3/\mu\text{L}$ , aunque casi la mitad de los pacientes muestran leucocitopenia ( $<5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) y, el 5-20% de los pacientes presentan un recuento leucocitario muy elevado ( $>100 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). También se presenta neutropenia ( $<1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) y los pocos neutrófilos maduros muestran signos de mielodisplasia<sup>44</sup>.

En el frotis de SP casi siempre se observan blastos (15-95% de los leucocitos)<sup>43</sup>, lo cual sugiere el diagnóstico de LA, aunque un pequeño porcentaje de pacientes pueden no tener células leucémicas circulantes. La presencia de gránulos azurófilos o cuerpos de Auer en los blastos permite identificar la naturaleza mieloide de la LMA.

Es frecuente observar anemia normocítica normocrómica en el momento del diagnóstico y trombocitopenia con una cifra de plaquetas que suele ser inferior a  $50 \times 10^3/\mu\text{L}$  con plaquetas gigantes e hipogranulares<sup>17</sup>.

Bajo el microscopio, la médula ósea de un paciente con LMA es hiper celular, tiene pocos megacariocitos o carece de ellos. Al menos el 20% de las células nucleadas no eritroides (CNNE) de la médula ósea son blastos (médula ósea normal= 5%), los que deben ser analizados con atención para poder identificar el subtipo de LMA<sup>43</sup>. A veces es difícil aspirar la médula ósea de un paciente con LMA; a esto se le llama aspirado seco. Este fenómeno se debe a que en el espacio medular existe mielofibrosis, signo comúnmente encontrado en el subtipo M7. En estos casos se prefiere realizar una biopsia de hueso y una impronta para poder efectuar el análisis morfológico<sup>6,45</sup>.

En la leucemia con leucopenia en SP, los blastos son difíciles de encontrar en la sangre, pero siempre están presentes en cantidades anormales en la médula ósea. Por ello el estudio en médula ósea es el estándar de oro para diagnosticar cualquier leucemia.

Algunos datos de laboratorio son útiles para apoyar el diagnóstico, por ejemplo, la hiperuricemia y un aumento en la enzima deshidrogenasa láctica indican un alto recambio celular<sup>43</sup>.

El estudio citoquímico, el inmunofenotipo, la citogenética y los estudios moleculares tienen una implicación muy importante en la clasificación de la LMA, y en el pronóstico y seguimiento de la enfermedad. Estas técnicas serán mencionadas más adelante.

#### **4.2. Morfología y citoquímica**

En el estudio morfológico deben analizarse detenidamente las características de las células leucémicas de la médula ósea<sup>17</sup>: el tamaño, la relación núcleo-citoplasma, el grado de madurez de la cromatina, la presencia o no de nucléolos, el contorno del núcleo, pseudo-Pelger, el tipo de inclusiones citoplasmáticas (granulación, vacuolas o cuerpos de Auer), el grado de basofilia del citoplasma y su contorno<sup>46</sup>.

Los cuerpos de Auer son inclusiones en forma de aguja que se tiñen de azul dentro del citoplasma de los mieloblastos o promielocitos leucémicos; son aglomerados anormales de gránulos y su presencia es útil para diferenciar la LMA de la LLA<sup>4</sup>.

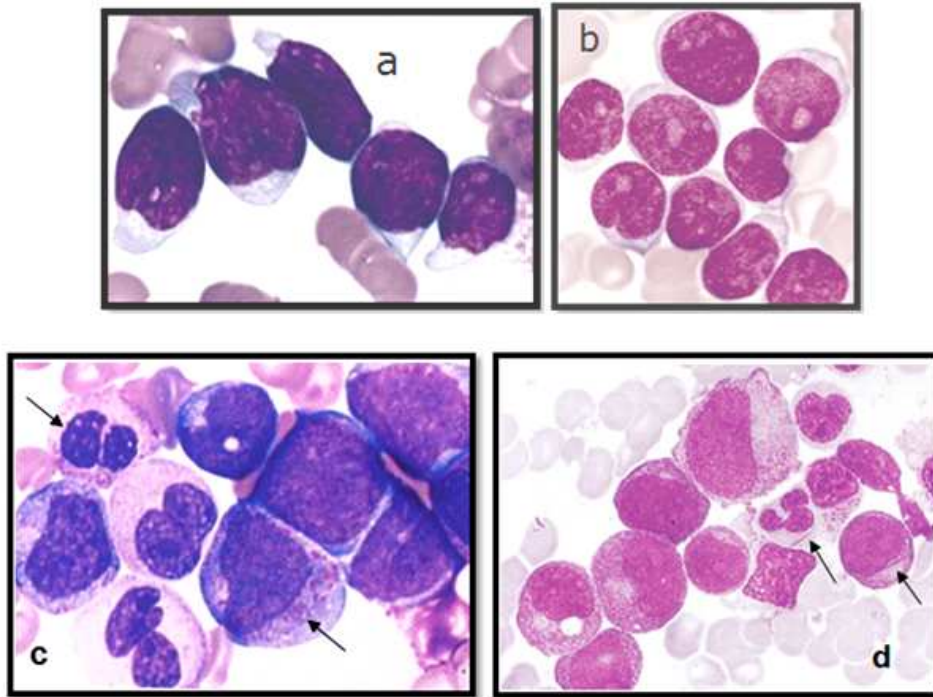
Los gránulos azurófilos son gránulos primarios (motrado-azulado) en el citoplasma de los leucocitos de estirpe mieloide. No es común encontrarlos en blastos, pero en las leucemias pueden estar presentes<sup>17</sup>.

El pseudo-Pelger es un defecto adquirido en la segmentación de los neutrófilos que aparece en circunstancias patológicas diversas como SMP, SMD o LMA o debido a la administración de ciertos fármacos. Se caracteriza porque la mayoría de los neutrófilos presentan un núcleo con solo dos segmentos redondeados, unidos entre sí por un filamento delgado de cromatina<sup>17</sup>.

**M0: LMA mínimamente diferenciada.** Este subtipo representa <5% de todos los casos de LMA<sup>6,47</sup> y los blastos no desarrollan las características morfológicas mieloides<sup>44</sup> (Figura 1a). Generalmente se observan blastos de tamaño mediano; la relación núcleo/citoplasma es alta, el núcleo tiene entre 1 y 2 nucléolos y la cromatina es fina. El citoplasma no tiene granulación<sup>17,43</sup>. Se caracteriza por una alta frecuencia de cariotipos complejos, del (5q), del (7q), trisomía 8 y trisomía 13<sup>6</sup>.

**M1: LMA sin maduración.** Representa el 5-10% de todas las LMA<sup>6,47</sup>. En este subtipo se desarrolla una diferenciación mieloides mínima<sup>17,43,44</sup> (Figura 1b). Se caracteriza por la presencia de blastos poco diferenciados y sin maduración que corresponden el 90% o más de las CNNE de la médula ósea<sup>6</sup>. Los gránulos y cuerpos de Auer son infrecuentes<sup>17,48</sup>. Se asocia con trisomía 8 o monosomías 5 y 7<sup>48</sup>.

**M2: LMA con maduración.** Es el subtipo más frecuente de LMA con  $\geq 20\%$  de todos los casos<sup>6</sup>. Los mieloblastos constituyen el 30-90% de las CNNE de la médula ósea y los promielocitos, mielocitos y neutrófilos maduros (con pseudo-Pelger) constituyen  $>10\%$ <sup>43</sup>. Los mieloblastos son de tamaño mediano y pueden mostrar gránulos azurófilos o no, pero es muy frecuente encontrar cuerpos de Auer aislados<sup>47,48</sup> (Figura 1c y 1d). La M2 se asocia con la t(8;21)<sup>6,17,43,44,47,48</sup>. El subtipo M2-Baso se caracteriza por un aumento en los basófilos y se relaciona con la t(6;9)<sup>6</sup>.

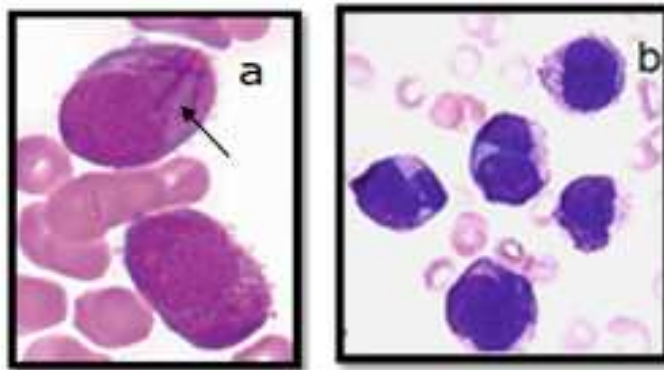


**Figura 1. Frotis de médula ósea de pacientes con LMA, M0-M2.** a) M0<sup>49</sup>, LMA mínimamente diferenciada, los blastos varían en tamaño, cantidad de citoplasma y tamaño del nucléolo. No hay características de diferenciación. b) M1<sup>50</sup>, LMA sin maduración, los blastos varían levemente en su tamaño, su citoplasma es pálido y agranular, los núcleos son regulares con cromatina fina y nucléolos prominentes. c) M2<sup>47</sup>, LMA con maduración, además de que los mieloblastos presentan granulación (flecha inferior), hay varios neutrófilos maduros, de los cuales uno presenta pseudo-Pelger en el núcleo (flecha superior). d) M2<sup>51</sup>, los blastos tienen granulación (flecha inferior), hay células mieloides en diversos estadios de maduración y se observan cuerpos de Auer (flecha superior).

**M3: Leucemia promielocítica aguda.** La LPA constituye el 10% de los casos de LMA<sup>6</sup> y contiene más de un 30% de promielocitos<sup>43</sup>, los cuales presentan numerosa granulación primaria dispersa dentro de su citoplasma y sobre el núcleo excéntrico y bilobulado<sup>48</sup>. Los cuerpos de Auer están presentes en casi todos los casos (Figura 2a) y forman haces o palizadas<sup>17,43,44</sup>. No se encuentran mieloblastos<sup>47</sup>.

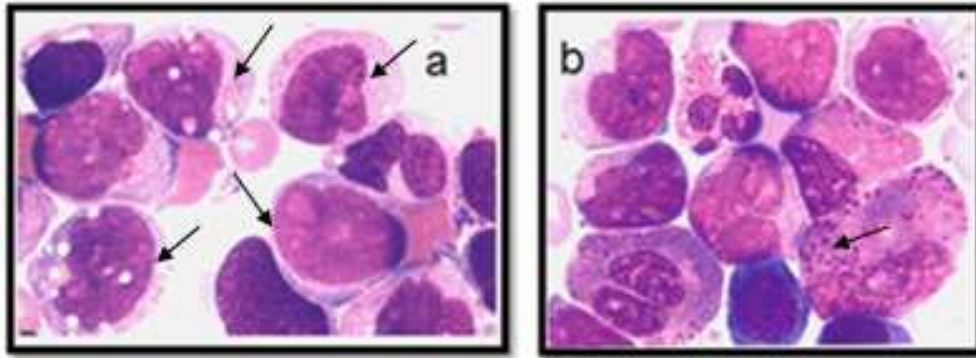


En la variante M3v, hipogranular (Figura 2b), los gránulos no son detectables por microscopía de luz (se puede confundir con leucemias monocíticas) pero se pueden visualizar por microscopía electrónica<sup>43,52</sup>. La LPA se asocia con la t(15;17) en el 95% de los casos<sup>15</sup>.



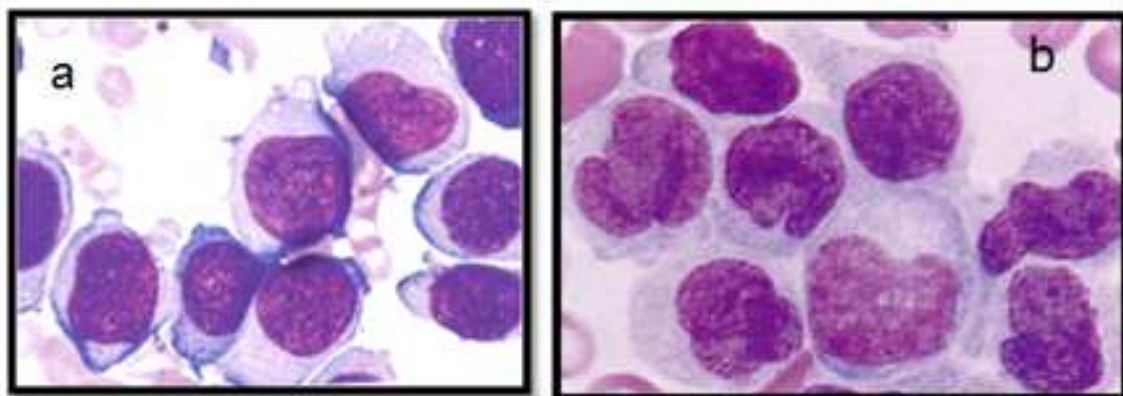
**Figura 2. Frotis de médula ósea y sangre periférica de pacientes con LPA.** a) Frotis de médula ósea, subtipo hipergranular<sup>53</sup>, los promielocitos muestran granulación azurófila intensa. Uno contiene numerosos cuerpos de Auer, indicados con la flecha. b) Frotis de sangre periférica, variante microgranular<sup>47</sup>, los promielocitos tienen núcleo lobulado, el citoplasma tiene pequeños gránulos azurófilos dispersos.

**M4: Leucemia mielomonocítica aguda.** Representa el 20-25% de los casos de LMA<sup>6</sup>. Es un subtipo similar a la M2, excepto porque las células de estirpe monocítica constituyen más del 20% de las CNNE de la médula ósea, y el componente granulocítico también representa un 20%<sup>43</sup> (Figura 3a). La variante M4 Eo, asociada con inv(16) o t(16;16) presenta 10% de eosinófilos en la médula ósea, y en SP<sup>44,48</sup> (Figura 3b).



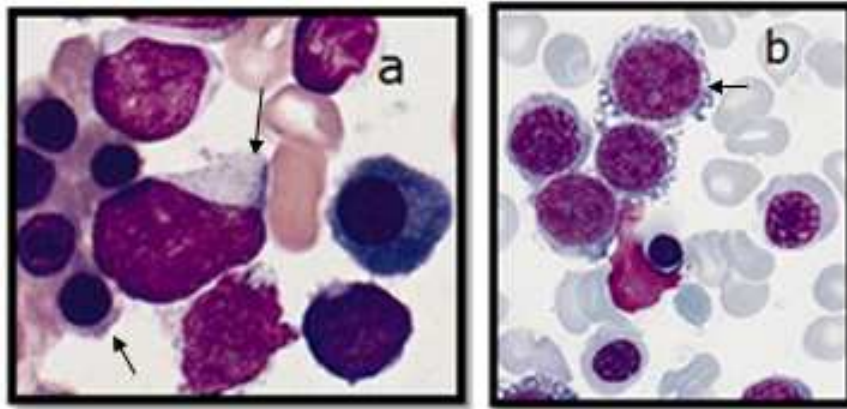
**Figura 3. Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia mielomonocítica, M4.** a) Se observan mieloblastos con granulación en la parte superior y varios monocitos maduros con núcleo lobulado en la parte inferior<sup>47</sup>. b) M4 asociada a inv(16)<sup>47</sup>, presencia de eosinófilos anormales, uno presenta gránulos basófilos anormales.

**M5: Leucemia monocítica aguda.** Representa el 10% de los casos de LMA<sup>6</sup>. En la variante 5a (Figura 4a), más del 80% de las células monocíticas de la médula ósea son monoblastos, mientras que en la variante 5b (Figura 4b), casi no hay monoblastos y hay un 20-80% de monocitos en todos sus estadios de maduración<sup>43</sup>. Los monoblastos son células grandes con citoplasma abundante (relación núcleo/citoplasma baja), basófilo, irregular y en ocasiones vacuolado; el núcleo es lobulado con cromatina fina y con un nucléolo. Se asocia frecuentemente con rearrreglos del cromosoma 11<sup>48</sup>.



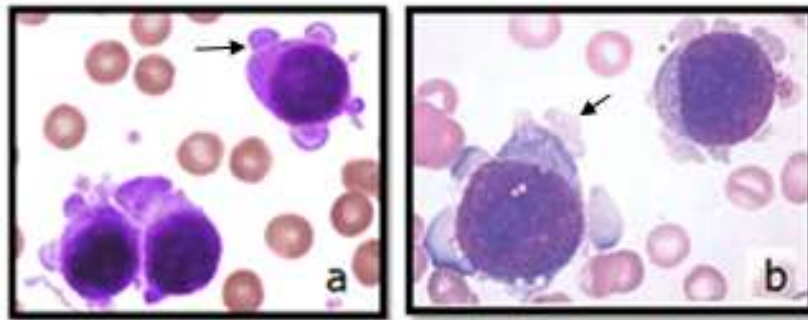
**Figura 4. Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia monocítica, M5.**  
a) Variante M5a<sup>54</sup>, presencia de varios monoblastos con núcleo hendido y cromatina fina con nucléolos, algunos con citoplasma muy abundante. b) Variante M5b<sup>47</sup>, se observan células monocíticas con cierto grado de maduración, el núcleo está plegado y el nucléolo ya no está bien definido.

**M6: Eritroleucemia aguda.** Constituye el 5% de los casos de LMA<sup>6</sup>. En SP hay punteado basófilo y eritrocitos nucleados, en la variante M6a (Figura 5a) más del 50% de las células nucleadas son eritroblastos en todas las etapas de maduración y más de un 30% de las CNNE son blastos mieloides<sup>55</sup>. Existen alteraciones megaloblásticas, formas binucleadas y vacuolas. En la M6b (Figura 5b) más del 80% de las células de la médula ósea son eritroblastos<sup>44</sup> (relación núcleo/citoplasma alta) de tamaño mediano a grande, con núcleo redondo y central, cromatina condensada con 1 nucléolo y citoplasma intensamente basófilo. No hay componente mieloides significativo. Suelen observarse anomalías citogenéticas como deleciones 5q y 7q<sup>56</sup>.



**Figura 5. Frotis de médula ósea de pacientes con eritroleucemia, M6.** a) Variante M6a<sup>48</sup>, se aprecian mieloblastos (flecha superior) y precursores eritroides (flecha inferior). b) Variante M6b<sup>57</sup>, hay precursores eritroides inmaduros, algunos con vacuolas en el citoplasma se indican con una flecha.

**M7: Leucemia megacarioblástica aguda.** Representa el 5-10% de los casos de LMA<sup>6</sup>. Al menos el 30% de las células de la médula ósea son blastos indiferenciados, grandes, con núcleo redondo, lobulado, con 1-3 nucléolos, citoplasma basófilo y con prolongaciones, sin gránulos<sup>23</sup> (Figura 6a y 6b). Las características morfológicas de los megacarioblastos son altamente variables por lo que en esos casos el diagnóstico puede confirmarse con el uso de microscopía electrónica por medio de técnicas citoquímicas ultraestructurales que ponen en evidencia la peroxidasa plaquetaria o con el uso de anticuerpos dirigidos contra antígenos plaquetarios<sup>48</sup>. En SP circulan fragmentos de megacariocitos y las plaquetas son displásicas<sup>43</sup>. La presencia de mielofibrosis es característica de este subtipo<sup>17,23,43,48</sup>. La M7 es el subtipo más común en los pacientes con SD<sup>23</sup> y se relaciona con la t(1;22)<sup>48</sup>.



**Figura 6. Frotis de médula ósea de pacientes con leucemia megacarioblástica, M7.** a)<sup>58</sup> y b)<sup>47</sup> Los megacarioblastos son células grandes con prolongaciones citoplasmáticas, las cuales se indican con una flecha.

Aunque en el pasado la citoquímica fue una herramienta primordial para clasificar a las leucemias, actualmente no es la única técnica usada. Sin embargo, la citoquímica es de gran utilidad para diferenciar las leucemias mieloides de las linfoides y también puede ayudar a identificar los distintos subtipos de LMA, sobre todo los que tienen un componente monocítico.

Para estas pruebas, las células se exponen a sustratos que reaccionan de manera específica con componentes celulares constitutivos generando un producto colorido que se puede observar con un microscopio óptico. Las reacciones citoquímicas son de dos tipos<sup>4</sup>: enzimáticas (tinciones para mieloperoxidasa y esterases) y no enzimáticas (Sudán negro B para lípidos).

Las células de estirpe granulocítica se tiñen con mieloperoxidasa (MPO), Sudán negro B (SNB) y cloracetato esterasa (CAE). La tinción con esterases inespecíficas (ANBE) es característica y exclusiva de la estirpe monocítica. La reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) tiñe las células linfoides y eritroides<sup>4,59</sup>. Estas reacciones se resumen en la Tabla 4.

Para que un estudio citoquímico sea válido, las reacciones deben ser sensibles, específicas y reproducibles. Asimismo, se debe de contar con controles externos o internos que confirmen que la técnica se realizó correctamente. En la práctica, la técnica que reemplaza a la citoquímica es la citometría de flujo<sup>59</sup>.

**Tabla 4. Características citoquímicas de los subtipos FAB de la LMA<sup>4</sup>**

Tinción citoquímica	Utilidad	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
<b>MPO</b>	Diferencia entre LMA y LLA	-	+	++	+++	++	-	+	-
<b>SB</b>	Paralela a la tinción MPO	-	+	++	+++	++	-	+	-
<b>CAE</b>	Similar a MPO y SB	-	±	+	+++	++	-	-	±
<b>ANBE</b>	Diagnóstico de M4 y M5	-	-	-	-	+	+++	±	±
<b>PAS</b>	Diagnóstico de eritroleucemia	-	-	-	±	-	-	+++	++

MPO, Mieloperoxidasa; SB, Sudán Negro B; CAE, Cloroacetato esterasa; ANBE, α-naftil butirato esterasa; PAS, Ácido peryódico de Schiff; M0-M7, Subtipos de LMA.

### 4.3. Inmunofenotipo

La citometría de flujo identifica antígenos citoplasmáticos y de superficie en las células a través de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos. En la citometría de flujo se combinan diversos anticuerpos monoclonales ya que las células leucémicas tienen diferentes antígenos, dependiendo de su origen celular y madurez<sup>60</sup>.

El objetivo inicial es diferenciar la clona mieloide de la linfoide, y después determinar el subtipo morfológico de LMA<sup>45</sup>. También se puede identificar a las células que no tienen características morfológicas o citoquímicas de una línea celular específica. Por ejemplo, se distingue la LAM con diferenciación mínima de la LLA, se diagnostica la LMA M7, la LMA M3 y las leucemias bifenotípicas o de linaje mixto<sup>60</sup>. Los principales marcadores encontrados en cada subtipo de LMA se muestran en la Tabla 5.

El inmunofenotipo también aporta información pronóstica y junto con las técnicas moleculares se utiliza en el seguimiento de los pacientes en remisión completa (RC)<sup>60</sup>. Algunos estudios sugieren que el porcentaje de expresión de

CD13 y CD15 se asocia con el alcance de la RC<sup>61</sup>. CD14 y CD11b se expresan en los monoblastos y su expresión se correlaciona con una menor probabilidad de RC y menor supervivencia<sup>62,63</sup>. Asimismo, la expresión de CD34 y HLA-DR se ha relacionado con un pronóstico desfavorable<sup>64</sup>.

También se han detectado antígenos linfoides en los mieloblastos y se ha sugerido que éstos tienen una implicación pronóstica. Por ejemplo, CD2 se expresa en la LPA y parece asociarse a la morfología M3v<sup>65</sup>, así como a LMA con la inv(16)<sup>66</sup>. CD19 se expresa en LMA con la t(8;21)<sup>67</sup>. CD7 se ha relacionado con las LMA secundarias a SMD<sup>68</sup> y con las mutaciones de *CEBPA*<sup>69</sup> y las duplicaciones internas en tándem en *FLT3* (*FLT3-ITD*)<sup>70</sup> en CN-LMA.

**Tabla 5. Marcadores inmunofenotípicos útiles en la clasificación de la LMA<sup>71</sup>**

Clasificación FAB	Marcadores de células precursoras		Marcadores mieloides			Marcadores monocíticos		Otros
	HLA-DR	CD34	CD13	CD33	CD15	CD11	CD14	
<b>M0</b>	+	+	+	±	±	-	-	
<b>M1</b>	+	+	+	+	-	±	-	
<b>M2</b>	+	+	+	+	+	±	-	
<b>M3</b>	-	-	+	+	±	-	-	
<b>M4</b>	+	-	+	+	+	+	+	
<b>M5</b>	+	-	±	+	+	+	+	
<b>M6</b>	±	-	±	±	-	±	-	Glicoforina A
<b>M7</b>	+	+	-	±	-	-	-	CD41, CD42, CD61

La citometría de flujo también puede ayudar a conocer la cantidad de células leucémicas que persisten en el paciente en RC. Esto último permite identificar qué pacientes tienen alta probabilidad de recaer e intensificar el tratamiento antes de que eso suceda<sup>60</sup>.

No todas las células neoplásicas expresan siempre los mismos antígenos. Al estudiar la LMA mediante citometría de flujo muchas veces aparecen fenotipos aberrantes. Se considera que el 75% de las LAM presentan al menos un fenotipo aberrante al momento del diagnóstico<sup>72</sup>. Los fenotipos aberrantes pueden ser de tres tipos: una célula leucémica tiene dos antígenos que de manera normal pertenecen a dos etapas de diferenciación diferentes; la célula leucémica expresa antígenos que de manera normal corresponden a líneas celulares diferentes; o se detectan antígenos en las células leucémicas en una intensidad diferente que como se encuentran en las células normales.

En algunos subtipos de LMA hay expresión de marcadores aberrantes. Por ejemplo, la expresión simultánea de CD56 (asociado a células *Natural Killer*, NK) y CD19 (asociado a linfocitos B) es un patrón característico de las células de M2 que tienen la t(8;21)<sup>60</sup>. En la M4 con inv (16), se expresa comúnmente CD2, el cual es un antígeno de linfocitos T. En la M5, CD4 y CD7 son antígenos linfoides que se detectan en algunos casos y confieren un pronóstico pobre<sup>60</sup>.

#### **4.4. Alteraciones citogenéticas**

En el estudio citogenético de la LMA, algunas anomalías cromosómicas se asocian a subtipos específicos, con una determinada respuesta al tratamiento y con el pronóstico. De acuerdo al ISCN<sup>73</sup>, para identificar una clona anormal, es necesario detectar al menos tres metafases con la misma alteración cromosómica, las cuales pueden ser numéricas o estructurales.

Se tienen dos clases principales de aberraciones citogenéticas: aquellas que resultan en la pérdida o ganancia de material cromosómico (desbalanceadas)



y aquellas en las que se lleva a cabo un intercambio equilibrado de material genético (balanceadas).

Las alteraciones citogenéticas primarias son las que están presentes en todas las metafases anormales estudiadas<sup>19</sup>. Las aberraciones secundarias son adicionales a la alteración primaria, generalmente no están presentes en todas las metafases anormales estudiadas y muchas veces confieren un mal pronóstico ya que se presentan durante la recaída o en los casos que son resistentes al tratamiento<sup>74</sup>. La mayoría de los cambios secundarios son monosomías, trisomías, deleciones, isocromosomas o cariotipos hiperdiploides. En la LAM con t(8;21) se presenta la pérdida de un cromosoma sexual o del(9)(q12q22) como alteración secundaria<sup>75</sup>, en la LAM con inv(16) es frecuente la trisomía 22, en la t(15;21) se asocia la trisomía 8<sup>74</sup>. Sin embargo, la trisomía 8 o monosomía 7 son aberraciones secundarias que se pueden observar en más de un subtipo de LAM<sup>19</sup>.

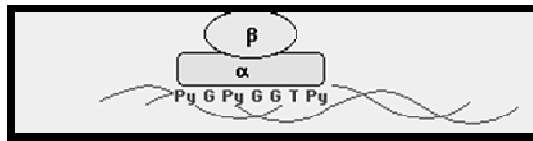
Las alteraciones cromosómicas numéricas originan pérdidas y ganancias de genes específicos, alterando, de esta manera la dosis génica. Entre las alteraciones estructurales, las traslocaciones pueden originar la sobreexpresión de un gen al quedar bajo el control del promotor de otro gen. Además, se pueden producir genes quiméricos, cuyos productos desregulan los procesos de diferenciación y proliferación celular<sup>76</sup>. La mayoría de las traslocaciones en LAM involucran genes de factores de transcripción o proteínas relacionadas con la hematopoyesis.

## Leucemias con alteraciones en el Factor de Unión Central

El factor de unión central (CBF) es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por una subunidad CFB $\beta$  que carece de dominios de unión al DNA y, una de tres subunidades CBF $\alpha$  (*RUNX1*, *RUNX2* o *RUNX3*) que se une directamente al DNA<sup>77</sup>(Figura 7).

El factor de transcripción compuesto por los genes *RUNX1* (*AML1* o *CBFA2*) y *CBFB* regula la diferenciación de las células hematopoyéticas, estimula la progresión de G1 a S en el ciclo celular e induce apoptosis bajo condiciones de estrés<sup>77</sup>. El gen *AML1* se encuentra en el cromosoma 21q22 y el gen *CBFB* está codificado en el cromosoma 16q22<sup>77</sup>.

La afinidad de la unión entre *RUNX1* y el DNA se incrementa significativamente con la asociación con *CBFB*<sup>78</sup>.



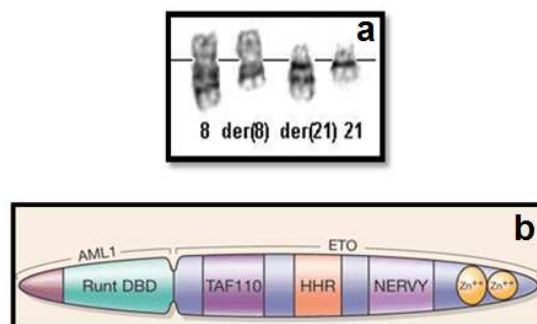
**Figura 7. Complejo CBF<sup>79</sup>.** Compuesto por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La figura muestra la secuencia de unión en el DNA.

- **La t(8;21)(q22;q22)**

La t(8;21) se encuentra en el 5-10% de todos los casos de LMA y en el 10-22% de los casos del subtipo M2<sup>75</sup>, principalmente en jóvenes<sup>17</sup>; se considera de buen pronóstico ya que tiene una buena respuesta a la quimioterapia. Dicha traslocación da lugar a la fusión del gen *ETO* (*eight-twenty-one* o *RUNX1T1*) presente en el cromosoma 8q22, con el gen *AML1* (*acute myeloid leukemia 1*) localizado en el cromosoma 21q22 (Figura 8a), y que forma parte del CBF. De esta manera se forma un nuevo gen híbrido *AML1/ETO* en el der(8)<sup>80</sup>(Figura 8b).

La proteína de fusión resultante se puede unir al DNA y heterodimerizarse con CBF $\beta$  a través de su parte AML1 (dominio Runt), pero recluta a través de su parte ETO a correguladores transcripcionales: (Receptor del co-represor nuclear 1, N-CoR, y desacetilasas de histonas, HDAC)<sup>77,78</sup> que reprimen la transcripción de los genes esenciales para la hematopoyesis que normalmente son activados por *AML1*: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y su receptor (M-CSFR), el receptor de células T (TCR), los antígenos CD2 y CD36, las interleucinas 3, 5 y 6 (IL3, IL5, IL6) y la mieloperoxidasa<sup>78,80</sup>.

La proteína de fusión de 752 aa mantiene el dominio Runt (que permite su unión a DNA y a la subunidad CBF $\beta$ ) de la proteína AML1 y casi todos los dominios de la proteína ETO<sup>79</sup>, los cuales son los responsables de la represión de la transcripción. En los casos del subtipo M2 que además presentan basofilia se han encontrado deleciones y traslocaciones con compromiso de la región 12p<sup>6</sup>.

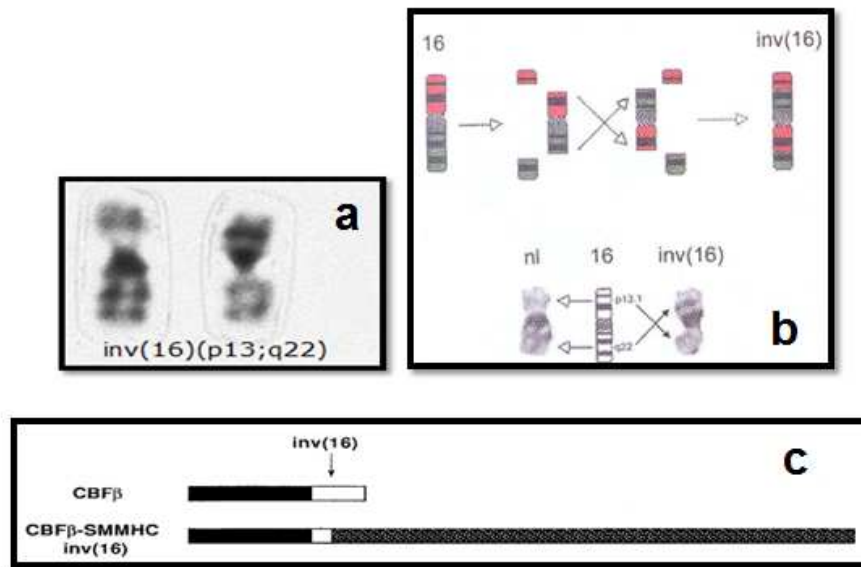


**Figura 8. Traslocación *AML1/ETO*.** a) Cariotipo parcial que muestra la  $t(8;21)(q22;q22)^{81}$ . b) Proteína de fusión *AML1/ETO*<sup>82</sup>, conserva el dominio Runt responsable de la unión a DNA y de la heterodimerización con la subunidad  $\beta$ . Los dominios TAF110, HHR, NERVY intervienen en el reclutamiento de corepresores.

- **La inv(16)(p13;q22), t(16;16)(p13;q22)**

Tanto la inversión pericéntrica como la traslocación del cromosoma 16 se asocian exclusivamente con el subtipo M4 Eo y se consideran de buen pronóstico<sup>83</sup> (Figura 9 a y b); esta anomalía se encuentra en el 8-10% de todos los casos de LMA y en el 20% de los casos de M4<sup>77</sup>. Esta inversión fusiona el gen *CBFB* en 16q22 con el gen que codifica para la cadena pesada larga de la miosina (*MYH11*), el cual se localiza en 16p13<sup>84</sup>. En consecuencia se crea un gen híbrido (*CBFB/MYH11*), cuya proteína quimérica es CBFβ/SMMHC (Figura 9 c). Aunque se han detectado diversas variantes de la proteína de fusión, la más común se compone de los primeros 165 residuos de CBFβ fusionados con 446 residuos de SMMHC, incluyendo su dominio de hélice superenrollada, originando una proteína de 70 kDa<sup>78</sup>.

La proteína CBFβ/SMMHC se puede heterodimerizar con la proteína AML1 más ávidamente (efecto dominante positivo) pero también inhibe la función normal de CBF al impedir estéricamente la unión con el DNA (efecto dominante negativo)<sup>79,85</sup>. De esta manera se secuestra a AML1 en un complejo no funcional en el citoplasma, impidiendo la expresión de sus genes blanco implicados en la hematopoyesis, como: el GM-CSF y su receptor, M-CSFR, el receptor de células T, los antígenos CD2 y CD36, las interleucinas 3, 5 y 6 (IL3, IL5, IL6) y la mieloperoxidasa<sup>78,80</sup>.

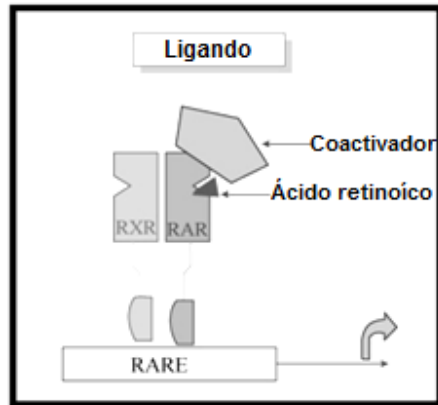


**Figura 9. Rearreglo *CBFβ/MYH11*.** a) Cariotipo parcial que muestra la *inv(16)(p13;q22)*<sup>86</sup>. b) Ideograma que ilustra la inversión del cromosoma 16<sup>47</sup>. c) Esquema que representa la proteína de fusión *CBFβ/SMMHC* con su largo componente de la cadena pesada de la miosina<sup>79</sup>.

### Leucemias con alteraciones en el receptor de ácido retinoico $\alpha$ (RAR $\alpha$ )

El receptor RAR $\alpha$  pertenece a una superfamilia de receptores nucleares con un dominio de unión al DNA y que actúa como un factor de transcripción de genes implicados en la diferenciación mieloide<sup>87,88</sup>.

El RAR $\alpha$  está compuesto por los dominios A-F, se heterodimeriza con el receptor retinoide X (RXR) y a ambos receptores se une el ácido retinoico para regular la transcripción de sus genes blanco<sup>89</sup> (Figura 10). En ausencia del ácido retinoico, el heterodímero RAR $\alpha$ /RXR interactúa con represores transcripcionales<sup>90</sup>. En presencia de ácido retinoico se disocian estos represores y se activa la transcripción de genes que conducen a la diferenciación de la estirpe mieloide.



**Figura 10. Función del receptor RARα<sup>87</sup>.** Complejo activador de la transcripción de los genes blanco de RARα. RXR, receptor retinoide X; RAR, receptor α de ácido retinoico; RARE, elemento de unión a RARα y RXR.

- **La t(15;17)(q22;q21)**

La t(15;17) es una anomalía de buen pronóstico que se encuentra en el 95% de los casos de M3<sup>15</sup> (Figura 12) y que ocasiona un bloqueo en la diferenciación en el estadio de promielocito. El resultado es la fusión del gen del receptor de ácido retinoico α, *RARα* presente en el cromosoma 17, con el gen *PML* (leucemia promielocítica), localizado en el cromosoma 15 y que está involucrado en la apoptosis y en la supresión de tumores, dando lugar al gen híbrido *PML/RARα* en el derivado del cromosoma 15<sup>89</sup> (Figura 11 a).

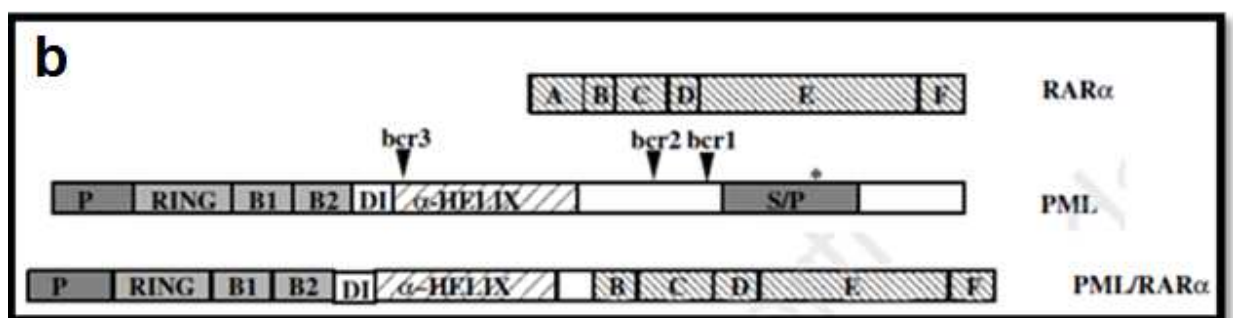
La proteína quimérica inhibe la diferenciación de las células mieloides arrestándolas en la etapa de promielocito, aún en presencia de concentraciones fisiológicas de ácido retinoico. Lo anterior se debe al reclutamiento de complejos de represión transcripcional: N-CoR, DNA-metiltransferasa (DNMT) y HDAC en los promotores de los genes regulados por RARα<sup>91,92</sup>.

La proteína alterada está compuesta por los dominios B a F de *RARα* que mantienen completamente sus funciones y que se fusionan con un número variable de aminoácidos de *PML* en su región NH<sub>2</sub>-terminal<sup>91</sup> (Figura 11 b). Así, *PML/RARα*, al tener los dominios de *PML*, adquiere la capacidad de heterodimerizarse con una nueva molécula de *PML* y de homodimerizarse con

otra proteína PML/RAR $\alpha$ ; además gracias a su porción RAR $\alpha$  se puede heterodimerizar con RXR<sup>87,92</sup>. Por todo lo anterior, el ácido retinoico no se puede unir a RAR $\alpha$  debido al impedimento estérico.

En la t(15;17), el punto de ruptura en el cromosoma 17q está siempre situado en el intrón 2 de *RAR $\alpha$* . Los puntos de ruptura en el cromosoma 15q son diferentes por lo que se producen tres diferentes proteínas de fusión: intrón 6 (*BCR1*) (58%), exón 6 (*BCR2*) (7%) e intrón 3 (*BCR3*) (35%)<sup>88,91,93</sup>.

La t(15;17) responde muy bien al tratamiento con ácido transretinoico (ATRA)<sup>93,94</sup> y es la traslocación cromosómica más común que implica a *RAR $\alpha$*  en las variantes M3 y M3v<sup>15,95</sup>. Sin embargo, existen otros genes que se pueden fusionar con este receptor y ocasionar también LPA. Algunos estudios sugieren que existe una relación entre la morfología de los promielocitos encontrados en la M3 y la traslocación en la que el gen *RAR $\alpha$*  se encuentra implicado<sup>87,96</sup>.



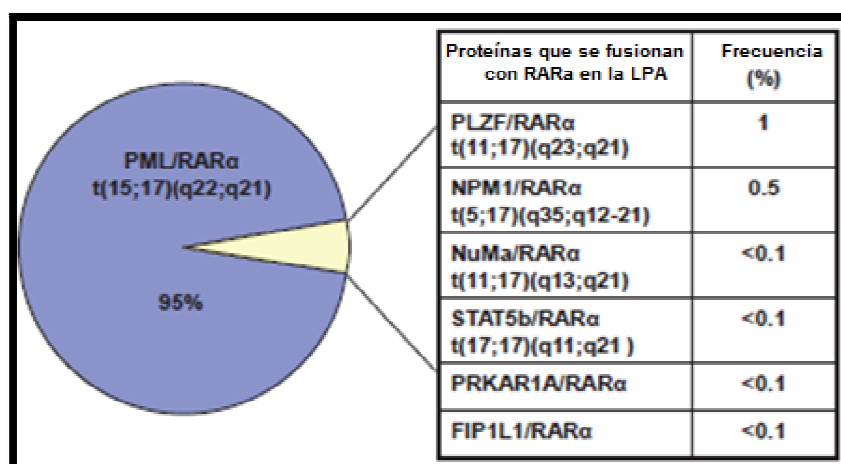
**Figura 11. Traslocación *PML/RAR $\alpha$* .** a) Cariotipo parcial que muestra la t(15;17)(q22;q21). b) Esquema de la proteína de fusión PML/RAR $\alpha$ <sup>87</sup>, sus dominios y sus sitios de ruptura en PML (bcr1, bcr2 y bcr3).

- **La t(11;17)(q23;q21)**

Esta traslocación se presenta en aproximadamente el 1% de todos los casos de LPA<sup>15</sup> (Figura 12). En ella se fusiona el gen *PLZF* codificado en 11q23 con el gen *RARα*, creando el gen híbrido *PLZF/RARα*. *PLZF* es un factor de transcripción con estructura de “dedos de zinc”, el cual se expresa durante las etapas tempranas del desarrollo de las células hematopoyéticas y juega un papel importante en el mantenimiento y supervivencia de los progenitores celulares<sup>87,91</sup>. Esta alteración muestra una morfología celular peculiar (núcleo regular, hipergranular y ausencia de cuerpos de Auer) y es resistente al ATRA<sup>94,96</sup>.

- **La t(5;17)(q35;q21)**

Representa el 0.5% de los casos de LPA<sup>15</sup> (Figura 12). Esta traslocación fusiona el gen *NPM* del cromosoma 5q35 con el gen *RARα*. El gen *NPM* codifica para una fosfoproteína nuclear que transporta material ribosomal entre el nucléolo y el citoplasma y está implicada en la regulación y estabilización de p53 durante condiciones de estrés celular<sup>87,91,97</sup>. Se considera de pronóstico favorable ya que responde al ATRA<sup>93,94</sup>. La morfología celular muestra promielocitos con núcleo irregular, hipergranular y ausencia de cuerpos de Auer<sup>96</sup>.



**Figura 12. Proteínas que se fusionan con RARα en la LPA.<sup>15</sup>**

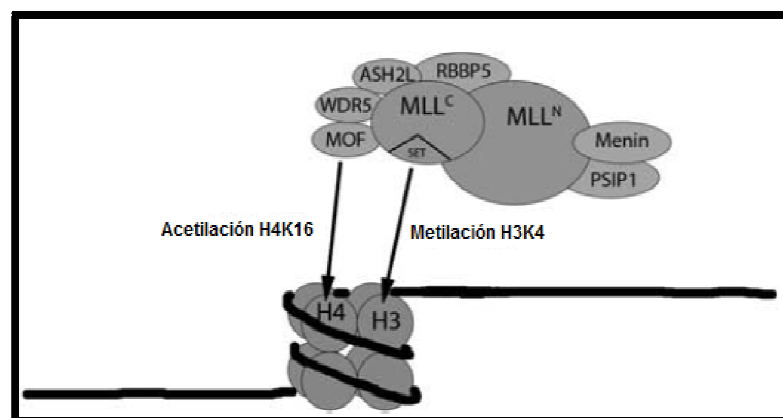


## Leucemias con alteraciones en el gen de “leucemia de linaje mixto”

### (MLL)

- **Alteraciones en la región 11q23**

El gen *MLL* (leucemia de linaje mixto) localizado en 11q23 codifica para una proteína que forma parte de un gran complejo que modifica la cromatina, en el cual el dominio SET de *MLL* tiene una actividad de metil-transferasa de histonas (HMT) y de acetil-transferasa de histonas (HAT)<sup>85,98</sup>. *MLL* se une a los promotores de los genes *HOX* y activa su transcripción<sup>98,99</sup> (Figura 13). En los reordenamientos de *MLL*, el punto de ruptura es altamente conservado (11q23) y todas sus fusiones le confieren una ganancia de función, lo que incrementa la transcripción de los genes *HOX* implicados en la autorenovación y el desarrollo de las células hematopoyéticas<sup>98-100</sup>. Se conocen más de 40 rearrreglos cromosómicos<sup>100</sup> de 11q23, éstos y la del(11q23), que implica la pérdida de genes relacionados con la regulación hematopoyética, son de mal pronóstico, se asocian a periodos de remisión cortos, alta incidencia de recaídas y se asocian a los subtipos M4 y M5<sup>101</sup>. La traslocación más frecuente es la t(9;11)(p22;q23), donde el gen *MLL* gana un dominio de transactivación al fusionarse con el gen *AF9*<sup>85,99-101</sup> (Figura 14).



**Figura 13. El complejo de MLL<sup>100</sup>.** MLL es parte de un gran complejo que modifica la cromatina en el cual el dominio SET de MLL tiene actividad de metil-transferasa de histonas y de acetil-transferasa de histonas.



**Figura 14. Traslocación *AF9/MLL*<sup>102</sup>.** Cariotipo parcial que muestra la t(9;11).

### Otras alteraciones en la LMA

- **La t(9;22)(q34;q11)**

Alrededor del 2% de los pacientes con LMA presentan esta traslocación, los subtipos que la presentan son M1 y M2, además de las leucemias bifenotípicas<sup>5</sup>. El gen *BCR* (*Breakpoint Cluster Region*) codificado en 22q11 se fusiona con el gen *ABL* (Abelson) del 9q34 (Figura 15). El cromosoma 22 alterado que contiene el gen de fusión se llama Ph<sup>74</sup>. El mRNA procesado de *BCR/ABL* contiene el exón b2 o b3 de *BCR* fusionado con el exón a2 de *ABL* (b2a2, b3a2) y es traducido en una proteína de aproximadamente 210 kDa (p210). Si el punto de ruptura es en el exón e1 de *BCR*, se forma e1a2, y una proteína quimérica de 190 kDa (P190)<sup>103</sup>.

La proteína BCR/ABL tiene una actividad de tirosina cinasa que está activa constitutivamente, lo que incrementa la proliferación neoplásica de las células hematopoyéticas<sup>104</sup>.



**Figura 15. Traslocación *BCR/ABL*<sup>105</sup>.** Cariotipo parcial que muestra la t(9;22).

- **La t(1;22)(p13;q13)**

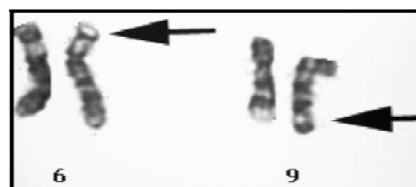
Esta traslocación se asocia al subtipo M7 en niños menores de 3 años, particularmente a aquellos sin SD, su pronóstico es malo<sup>106</sup>. La translocación fusiona el gen *RBM15*, (también conocido como *OTT* (*one twenty-two*)) ubicado en 1p13 con el gen *MKL1* (leucemia megacarioblástica 1 o *MAL*) en la región 22q13, generando la proteína quimérica OTT/ MAL (RBM15/MLK1) en el derivado del cromosoma 22<sup>107</sup> (Figura 16). MAL es una proteína que participa en la transducción de señales del citoesqueleto al núcleo. OTT funciona como corepresor en varias vías de señalización y puede unirse al RNA a través de la interacción con componentes del spliceosoma. La proteína de fusión induce leucemogénesis al activar constitutivamente los genes diana (HOX) de *OTT*<sup>108,109</sup>.



**Figura 16. Traslocación *OTT/MKL1*<sup>23</sup>.** Cariotipo parcial que muestra la t(1;22).

- **La t(6;9)(p13;q34)**

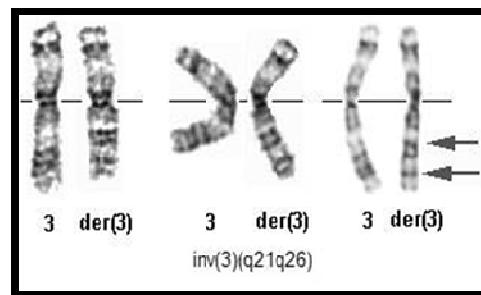
Esta alteración fusiona el gen *DEK* ubicado en 6p13 con el gen que codifica para la nucleoforina *NUP214* (*CAN*) en el 9q34<sup>47</sup>(Figura 17). La proteína de fusión *DEK/NUP214* induce transformación al alterar el crecimiento, el transporte núcleo-citoplasma y la síntesis de proteínas en las células totipotenciales<sup>74</sup>. La morfología es variable, hay basofilia y es de pronóstico desfavorable<sup>17</sup>.



**Figura 17. Traslocación *DEK/NUP214*<sup>74</sup>.** Cariotipo parcial que muestra la t(6;9).

- **La *inv(3)(q21;q26)*, *t(3;3)(q21;q26)***

Se detecta en el 1% de todas las LMA y da lugar a la fusión *EVI1-RPN1*<sup>74</sup>. El gen *EVI1* regula la hematopoyesis, la apoptosis, el crecimiento, diferenciación y proliferación celular, se fusiona con el gen *RPN1* (Riboporina 1), proteína asociada al retículo endoplásmico rugoso (Figura 18). En este reordenamiento, *RPN1* incrementa la expresión del gen *EVI1*<sup>110</sup>.



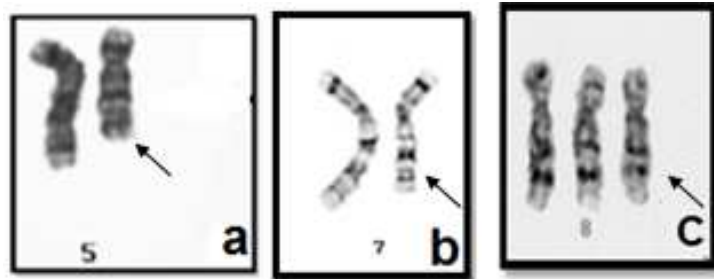
**Figura 18. Traslocación *EVI1/RPN1*<sup>111</sup>.** Cariotipos parciales que muestran la *inv(3)*.

- **Monosomías o deleciones intersticiales y trisomías**

Las monosomías o deleciones del brazo largo de los cromosomas 5 y 7 son de mal pronóstico y se asocian a LMA secundaria a SMD, a t-LMA o a M6, aunque se pueden encontrar en cualquier subtipo<sup>74</sup>. El segmento perdido durante la del(5q) se denomina región de deleción crítica (CDR) y comprende las bandas 5q31-5q32<sup>74</sup>. En él se encuentran genes críticos implicados en la hematopoyesis (*IL-3*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-9*, *GM-CSF* y *el CSF-2*<sup>74</sup>). La pérdida de estos genes en la deleción o en la haploinsuficiencia que se tiene en la monosomía 5 son los que originan el proceso leucémico<sup>112</sup>.

En la monosomía parcial o completa del cromosoma 7 sucede lo mismo que con el cromosoma 5. La mayoría de las deleciones tienen diversos puntos de ruptura aunque el segmento mínimo eliminado es 7q31-7q32<sup>113</sup>. Entre los genes perdidos se encuentra la eritropoyetina<sup>114</sup>.

La trisomía 8 es la anomalía citogenética más frecuente en LMA, t-LMA y ocurre en casi todos los subtipos como anomalía primaria o en un cariotipo complejo. En este cromosoma también se encuentran genes que regulan la hematopoyesis, por lo que el efecto de aumento en la dosis génica descontrola su función<sup>74</sup>.



**Figura 19. Deleciones y trisomía en LMA<sup>74</sup>** a) Cariotipo parcial que muestra la deleción 5q. b) Cariotipo parcial que presenta la deleción 7q. c) Cariotipo parcial con trisomía 8.

- **Cariotipo complejo**

El cariotipo complejo se define por la presencia de una clona con al menos 3 aberraciones cromosómicas no relacionadas en ausencia de la t(8,21), inv(16)/t(16;16) y la t(15;17)<sup>115</sup>. Las LMA con cariotipo complejo representan el 10-15%<sup>116</sup>, su incidencia aumenta con la edad, con poca frecuencia tienen anomalías cromosómicas balanceadas y predominan las pérdidas cromosómicas sobre las ganancias. Las deleciones frecuentes son: 5q, 17p, 7q, 18q, 16q, 17q, 12p, 20q, y entre las ganancias destacan: del 8q, 11q, 21q, 22q, 1p, 9p, y 13q<sup>74</sup>.

- **LMA con cariotipo normal (CN-LMA)**

Alrededor de un 45-50%<sup>19,116</sup> de los pacientes con LMA no presenta anomalías cromosómicas. Aunque es posible que el cariotipo normal se atribuya en algunos casos a la inexistencia de células malignas dividiéndose *in*

*vitro*, el hecho es que en muchos pacientes, las mutaciones moleculares pueden estar presentes.

La Tabla 6 relaciona los tipos de anomalías citogenéticas que afectan en la LMA y el pronóstico asociado a ellas.

**Tabla 6. Pronóstico de LMA relacionado con la citogenética<sup>19</sup>**

<b>Grupo Pronóstico</b>	<b>Anormalidad cromosómica</b>
<b>Favorable</b>	inv(16) o t(16;16) (p13;q22)
	t(8;21)(q22;q22)
	t(15;17)(q22;q21)
<b>Intermedio</b>	Cariotipo normal
	t(6;9)(p23;q34)
<b>Desfavorable</b>	del(5)/-5, del(7)/-7
	t(11q23)
	cariotipo complejo (>3)
	inv(3q)
	t(9;22)(q34;q11)

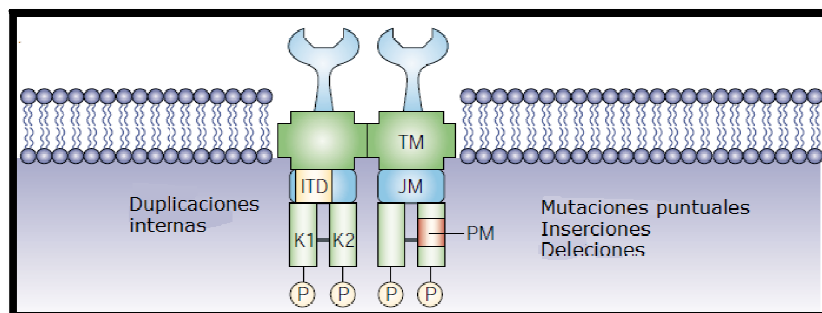
#### **4.5. Alteraciones moleculares**

Las alteraciones moleculares también han sido detectadas en pacientes con LMA. Algunas de esas mutaciones han sido descritas en la nueva clasificación de la OMS (2008)<sup>18</sup>. La identificación de mutaciones recurrentes ha permitido entender mejor la heterogeneidad en la respuesta al tratamiento de los pacientes con CN-LMA.

- **Mutaciones en el gen *FLT3***

Las mutaciones en el gen *FLT3* se encuentran en el 23% de todos los casos de LMA y en el 40% de todos los casos de LMA con cariotipo normal; considerándose de mal pronóstico<sup>117,118</sup>. Es el gen más comunmente mutado en LMA<sup>11</sup> y se localiza en 13q12<sup>119</sup>.

*FLT3* codifica para un receptor de tirosina cinasa que está normalmente expresado en la membrana de los progenitores mieloides y cuando se une a su ligando, activa la proliferación y supervivencia celulares<sup>10</sup>. Las dos mutaciones en *FLT3* se encuentran en el dominio yuxtamembranal (JM) y en el dominio de tirosina cinasa (TKD). Las duplicaciones internas en tándem (ITD) de 3-400 pares de bases ocurren en el dominio JM, se presentan en el 30% de los casos con CN-LMA y son más frecuentes que las mutaciones puntuales en TKD<sup>11</sup>. La consecuencia es la activación constitutiva de este receptor de tirosina cinasa y la ventaja de proliferación y supervivencia en la célula mutada<sup>11,120</sup>.



**Figura 20. Estructura y localización de las mutaciones en *FLT3*<sup>120</sup>.** JM, dominio yuxtamembranal TM, dominio transmembrana; K1 Y K2, primer y segundo dominio tirosina cinasa; ITD, duplicaciones internas en tándem; PM, mutaciones puntuales; P, fósforo.

- **Mutaciones en el gen *NPM1***

El gen de la nucleofosmina se encuentra en 5q35<sup>119</sup>, codifica para una fosfoproteína nuclear que está implicada en la regulación del ciclo celular y en la respuesta al estrés celular. Entre sus funciones están: interacción con p53 controlando la proliferación celular y la apoptosis, mantenimiento de la estabilidad genómica al controlar la reparación del DNA y la duplicación del centrosoma durante la mitosis, juega un papel importante en la biogénesis ribosomal<sup>121</sup>. Esta proteína se transporta entre el núcleo y el citoplasma; sin embargo, cuando está mutada permanece solo en el citoplasma. Los pacientes con *NPM1* mutada, tienen un mejor pronóstico que aquellos con *FLT3-ITD*<sup>122</sup>.

- **Mutaciones en el gen *CEBPA***

Codifica para un factor de transcripción implicado en la diferenciación de las células hematopoyéticas<sup>116</sup>. Las mutaciones en *CEBPA* se encuentran en el 10-18% de los pacientes con CN-LMA y ocasionan leucemia por bloqueo en la diferenciación granulocítica<sup>10,116</sup>. Esta mutación predomina en las variantes M1 y M2<sup>116</sup>.

- **Mutaciones en el gen *GATA 1***

Los niños con SD que desarrollan el subtipo M7 presentan una mutación en el gen *GATA1* ubicado en el cromosoma X y que participa como regulador transcripcional de la diferenciación megacariocítica. Las deleciones, inserciones y mutaciones puntuales en este gen generan un codón de paro, por lo que se pierde la parte NH2-terminal (dominio de actividad transcripcional) y se bloquea la diferenciación megacariocítica<sup>24</sup>. Las mutaciones en *GATA1* confieren un aumento en la sensibilidad a la citarabina al disminuir la expresión de citidina deaminasa, lo cual posiblemente explica la mejor respuesta al tratamiento en los niños con el síndrome de Down y LMA M7 cuando se tratan con citarabina<sup>24</sup>.



## 5. Tratamiento

El tratamiento de la LMA (a excepción del subtipo M3) se basa principalmente en quimioterapia y está dividido en terapia de inducción y terapia de post-remisión<sup>123</sup>. El objetivo de la terapia de inducción es reducir el número de células leucémicas a niveles indetectables, es decir, alcanzar la remisión completa. La RC se alcanza cuando se eliminan los signos y síntomas de la enfermedad, se tiene una cuenta de plaquetas de  $30-100 \times 10^9/L$ , una cuenta igual o mayor de  $1 \times 10^9/L$  de neutrófilos y la presencia del 5% de blastos en la médula ósea<sup>6</sup>.

La terapia de inducción sigue un esquema denominado "7+3", donde la citarabina (Ara-C) es administrada de forma continua durante los primeros 7 días y, la antraciclina (daunorubicina o idarubicina) durante los tres días posteriores. Aproximadamente, el 50-70% de los pacientes logra la remisión con este protocolo de administración<sup>124</sup>.

El tiempo de duración de la RC depende del pronóstico de la leucemia. La RC tiene que ir seguida de una terapia de post-remisión para evitar la recaída y eliminar el porcentaje de células leucémicas residuales<sup>123</sup>. La terapia de post-remisión (6-12 meses) puede consistir en quimioterapia de consolidación (dosis similares a la terapia de inducción), quimioterapia de intensificación (dosis más elevadas), quimioterapia de mantenimiento (bajas dosis de quimioterapia administrada durante largos periodos de tiempo) o trasplante alogénico o autólogo de células progenitoras hematopoyéticas.<sup>6</sup>

En el tratamiento de la LMA se debe diferenciar a los pacientes según la edad, mayores o menores de 60 años, y también se debe individualizar el tratamiento en función de factores pronósticos como son la citogenética y las alteraciones moleculares. La mediana de supervivencia de la LMA sin tratamiento es de aproximadamente 2 meses. Alrededor del 25-40% de los pacientes con LMA tratados con quimioterapia continúan vivos a los 5 años del diagnóstico<sup>6</sup>.

La LPA es un subtipo de LMA con características clínicas, biológicas y moleculares diferentes. En la Tabla 7 se presentan los genes que pueden traslocarse con RAR $\alpha$  y ocasionar LPA, en ella se observa que algunos rearrreglos son sensibles al ATRA, otros no. En la M3 positiva a *PML/RAR $\alpha$* , durante la terapia de inducción se administran dosis farmacológicas de ATRA combinado con idarubicina<sup>11,123</sup>. El ATRA causa un cambio conformacional en la proteína PML/RAR $\alpha$  liberando los corepresores y provocando la diferenciación y posterior muerte por apoptosis de las células leucémicas<sup>89,94</sup>. El trióxido de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) también se usa como terapia, causando los mismos resultados que el ATRA<sup>125</sup>.

**Tabla 7. Sensibilidad al ATRA de los rearrreglos encontrados en la LPA<sup>93</sup>**

<b>Gen</b>	<b>Localización</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función</b>	<b>Sensible al ATRA</b>
<b><i>PML</i></b>	15q22	Leucemia promielocítica	Apoptosis	Sí
<b><i>PLZF</i></b>	11q23	Leucemia promielocítica de dedos de zinc	Morfogénesis	No
<b><i>NPM</i></b>	5q35	Nucleofosmina	Biogénesis ribosomal	Sí
<b><i>NuMA</i></b>	11q13	Aparato mitótico nuclear	Compactación de la cromatina	Sí
<b><i>STAT5b</i></b>	17q11	Transductor de señales	Factor de transcripción que regula: EPO, G-CSF, IL2, IL3 e IL7	No

En los ancianos, el metabolismo de las drogas citotóxicas puede estar disminuido debido a una falla renal relacionada con la edad, lo cual expone al paciente a niveles mayores de medicamento, a mayor toxicidad y los hace menos capaces de resistir la intensidad de la quimioterapia<sup>25</sup>.

El gen *MDR-1* se encuentra en 7q y codifica para una glicoproteína-p (Pgp) que funciona como una bomba de flujo dependiente de ATP que disminuye la concentración intracelular de los fármacos y permite que las células leucémicas sobrevivan a dosis letales de agentes citotóxicos<sup>126</sup>. Se ha demostrado que en los ancianos existe una alta tasa de expresión de Pgp, lo cual afecta el pronóstico en estos pacientes<sup>28</sup>.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Generales

- Realizar el estudio citogenético de pacientes con diagnóstico clínico de LMA *de novo* que llegaron al LAOH durante el periodo comprendido entre Enero del 2012 y Septiembre del 2012, identificar las alteraciones cromosómicas y correlacionarlas con el subtipo de LMA a través del análisis morfológico de los frotis de la médula ósea.
- Evaluar por medio de frotis la morfología celular de las muestras de médula ósea sin aditivo de pacientes con diagnóstico clínico de LMA *de novo*, establecer el subtipo morfológico y correlacionarlo con el diagnóstico de recepción en el LAOH.

#### 2. Particulares

- Correlacionar la calidad y celularidad de las muestras de médula ósea en heparina que se mandaron al LAOH para la realización del cariotipo, con el padecimiento del paciente y con el resultado del estudio citogenético.
- Establecer el tiempo de cultivo más adecuado para obtener el mayor índice mitótico en las muestras para cariotipo de pacientes con diagnóstico de LMA.

#### IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este trabajo se recopilaron muestras de médula ósea con anticoagulante heparina de pacientes con diagnóstico clínico de LMA *de novo*, así como los frotis de médula ósea sin aditivo que el hematólogo elaboró en el momento en el que extrajo la muestra y que le sirvieron para establecer su diagnóstico.

También se realizaron los frotis de la muestra recibida de médula ósea en heparina y se tiñeron con colorante de Wright. El frotis enviado por el hematólogo y el frotis que se elaboró en el laboratorio fueron analizados al microscopio por dos revisores, los cuales evaluaron la celularidad, identificaron la morfología y el subtipo de LMA. Además se realizó el conteo de las células y se capturaron algunas imágenes de cada caso.

Paralelamente, la muestra de médula ósea en heparina se procesó por técnicas convencionales (con solución hipotónica, colchicina y lavados con fijador de Carnoy) para obtener el cariotipo mediante técnica directa y cultivos de 12, 24, 48 y 72 horas en medios RPMI 1640 o *Marrow Max*.

De cada caso se gotearon laminillas y se tiñeron con colorante Giemsa para observar y registrar el índice mitótico. Para los casos con buen índice se gotearon nuevas laminillas, se bandearon por técnica GTG (enzima tripsina y el colorante Giemsa). Las laminillas bandeadas, se secaron y se montaron con resina y un cubreobjetos.

Para el análisis cromosómico se analizó mínimo de 20 metafases, el resultado se reportó de acuerdo a las reglas internacionales (ISCN, 2009 y 2013). Adicionalmente, se capturaron algunas metafases en un equipo automatizado (*CytoVision*®).

## 1. Pacientes

En el LAOH se recibieron 45 muestras de médula ósea en heparina de pacientes con diagnóstico clínico de LMA *de novo*, durante el periodo de Enero-Septiembre del 2012. De estos pacientes, 36 cuentan con el análisis morfológico de la médula ósea sin aditivo y, 33 tienen resultado citogenético, ya que tres casos no fueron valorables por cariotipo a causa de muestra sin células o ausencia de metafases. Los 9 pacientes restantes no se incluyen en este trabajo debido a que en el análisis morfológico no se encontraron blastos ni otras características propias del diagnóstico de la LMA.

Los 36 casos estudiados contaban con los frotis directos de la médula ósea elaborados por el hematólogo, el cual además envió al LAOH la muestra de médula ósea en heparina para el análisis citogenético. Adicionalmente, de esta muestra de médula ósea en heparina se realizaron frotis. Los pacientes incluidos en el trabajo tenían edades de entre un rango de 1 y 80 años.

## 2. Muestras

Las muestras fueron de médula ósea con anticoagulante heparina de pacientes con diagnóstico de LMA *de novo*. A las muestras que llegaron el mismo día de la extracción se les realizó el procesamiento por técnica directa. Los cultivos de 12, 24, 48, 72 y 96 horas se realizaron en los casos en los que fue posible o la cantidad de muestra fue suficiente.

### 3. Material y métodos

- **Morfología: Reactivos**

1. Colorante de Wright preparado, *MERCK®*
2. Amortiguador de fosfatos, *Buffer Gurr tablets®*, pH= 7.0 (1 pastilla /1000 mL agua desionizada)

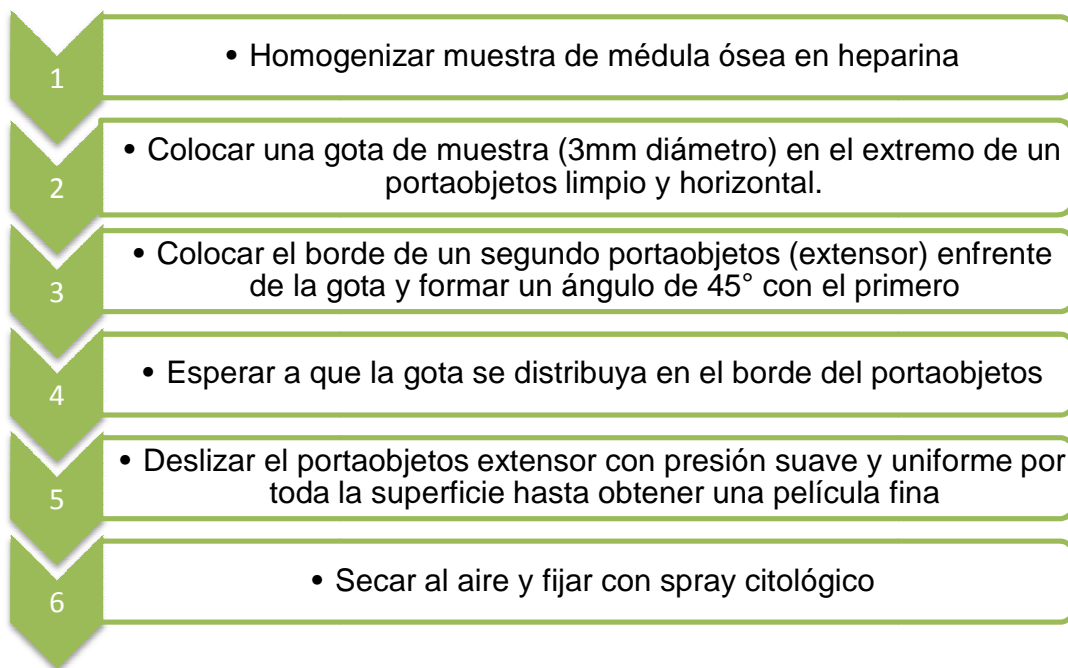
- **Cariotipo: Reactivos**

1. Colchicina 0.02%
2. Solución hipotónica de KCl [0.075 M], (2.8 g de KCl / 500 mL de agua desionizada)
3. Fijador de Carnoy, (MeOH/Ácido acético, 3:1)
4. Colorante Giemsa preparado, *MERCK®*, (3mL de colorante/ 47 mL de buffer de fosfatos pH 6.8)
5. Amortiguador de fosfatos, *Buffer Gurr tablets®*, pH= 6.8 (1 pastilla /1000 mL de agua desionizada)
6. Tripsina 2%
7. Resina al 60%, *MERCK®*
8. Medio de cultivo RPMI-1640: *Sigma®*, *GIBCO®*, *Hyclone®* suplementado con suero y antibiótico.
9. Medio de cultivo Marrow Max-12260: *GIBCO®*, *Invitrogen®*

### 3.1. Morfología: Preparación de laminillas y Tinción de Wright

Se realizó el extendido de una gota de muestra de médula ósea en heparina sobre un portaobjetos (Figura 21), seguido de la fijación de la muestra, posterior tinción de Wright y análisis microscópico. Los frotis directos de la médula, elaborados por el hematólogo también se fijaron, tiñeron y analizaron. La técnica completa se muestra a continuación:

- **Preparación del frotis de médula ósea en heparina**





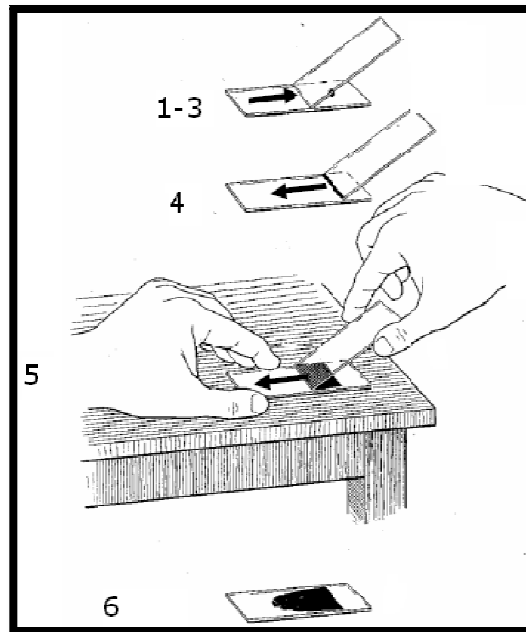
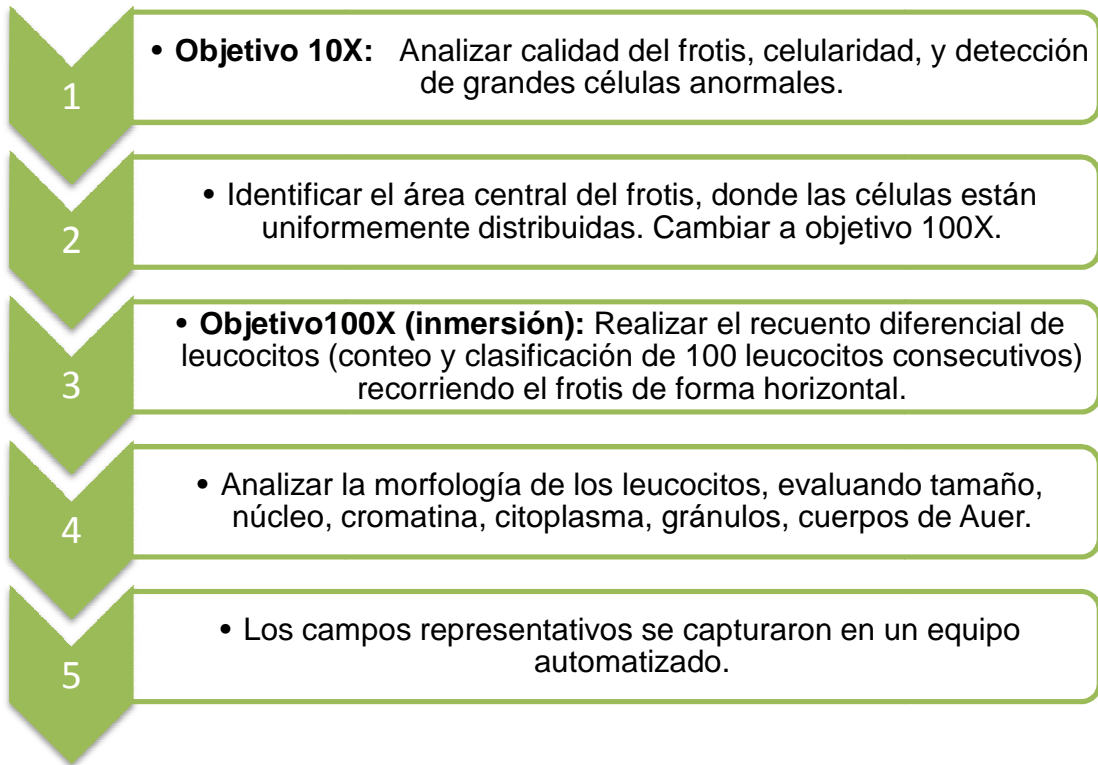


Figura 21. Elaboración de un frotis de médula ósea<sup>127</sup>

- **Tinción de Wright**

- 1 • Colocar el frotis en un soporte de tinción.
- 2 • Cubrir el frotis con 1-2 mL de colorante de Wright y dejar actuar por 8 min.
- 3 • Agregar 1-2 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.0, soplar para homegenizar hasta que la mezcla adquiera un brillo verde metálico.
- 4 • Dejar actuar por 8 minutos.
- 5 • Lavar con agua corriente, secar al aire y observar al microscopio.

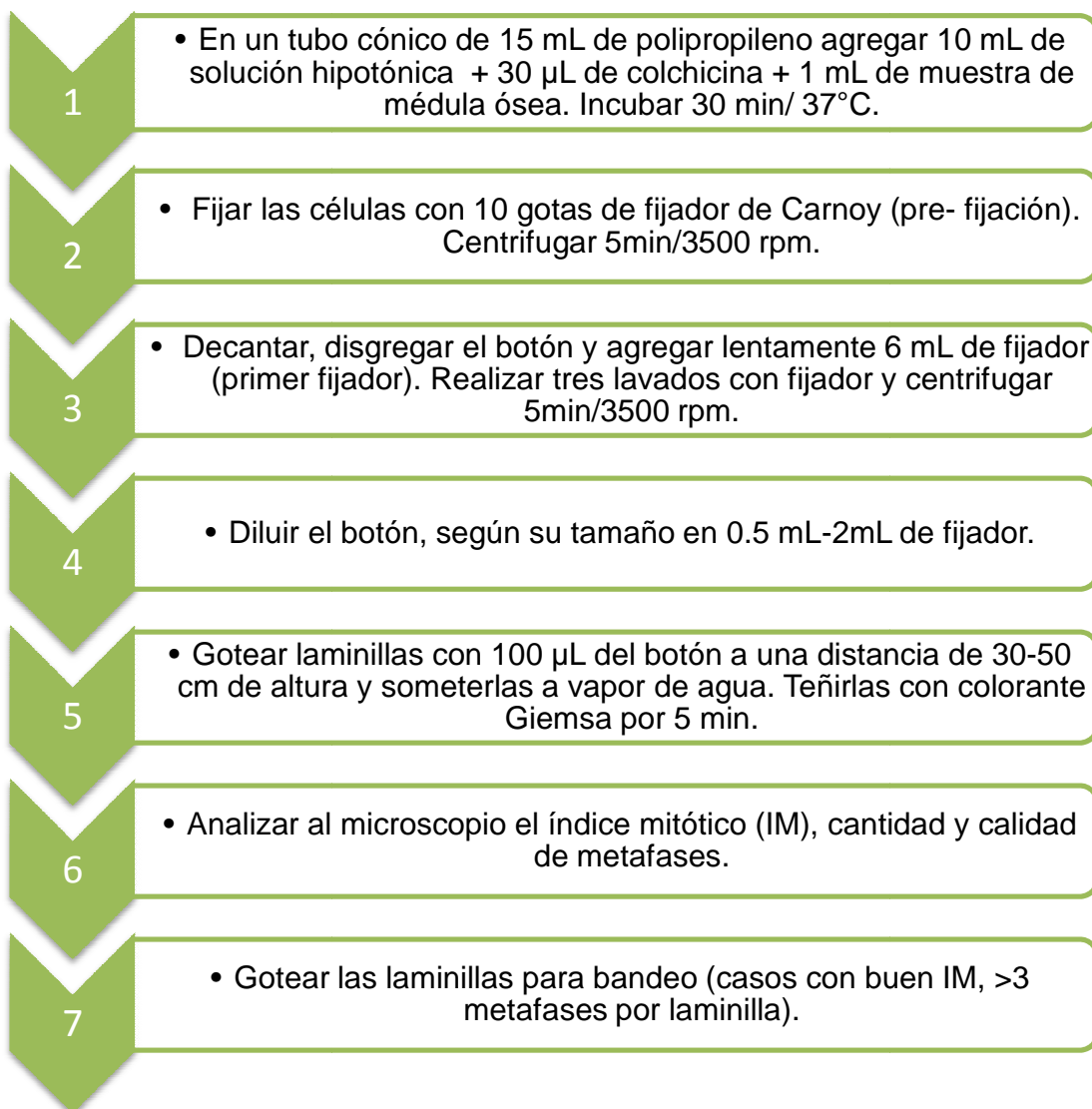
- **Análisis microscópico**



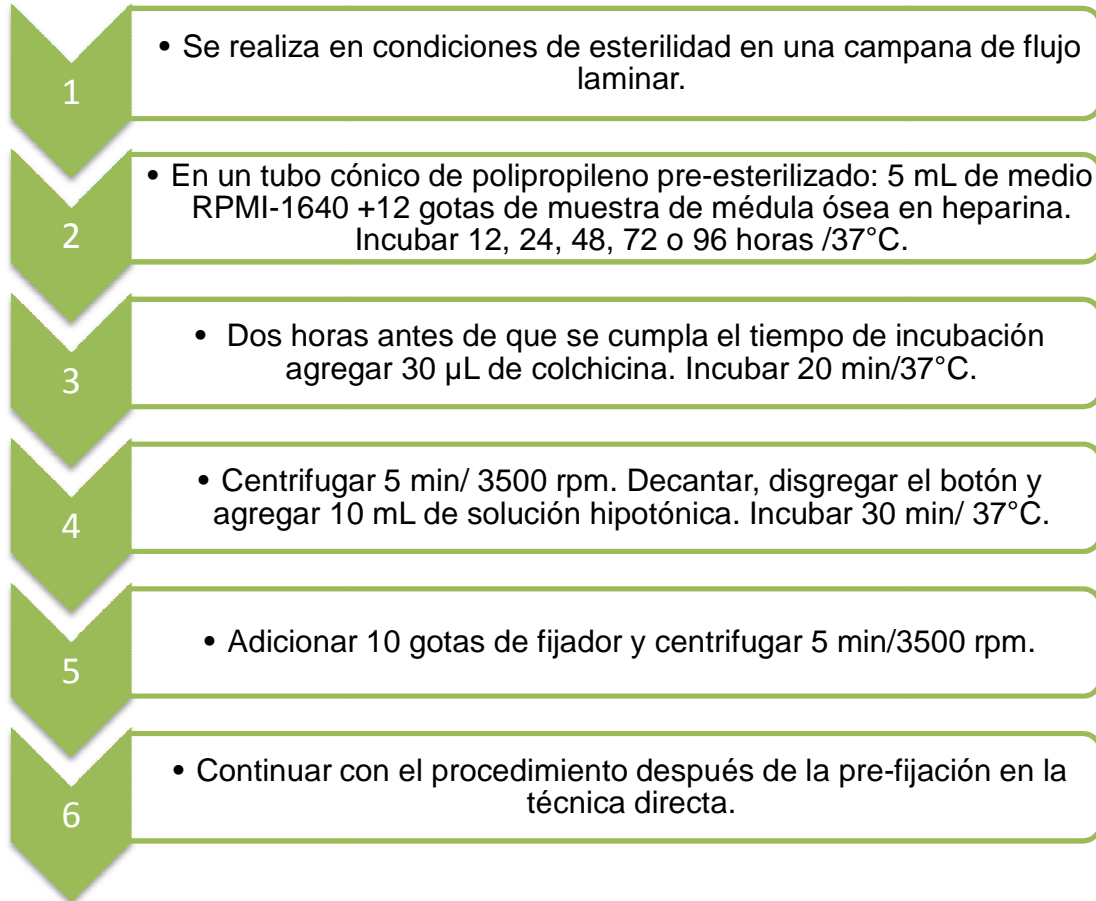
### 3.2. Cariotipo: Cultivo y cosecha de muestras de médula ósea

Para el análisis citogenético, las muestras de médula ósea en heparina se procesaron mediante técnica directa y cultivos de 12, 24, 48 y 72 horas; se gotearon laminillas y se maduraron para su posterior bandeo GTG (Figura 22). La técnica completa se presenta a continuación:

- **Técnica directa**

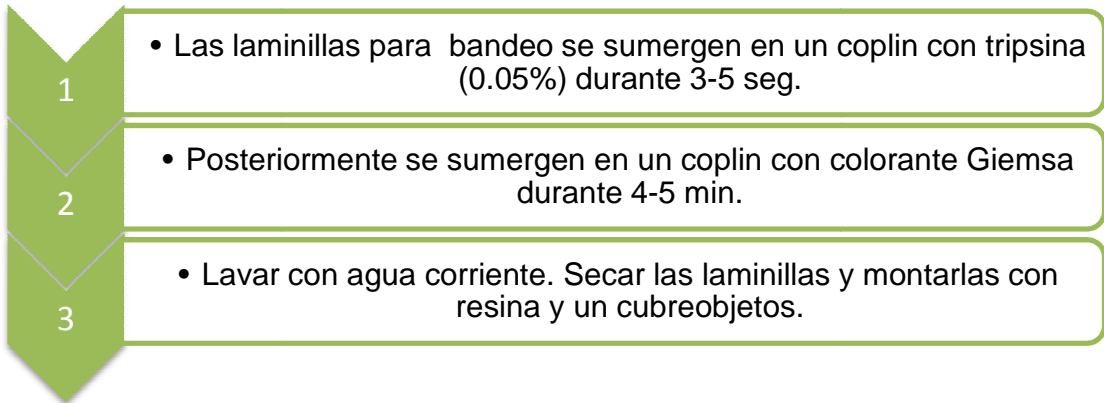


- **Cultivos de 12, 24, 48, 72 y 96 horas**

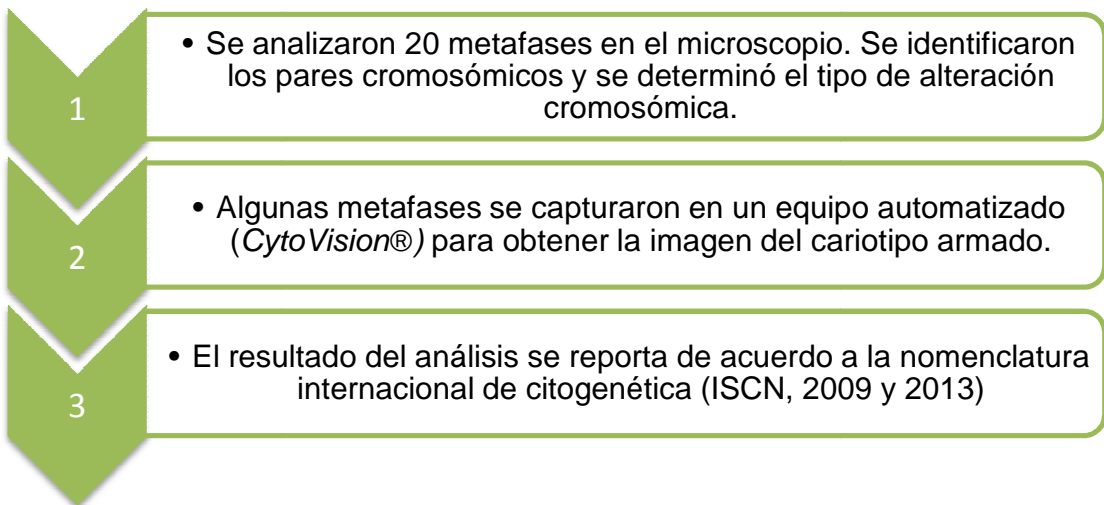


NOTA: Para los cultivos de 12 y 24 horas se utilizó medio *Marrow Max*. El cultivo de 12 horas se incubó además con 8 µL de colchicina/ 37°C, después de ese tiempo se continuó la técnica con el paso 4.

### 3.3. Tinción de bandas G



### 3.4. Análisis cromosómico



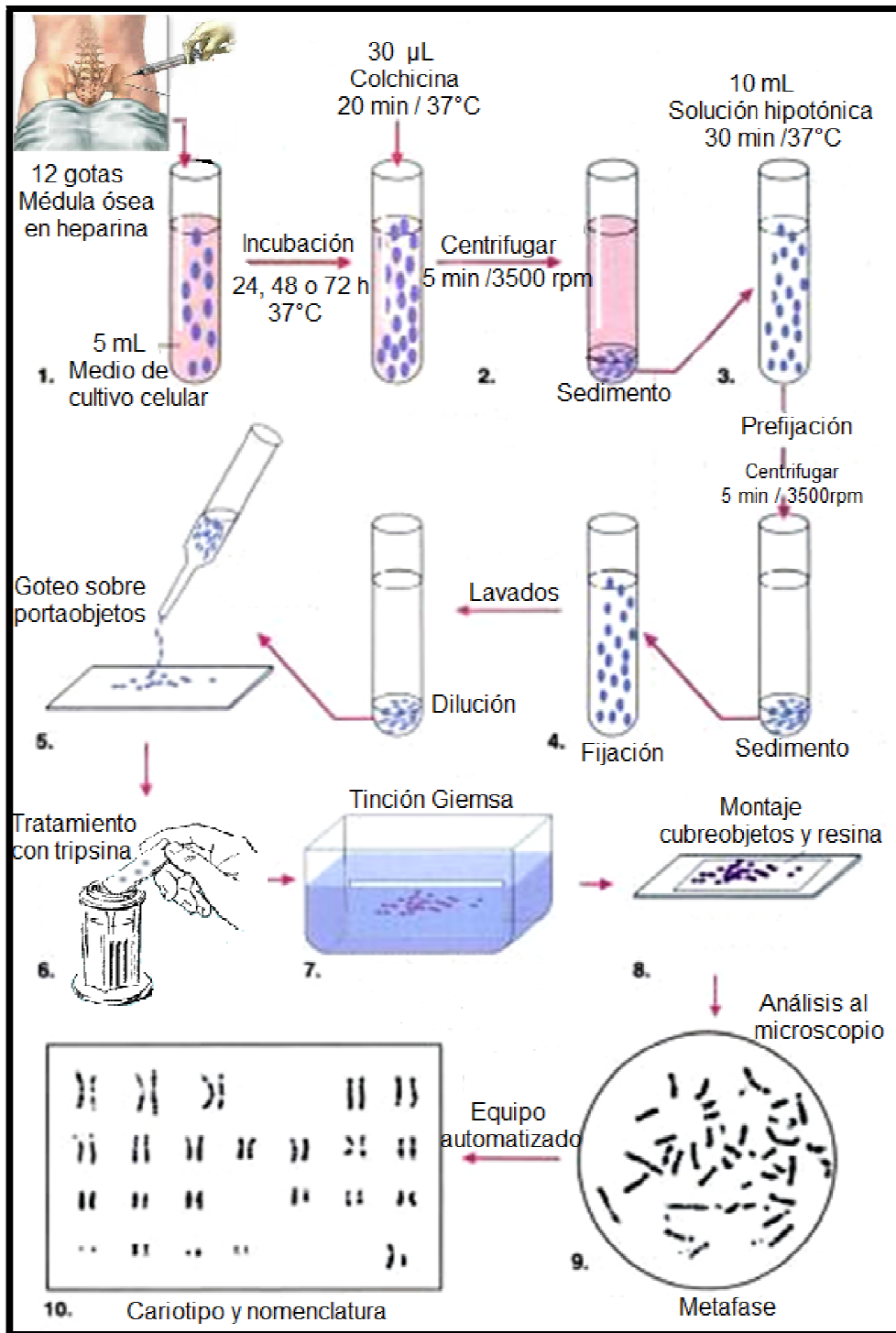


Figura 22. Procesamiento de la muestra de médula ósea para obtener el cariotipo<sup>128</sup>

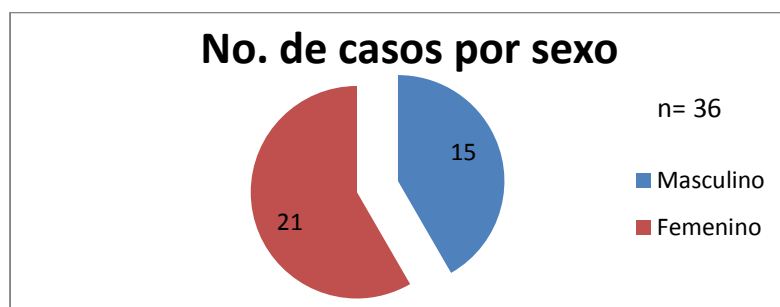
## V. RESULTADOS

Se incluyeron 36 pacientes y la mediana de edad fue de 35 años, encontrándose el mayor número de casos en las décadas de los 31-40 años (7 casos) y de los 41-50 años (7 casos). Para el caso 29, no se tuvo el dato de la edad de la paciente. Los rangos de edades y el número de casos se encuentran en el Gráfico 1.



**Gráfico 1. Casos clasificados por grupo etario**

El Gráfico 2 muestra que de los 36 casos estudiados, 15 corresponden a individuos del sexo masculino y 21 casos corresponden a individuos del sexo femenino. De esta manera, la relación masculino/femenino fue de 0.71.

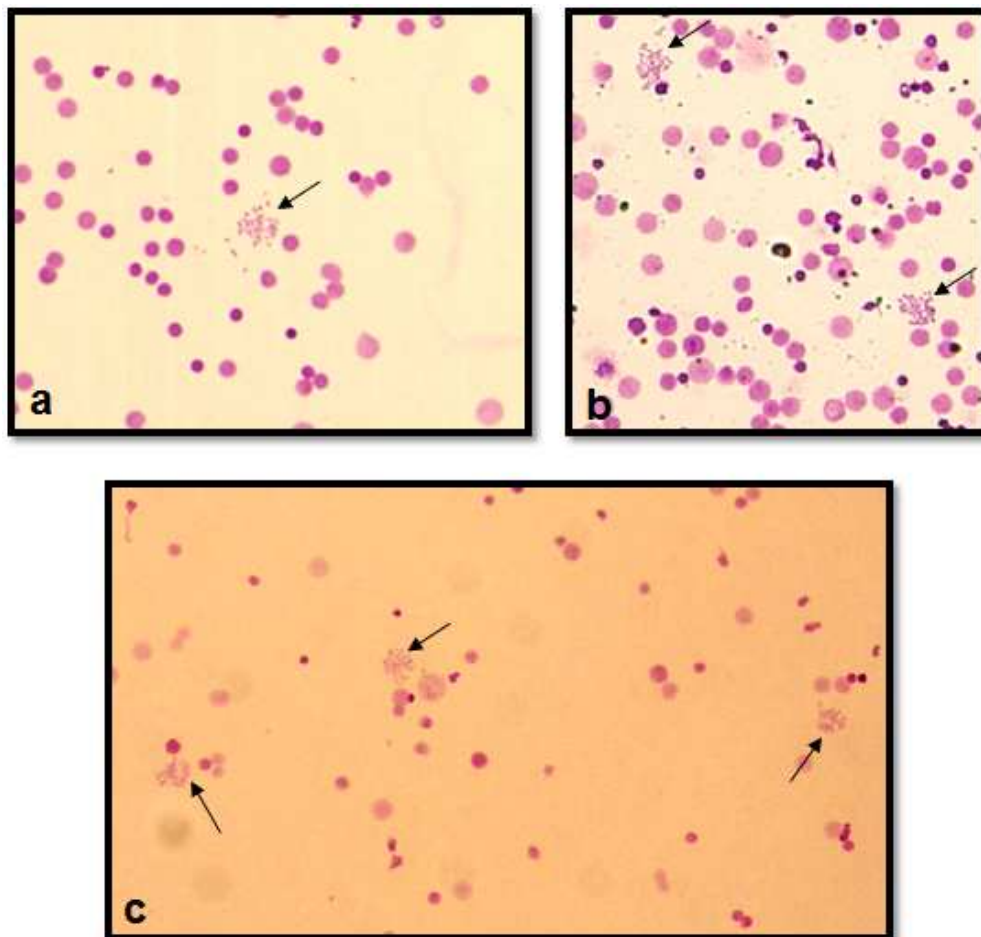


**Gráfico 2. Género de los casos estudiados**

- **Índice mitótico**

Se procesaron 36 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LMA *de novo*. En los casos en los que fue posible o la cantidad de muestra fue suficiente se realizaron los procesamientos por técnica directa y cultivos (12, 24, 48, 72 y 96 horas). 3 muestras no presentaron crecimiento en ninguno de los procedimientos realizados a causa de muestra sin células o ausencia de metafases.

El índice mitótico conseguido en los 33 casos valorables se evaluó de acuerdo al número de metafases encontradas por campo durante la observación con el objetivo de 10X, tal como se muestra en la Figura 23.



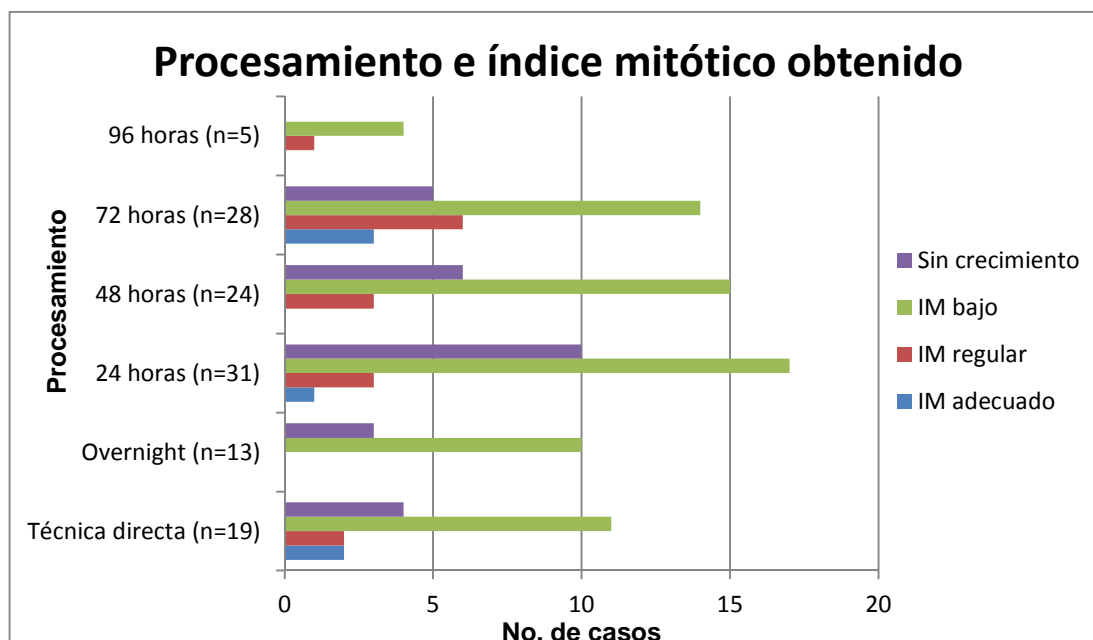
**Figura 23. Índice mitótico, objetivo 10x.** a) Índice mitótico bajo (1 metafase por campo); b) índice mitótico regular (2 metafases por campo); c) índice mitótico adecuado (3 metafases por campo). Las metafases se indican por las flechas.



La Tabla 8 y el Gráfico 3 indican el tipo de procesamiento realizado (técnica directa y cultivos), el número de casos en los que se realizó cada uno y el porcentaje que de éstos consiguió un índice mitótico adecuado, regular, bajo o sin crecimiento.

**Tabla 8. Porcentaje e índice mitótico obtenido en cada procedimiento**

Procesamiento	# realizado	Índice mitótico			Sin crecimiento
		Adecuado	Regular	Bajo	
96 horas	5	Ninguno	20%(1)	80%(4)	Ninguno
72 horas	28	11%(3)	21%(6)	50%(14)	18%(5)
48 horas	24	Ninguno	13%(3)	63%(15)	24%(6)
24 horas	31	3%(1)	10%(3)	55%(17)	32%(10)
12 horas	13	Ninguno	Ninguno	77%(10)	23%(3)
Técnica Directa	19	11%(2)	11%(2)	57%(11)	21%(4)



**Gráfico 3. Procesamiento e índice mitótico obtenido. IM, índice mitótico**

Aunque cada procedimiento se llevó a cabo en diferente número de casos, en la tabla anterior se puede observar que los cultivos de 24 y 72 horas se evaluaron en un número similar de pacientes. De estos dos cultivos, el de 24 horas obtuvo los resultados más desfavorables, al obtener los porcentajes más bajos de índice mitótico adecuado y regular, así como el más alto porcentaje de cultivos sin crecimiento. El cultivo con mejores resultados fue el de 72 horas (únicamente no fue probado en 5 casos) ya que consiguió los porcentajes más altos de índice mitótico adecuado y regular con el 11% y el 21% respectivamente.

- **Análisis citogenético y morfológico**

El análisis cromosómico fue viable en 33/36 muestras (92%), en 3 casos el cariotipo no fue viable debido a contaminación de la muestra o a la ausencia de células.

Asimismo, se realizó el análisis morfológico de los 36 casos, el cual consistió en la evaluación y conteo celular del frotis de médula ósea sin aditivo elaborado por el hematólogo y del frotis de la médula ósea en heparina recibida en el laboratorio para el análisis cromosómico.

Los resultados se muestran en la Tabla 9, la cual contiene la información de la edad y sexo de cada paciente, el diagnóstico de recepción, el resultado citogenético y el subtipo de LMA identificado en cada frotis.

**Tabla 9. Resultados de cariotipo e interpretación morfológica de los frotis de médula ósea sin aditivo y médula ósea con heparina**

Caso	Edad (años) / Género	Dx. de recepción	Citogenética	Morfología médula ósea sin aditivo	Morfología médula ósea con heparina
1	13 / F	M4	46, XX, i(11)(q10) [5] / Poliploidía (>50 cromosomas) [5] / 46, XX [15]	M4	M4
2	35 / F	M4	46, XX, del (11)(q23) [6] / 46, XX [14]	M4	M4
3	77 / F	M4	92, XXX [8] / 69, XXX [10] / 46, XX [8]	<b>M5</b>	<b>M4</b>
4	17 / F	M2	46, XX [22]	M1	M1
5	31 / M	M1	46, XY [20]	M1	NV
6	1 / F	M7	48-58, XX [10] / Poliploidía (>70 cromosomas) [4] / 46, XX [12]	M7	M7
7	29 / M	M3	46, XY [24]	M3	M3
8	28 / F	M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21) [3] / Hipodiploidía (36-43 cromosomas) [12] / 46, XX [5]	M3	M3
9	35 / F	M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21) [10] / 46, XX [12]	M3	M3
10	31 / F	M3	46, XX, t(15;17)(q22;q21) [15] / 46, XX [10]	M3	M3
11	20 / M	M2	Hipodiploidía (36-44 cromosomas) [17] / 46, XY [5]	<b>M4</b>	<b>M1</b>
12	46 / M	M4	42-44, XY, -2, -16, -17, -18 [16] / 46, XY [4]	M4	M4

F, femenino; M, masculino; NV, no valorable; [ ] número de metafases identificadas.

Los subtipos morfológicos en negritas resaltan los casos sin correlación entre ambos tipos de frotis.

(Continuación) Tabla 9. Resultados de cariotipo e interpretación morfológica de los frotis de médula ósea sin aditivo y médula ósea con heparina

Caso	Edad / Sexo	Dx. de recepción	Citogenética	Morfología Médula ósea sin aditivo	Morfología médula ósea con heparina
13	52/ M	LAM	46, XY [20]	M4	M4
14	45/ F	M4	Hipodiploidía (38-44 cromosomas) [13] / 46, XX [12]	<b>M4</b>	<b>M5</b>
15	45/ F	M5	46, XX [27]	M4	M4
16	5 / F	LAM	45, XX, -7 [6] / 46, XX [20]	<b>M7</b>	<b>M5</b>
17	25/ F	M3	46, XX, t(15;17)(q22q12) [4] / 46, XY [19]	M3	M3
18	4/ M	M3	47, XY, +8, t(15;17)(q22;q12) [3] / 46, XY, t(15;17)(q22;q12) [7] / 46, XY [14]	M3	M3
19	21/ M	M2	46, XY [18]	M4	M4
20	18/ F	M2	46, XX [27]	<b>M2</b>	<b>M5</b>
21	13 / F	LAM	46, XX [25]	M6	M6
22	38/ F	M2	46, XX [24]	M5	M5
23	60/ M	M1	46, XY [25]	M2	M2
24	35/ F	M3	46, XX [22]	M3	M3

F, femenino; M, masculino; [ ] número de metafases identificadas.

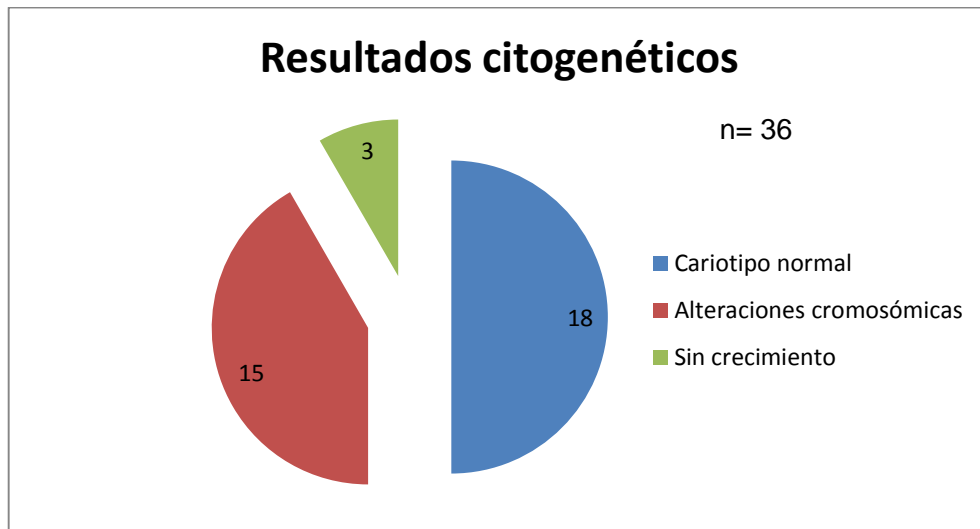
(Continuación) Tabla 9. Resultados de cariotipo e interpretación morfológica de los frotis de médula ósea sin aditivo y médula ósea con heparina

Caso	Edad / Sexo	Dx. de recepción	Citogenética	Morfología Médula ósea sin aditivo	Morfología médula ósea con heparina
25	40/ M	LAM	46, XY, del(5)(q13;q33) [7] / 46, XY, del (5)(q13;q33), der(15q-) [13] / 46, XY [5]	<b>M4</b>	<b>M5</b>
26	48/ M	M2	47, XY, +3 [4] / 46, XY [20]	M5	M5
27	16/ F	M3	46, XX [20]	M3	M3
28	57/ F	M1	46, XX [30]	M7	NV
29	? / F	M2	46, XX [30]	M5	M5
30	80/ F	M4 vs M6	46, XX [25]	<b>M4</b>	<b>L1</b>
31	21/ M	M3	46, XY [26]	M3	M3
32	56/ F	M4	46, XX [20]	M2	NV
33	50/ M	M5	46, XY [20]	<b>M4</b>	<b>M5</b>
34	67/ M	M2	NV	M2	M2
35	44/ M	LAM	NV	M6	M6
36	42/ M	M2	NV	M2	NV

F, femenino; M, masculino, NV, no valorable; [ ] número de metafases identificadas.

- **Análisis citogenético**

El cariotipo fue viable en el 92% de los casos (33/36 muestras). Dieciocho pacientes (55%) tuvieron un cariotipo normal y 15 casos (45%) tuvieron anomalías cromosómicas. Estos datos se resumen en el Gráfico 4.

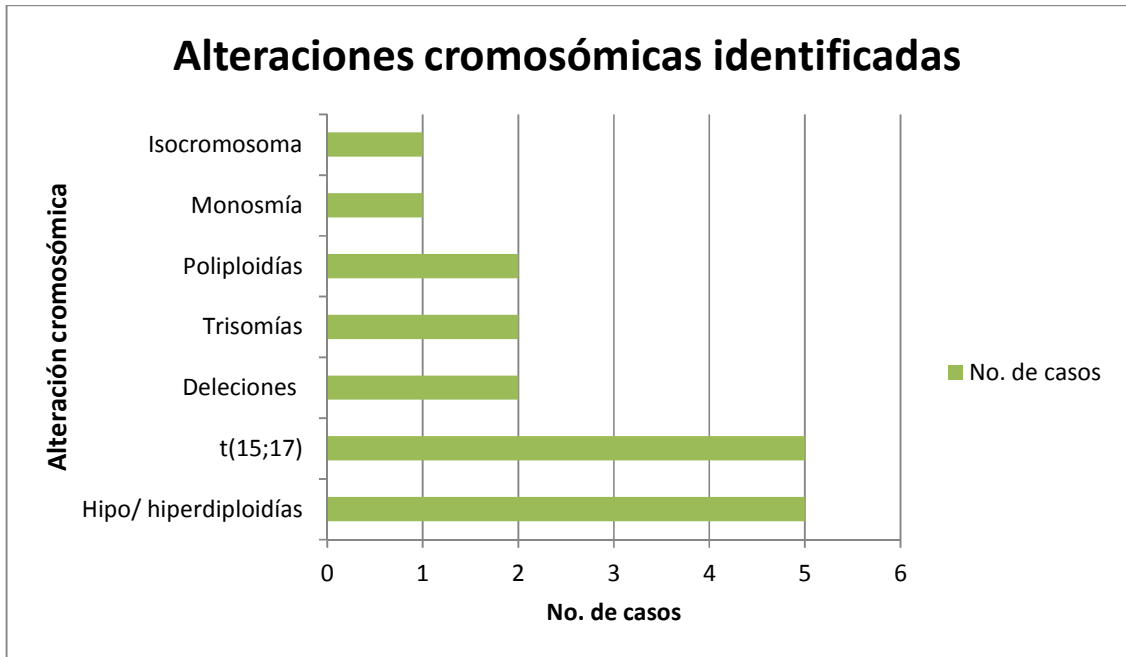


**Gráfico 4. Resultados citogenéticos**

En los 15 casos que presentaron anomalías cromosómicas, las alteraciones más frecuentes correspondieron a las hipodiploidías / hiperdiploidías y a la t(15;17) con un 33% cada una. Los casos ocho y dieciocho con t(15;17) presentaron hipodiploidía y trisomía 8 adicionales.

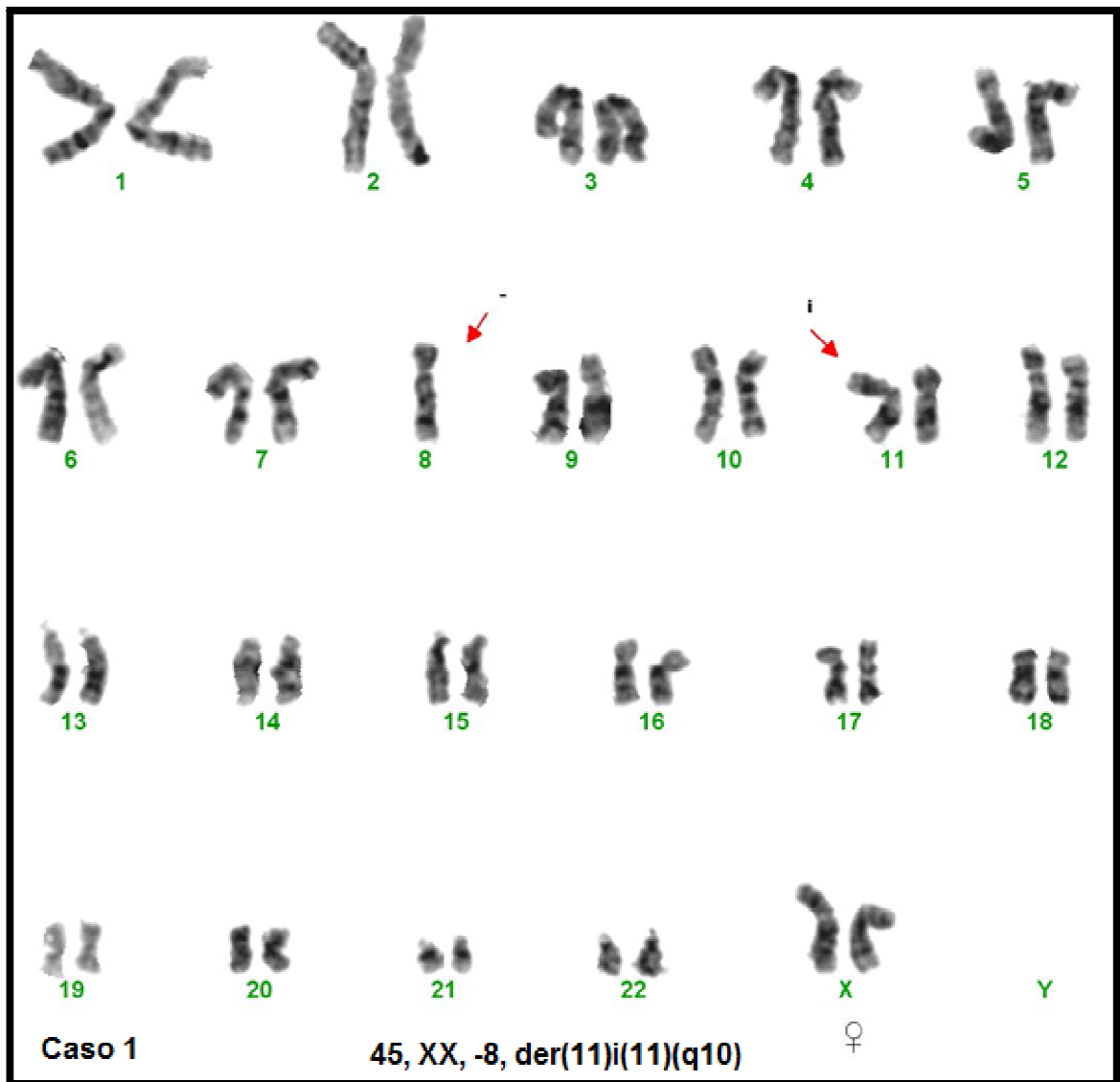
Otras alteraciones halladas fueron: deleciones 5q y 11q, trisomía 3, isocromosoma 11 y monosomía 7.

El Gráfico 5 contiene la información del tipo de anomalías cromosómicas encontradas y el número de casos en las que se identificaron.



**Gráfico 5. Alteraciones cromosómicas identificadas en los pacientes con LMA.**

A continuación se presentan los cariotipos con alteraciones cromosómicas más representativos de este trabajo (Figuras 24-29).



**Figura 24. Cariotipo del caso 1.** Las flechas señalan las alteraciones cromosómicas identificadas.



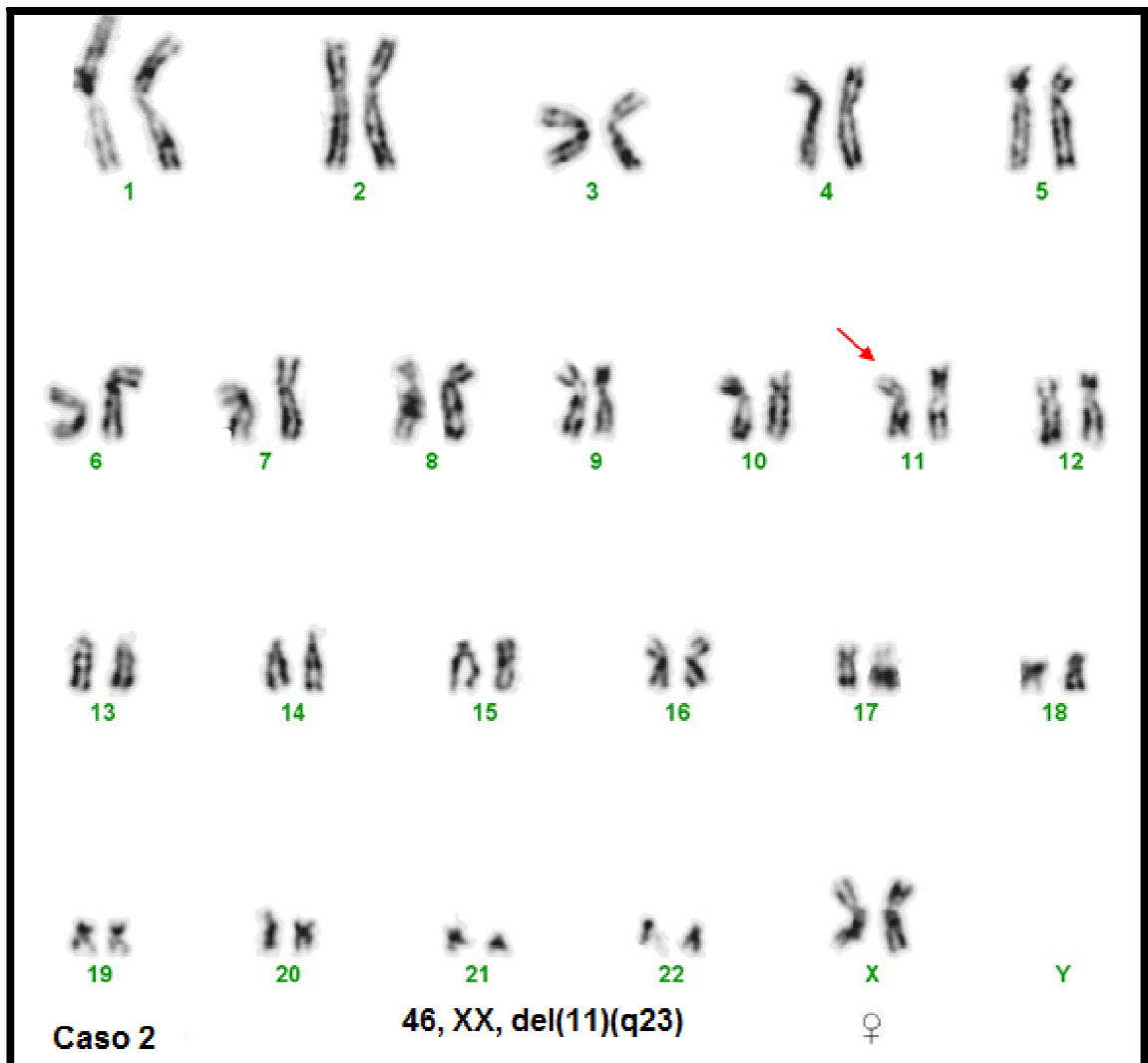
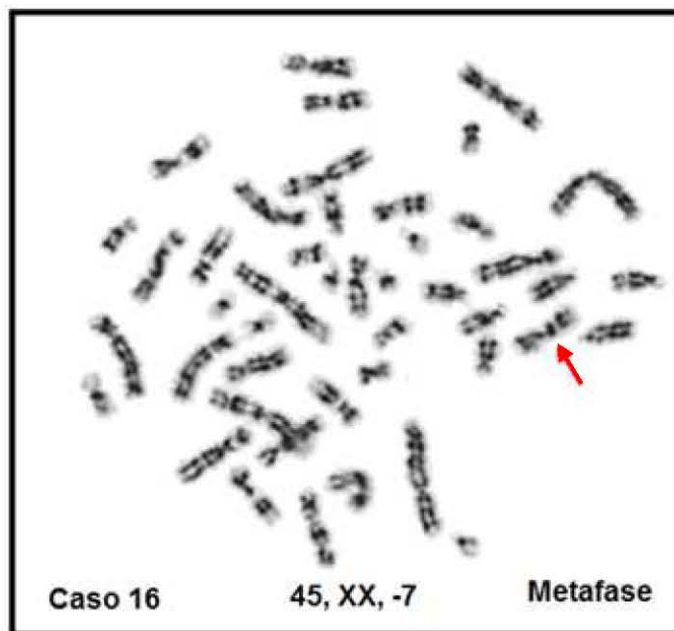
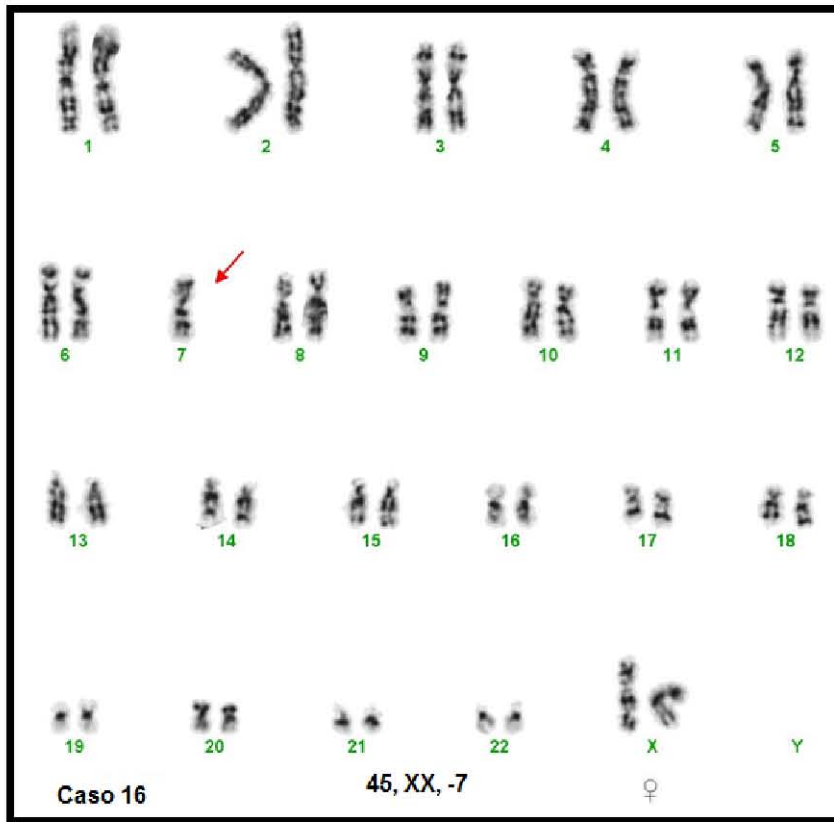
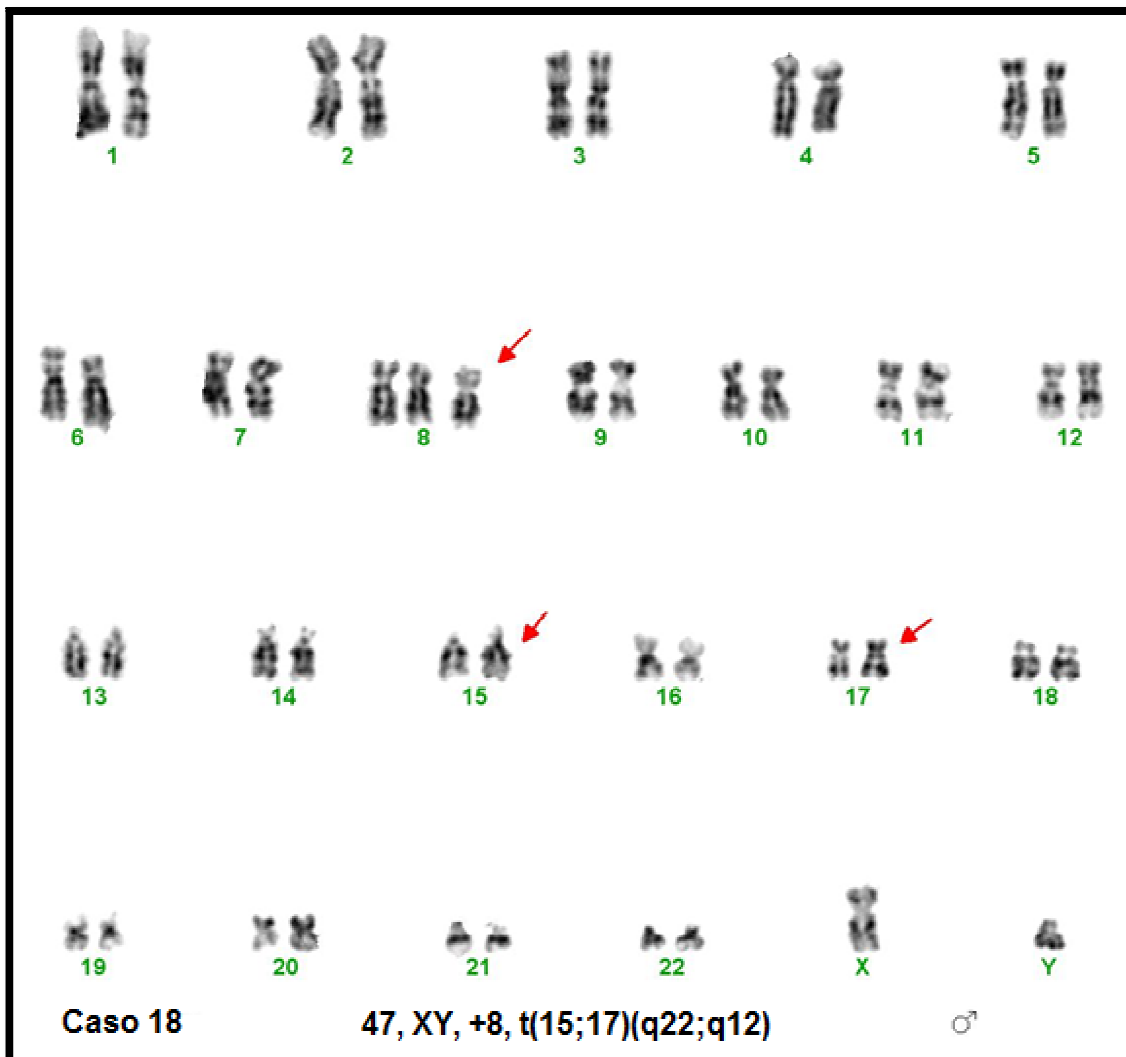


Figura 25. Cariotipo del caso 2. La flecha señala al cromosoma 11 que presenta pérdida de material genético.



**Figura 26. Cariotipo (arriba) y metafase (abajo) del caso 16. Las flechas señalan al único cromosoma 7 identificado.**



**Figura 27. Cariotipo del caso 18.** Las flechas señalan la trisomía del cromosoma 8 y los cromosomas 15 y 17 que participan en la traslocación.

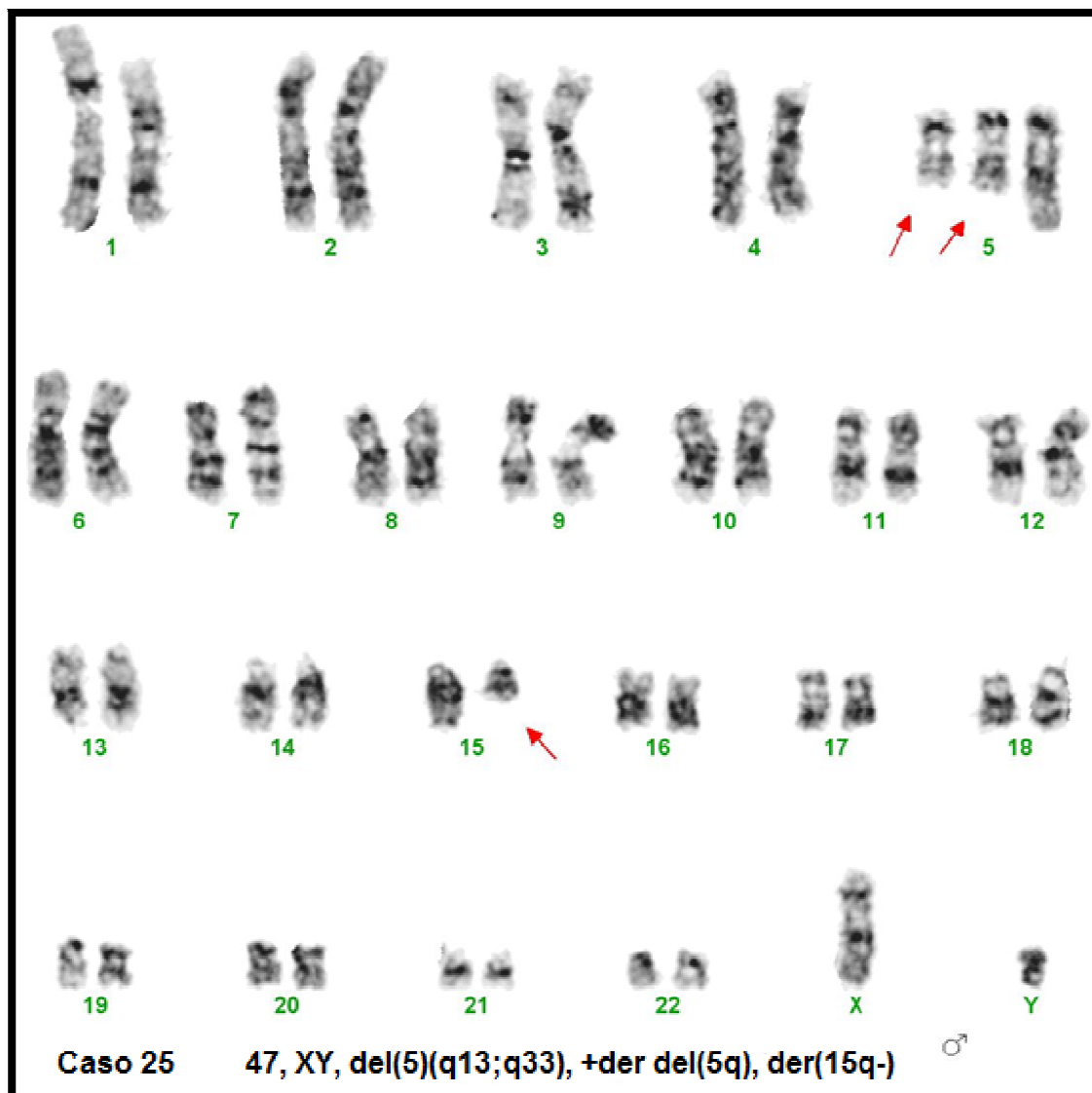


Figura 28. Cariotipo del caso 25. Las flechas señalan las alteraciones cromosómicas identificadas.

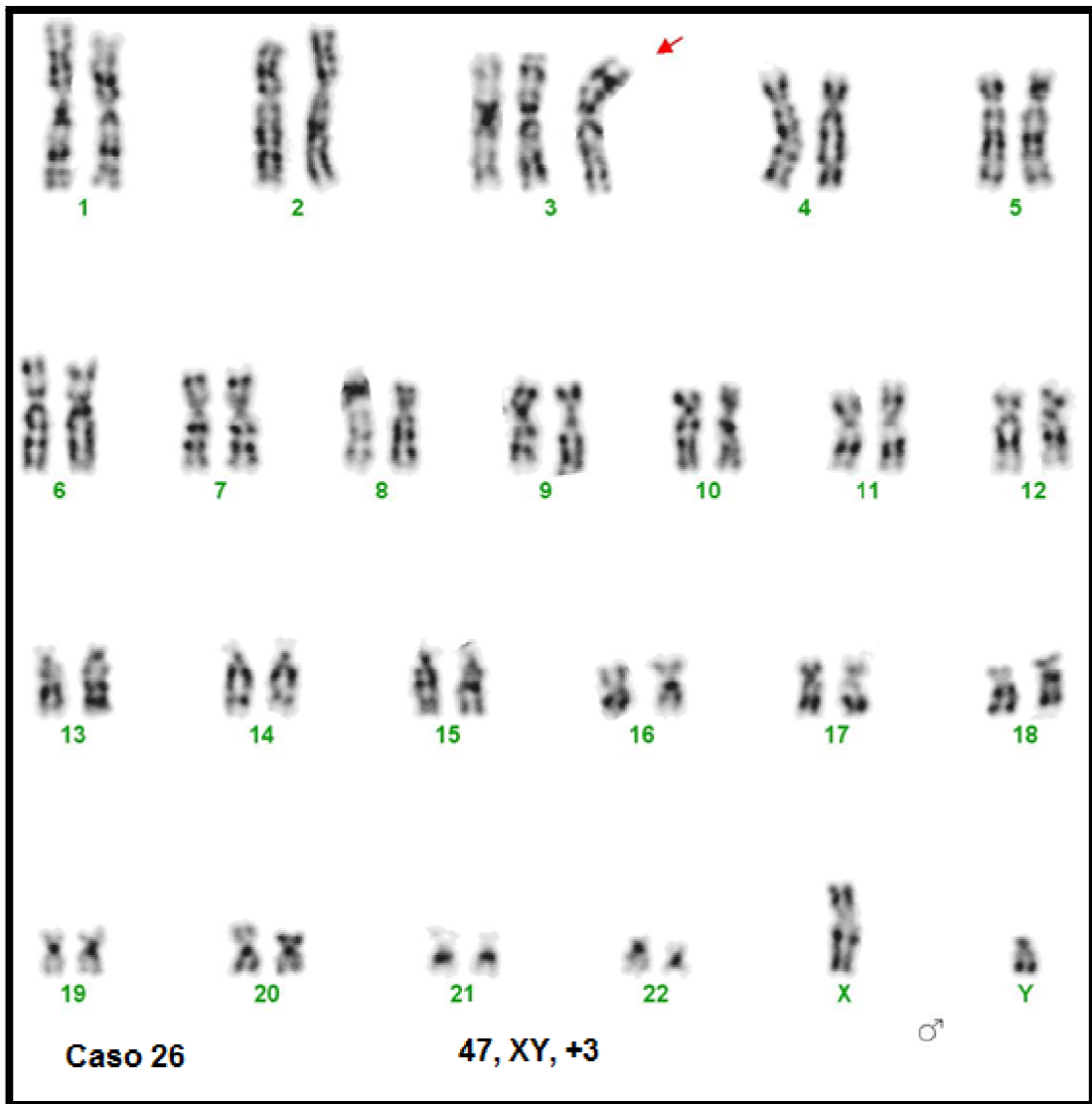


Figura 29. Cariotipo del caso 26. La flecha señala a la trisomía 3.

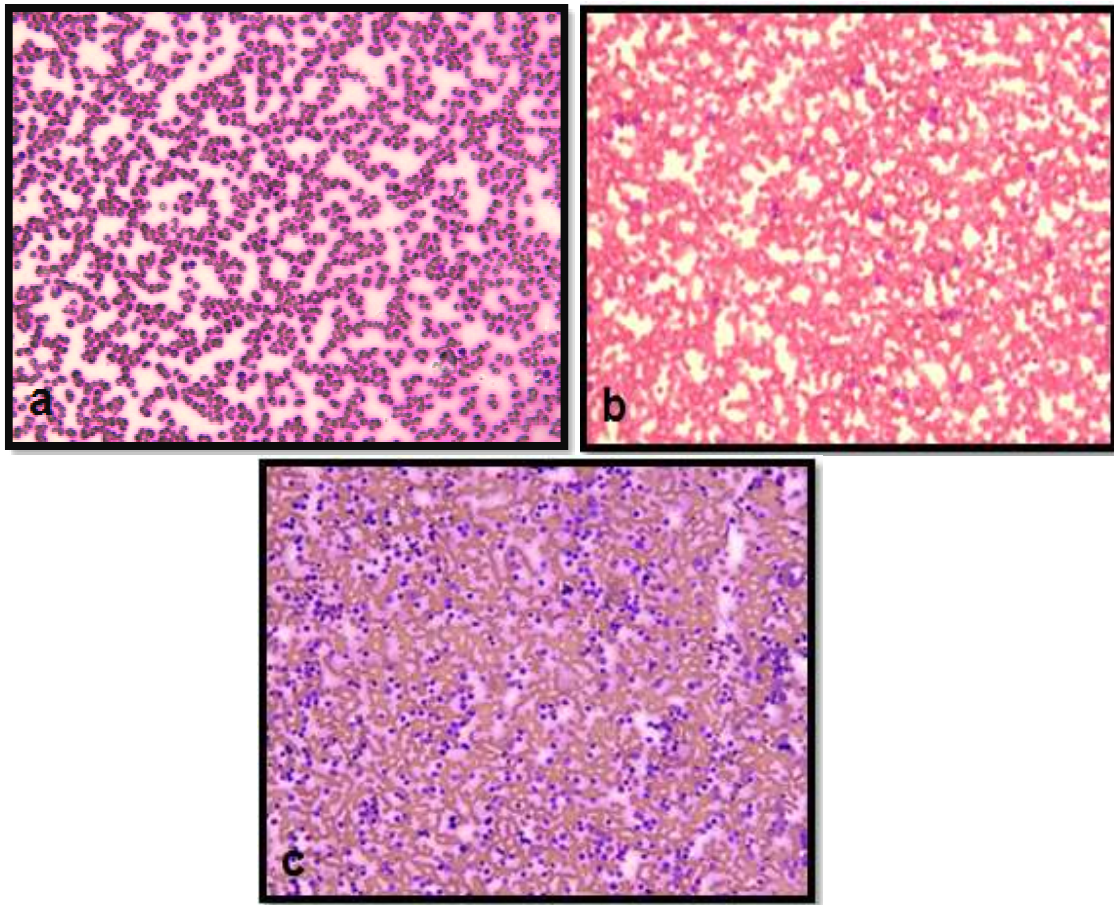
- **Análisis morfológico**

En cuanto al diagnóstico clínico de recepción, los subtipos de LMA más comunes fueron la M3 y la M2 (9 casos cada uno). El subtipo menos común fue la M7 (1 caso). No se recibió ningún caso con diagnóstico clínico de M0. En la Tabla 10 se presentan los subtipos de LMA y el número de muestras recibidas con ese diagnóstico clínico. En el caso 30, el diagnóstico no estaba claro ya que la solicitud marcaba M4 vs M6.

**Tabla 10. Número de muestras recibidas por diagnóstico de recepción.**

Subtipo de LMA	No. de casos recibidos con ese diagnóstico clínico	Subtipo de LMA	No. de casos recibidos con ese diagnóstico clínico
LAM	5	M4	7
M1	3	M5	2
M2	9	M6	1
M3	9	M7	1

La celularidad de los frotis de médula ósea con heparina se evaluó cualitativamente de acuerdo a la cantidad de células observadas durante el barrido con el objetivo 10X. La celularidad de cada frotis se clasificó en hipocelular, regular e hipercelular, como se ejemplifica en la Figura 30.



**Figura 30. Celularidad en el frotis de médula ósea con heparina, 10x.** a) Hipocelular (Caso 30), b) Regular (Caso 10), c) Hiper celular (Caso 19).

En la Tabla 11, se muestra la distribución de los 36 casos analizados en este trabajo respecto a las celularidad encontrada.

**Tabla 11. Distribución de los 36 casos respecto a la celularidad encontrada**

	Hipocelular	Regular	Hiper celular
<b>Casos</b>	5, 6, 9, 16, 17, 28, 29, 30, 34, 35, 36	2, 3, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 25, 27, 31	1, 4, 7, 15, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 32, 33
<b>Total</b>	11	12	13

En la Tabla 9 se encuentran los resultados del análisis morfológico de los frotis de médula ósea con heparina y los frotis de médula ósea sin aditivo, el cual se llevó a cabo empleando más aumento (100x).

La primera parte del análisis consistió en determinar la calidad de las muestras de médula ósea en heparina para la realización del cariotipo, saber si eran representativas del padecimiento del paciente y contenían células íntegras y buen porcentaje de blastos (>20%).

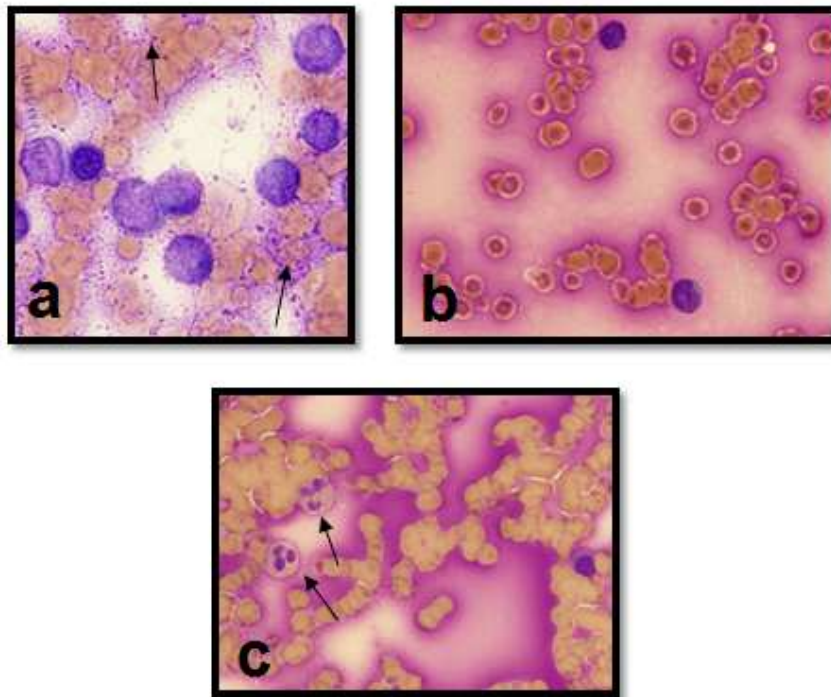
En treinta y dos casos (89%) el frotis de médula ósea con heparina fue valorable y en cuatro casos (11%) no fue valorable debido a detritus por mala tinción o a degradación celular que impidieron identificar la presencia de blastos y su integridad.

En cuatro casos (30, 34, 35 y 36) se consideró que la muestra de médula ósea con heparina no tenía la calidad adecuada para el análisis citogenético (Fig. 31) ya que presentaba los problemas mostrados en la Tabla 12. Los 32 casos restantes presentaron buena integridad celular, y un buen porcentaje de blastos mieloides que oscilaron entre un rango de 30-80%. En los casos con subtipo M3, todos los frotis presentaron promielocitos.

**Tabla 12. Muestras para el análisis citogenético con calidad inadecuada**

<b>Caso</b>	<b>Problema en muestra de médula ósea con heparina</b>
30	Blastos de apariencia no mioide
34	<20% de blastos, abundan neutrófilos
35	<20% de blastos, abundan neutrófilos
36	Degradación celular





**Figura 31. Calidad inadecuada de muestras de médula ósea con heparina.** a) Frotis con degradación celular, se señalan con una flecha los restos granulares de células rotas. b) Frotis que presenta blastos con apariencia no mieloide, probablemente linfoblastos. c) Frotis en el cual predominan neutrófilos sobre las células blásticas.

En la segunda parte del estudio morfológico se analizaron los frotis de médula ósea sin aditivo, lo cual permitió revalorar los casos en los que existió discrepancia entre el diagnóstico de recepción y el diagnóstico identificado en el LAOH por los dos revisores. En 12 casos (33%) no hubo correlación entre ambas apreciaciones y los resultados se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Casos en los que no coincide el diagnóstico de recepción con el diagnóstico encontrado en el LAOH**

Caso	Diagnóstico de recepción	Morfología frotis de médula ósea sin aditivo	Morfología frotis de médula ósea con heparina
4	M2	M1	M1
11	M2	M4	M1
15	M5	M4	M4
19	M2	M4	M4
22	M2	M5	M5
23	M1	M2	M2
26	M2	M5	M5
28	M1	M7	NV
29	M2	M5	M5
30	M4 vs M6	M4	L1
32	M4	M2	NV
33	M5	M4	M5

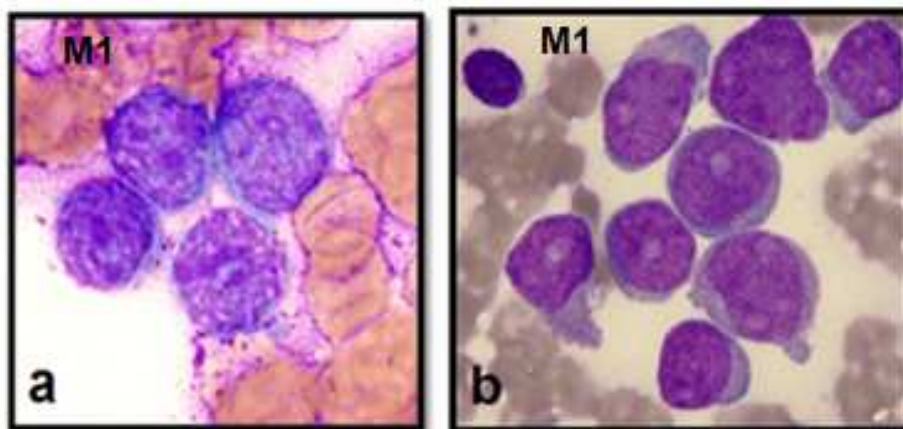
NV, no valorable

Las siguientes imágenes (Figuras 32-35) pertenecen a los frotis de médula ósea con heparina (izquierda) y a los frotis de la médula ósea sin aditivo (derecha) de 4 de los 12 casos anteriores; a excepción de la figura 38, en la que ambas imágenes representan los frotis de médula ósea sin aditivo. En la parte superior se indica el diagnóstico de recepción y el identificado en el LAOH.

Caso 4

Diagnóstico de recepción: **M2**

Diagnóstico de el LAOH: **M1**

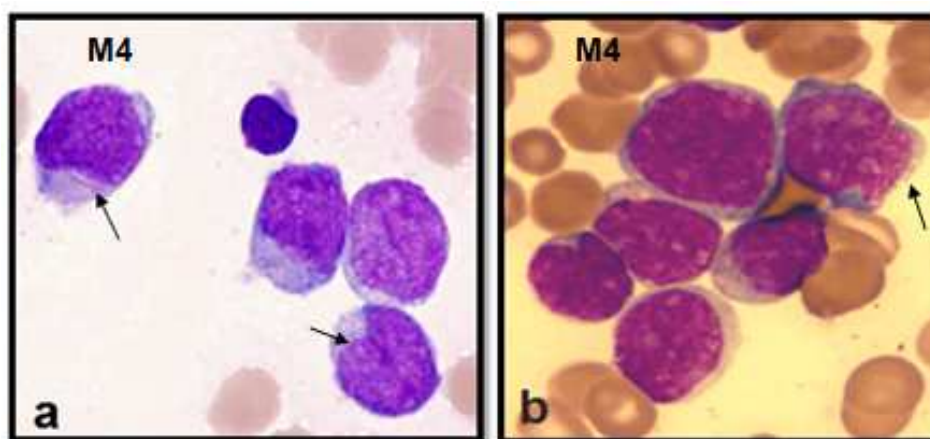


**Figura 32. Frotis de médula ósea del caso 4.** a) Médula ósea con heparina, blastos medianos, con escaso citoplasma azurófilo y sin granulación. b) Médula ósea sin aditivo, monoblastos sin maduración, escasos gránulos en el citoplasma y núcleo regular.

Caso 15

Diagnóstico de recepción: **M5**

Diagnóstico de el LAOH: **M4**

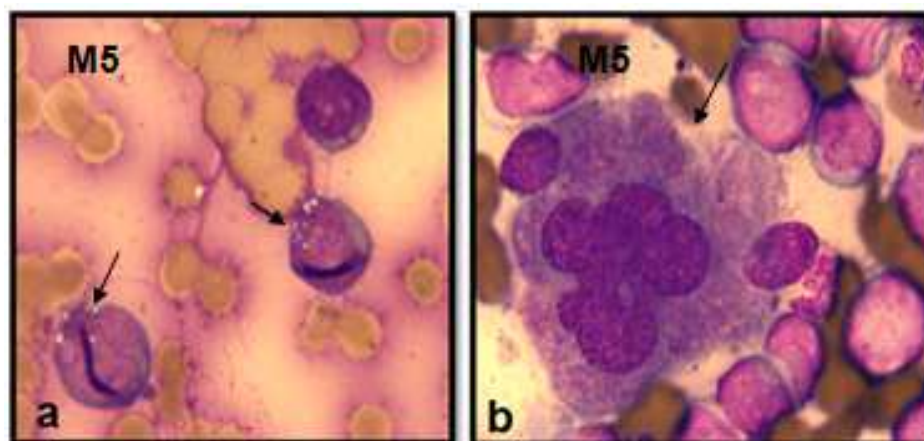


**Figura 33. Frotis de médula ósea del caso 15.** a) Médula ósea con heparina, mieloblasto con un cuerpo de Auer en la parte superior y monoblastos con núcleo hendido en la parte inferior. b) Médula ósea sin aditivo, mieloblastos medianos en la parte inferior y en la parte superior monoblastos grandes con núcleo hendido y vacuolas en el citoplasma, señaladas por una flecha.

Caso 26

Diagnóstico de recepción: **M2**

Diagnóstico de el LAOH: **M5**

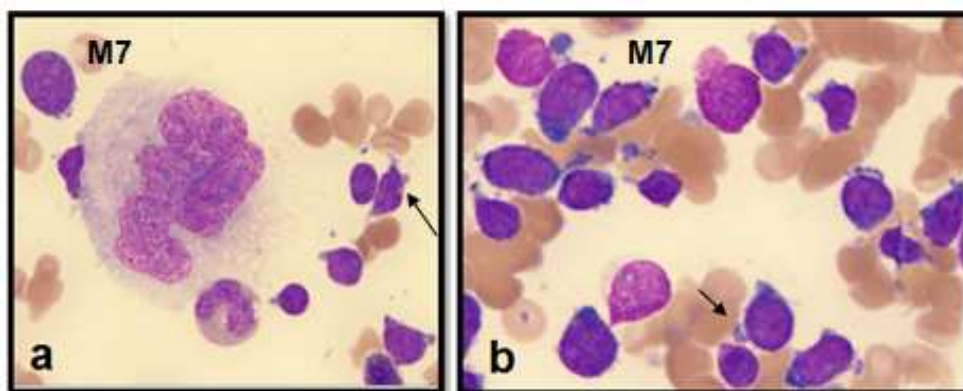


**Figura 34. Frotis de médula ósea del caso 26.** a) Médula ósea con heparina, monoblastos, núcleo hendido, citoplasma basófilo y con vacuolas, señaladas por las flechas. b) Médula ósea sin aditivo, monoblastos con núcleo hendido, citoplasma basófilo y sin granulación alrededor de un megacariocito, el cual se señala.

Caso 28

Diagnóstico de recepción: **M1**

Diagnóstico de el LAOH: **M7**



**Figura 35. Frotis de médula ósea sin aditivo del caso 28.** a) Médula ósea sin aditivo, blastos con prolongaciones citoplasmáticas en la parte inferior derecha, en el centro un micromegacariocito displásico. b) Médula ósea sin aditivo, megacarioblastos con morfología y tamaño variable, citoplasma escaso pero con prolongaciones. Las prolongaciones se señalan con una flecha

De manera adicional, en ocho casos (22%) no hubo correlación entre la morfología del frotis de medula ósea con heparina y el frotis de médula ósea sin aditivo. En el apéndice I se encuentran las imágenes de los frotis de algunos de estos casos con discrepancia.

## VI. DISCUSIÓN

En relación a los 36 casos analizados, la mediana de edad al diagnóstico fue de 35 años. Este valor no concuerda con lo reportado en la literatura (>65 años)<sup>7-9</sup>, sin embargo se debe considerar que la LMA *de novo* se desarrolla principalmente en personas más jóvenes. Los pacientes mayores de 65 años por lo general padecen LMA secundaria a quimioterapia, a SMD o a un tumor sólido<sup>19</sup>. Además hay que considerar que en este estudio se encuentra incluida una niña de 1 año de edad, lo cual modifica el rango.

La relación masculino/femenino fue de 0.71. Este dato no concuerda con lo reportado internacionalmente, ya que se postula que los hombres son más propensos a padecer LMA debido a factores ocupacionales<sup>7</sup>. Sin embargo, es necesario estudiar un número mayor de casos para comprobar esta relación, ya que se deben tomar en cuenta factores como el lugar de origen del paciente, exposición a cancerígenos y su historia familiar.

El cariotipo fue viable en el 92% de los casos y en la mayoría se obtuvo un índice mitótico bajo; es decir, solo una metafase por campo. Obtener el cariotipo en médula ósea se complica debido a que no es fácil reproducir el ambiente medular *in vitro*, además, las metafases de las clonas leucémicas no tienen buena morfología en comparación con las de las células normales<sup>32</sup>. Para mejorar el número de metafases, se debe emplear la cantidad adecuada de muestra de acuerdo a su viscosidad y concentración celular; la morfología se puede mejorar goteando las laminillas sobre un baño de vapor o hielo de acuerdo a las condiciones de humedad y temperatura del laboratorio.

A pesar de que no se trabajaron el mismo número de casos en cada procesamiento, el cultivo de 72 horas obtuvo los porcentajes más altos de índice mitótico adecuado y regular. Sin embargo, para neoplasias hematológicas (específicamente LMA) las recomendaciones internacionales dicen que es mejor

trabajar con los cultivos de menor tiempo, ya que en éstos hay mayor probabilidad de encontrar metafases de las células leucémicas, que tienen la ventaja proliferativa<sup>32,129</sup>.

El 55% de los casos presentó cariotipo normal, lo cual coincide con lo documentado en la literatura<sup>19,116</sup>. Éstos pacientes pueden tener alteraciones no detectables por cariotipo, por ejemplo en los genes FLT3, RAS, JAK2, etc<sup>10,116</sup>,. En estos casos, los análisis moleculares como FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) o PCR (Sensibilidad 1/1000000)<sup>32</sup> pueden ayudar a complementar el diagnóstico debido a que son técnicas más sensibles que el cariotipo (1/100)<sup>32</sup>.

La incidencia de alteraciones cromosómicas fue del 45%, el 53% tuvo anomalías estructurales, y el resto presentó alteraciones numéricas. Las anomalías más frecuentes fueron hipo/hiperdiploidías y la t(15;17) con cinco casos cada una. Las hiperdiploidías y la t(15;17) se consideran de buen pronóstico, mientras que las hipodiploidías confieren un mal pronóstico<sup>74</sup> debido a la pérdida de material genético.

En los casos con el subtipo M3 que tuvieron un cariotipo normal es probable que la t(15;17) no fuera detectada debido a dilución de la clona leucémica o a baja resolución cromosómica (350-400), ya que este rearrreglo implica bandas claras que no son evidentes si los cromosomas son muy pequeños. Además, se han reportado casos con una fusión submicroscópica de *PML-RAR $\alpha$*  debido a inserciones en otros cromosomas<sup>131</sup>. Para aumentar la resolución se podrían cosechar los cultivos cuatro horas antes, en lugar de dos horas como se hizo en este trabajo, favoreciendo la detención del ciclo celular en prometafase. Otra alternativa sería tratar los cultivos con bromuro de etidio, molécula que al intercalarse en el material genético alarga los cromosomas.

Dentro de las alteraciones del cromosoma 11, se identificaron la del(11q23) y el i(11). La primera se ha reportado en los subtipos M4 o M5 y en este trabajo se asoció al subtipo M4. La segunda se ha reportado en pocos estudios, principalmente

en adultos mayores con las variantes M2 y M5; aunque la edad de nuestra paciente (13 años) no coincide con lo reportado y esto podría repercutir en el progreso de la enfermedad, el subtipo M4 encontrado sugiere que el i(11) no se asocia a una variante específica de LMA.

En el caso 25 se identificó la del(5q) junto con el subtipo M4, esta alteración es de mal pronóstico y se asocia a cualquier subtipo de LMA. La trisomía 3 encontrada en el caso 26 no tiene alguna correlación con la morfología, y no se ha reportado en la LMA, por lo que su pronóstico y vinculación a algún subtipo se desconoce. La monosomía 7 se identificó en una paciente de cinco años con el subtipo M7, sin embargo, en este subtipo dicha monosomía ha sido reportada *de novo* principalmente en adultos<sup>107,136</sup>. El pronóstico de esta alteración en niños y adultos es malo ya que no responden a la quimioterapia<sup>137</sup>.

En el 27% de los casos con cariotipos anormales se observaron aberraciones secundarias, destacando la trisomía 8 y la hipodiploidía adicionales a la t(15;17), ambas concuerdan con lo reportado internacionalmente y no afectan el buen pronóstico de la M3<sup>88,130</sup>.

En el estudio cromosómico, la dilución de la muestra de médula ósea con el anticoagulante fue un factor muy importante que influyó en el resultado del cariotipo. La celularidad en estas muestras se evaluó cualitativamente como: hipocelular, normal e hipercelular.

Dentro de las muestras que presentaron hipocelularidad, cuatro casos tuvieron cariotipo normal, este resultado podría ser consecuencia de la dilución de la clona leucémica. Los casos 16 y 17 presentaron cariotipos con alteraciones, sin embargo, la clona tumoral solo fue encontrada en cinco y cuatro metafases, respectivamente, cuando se analizaron 26 y 23 metafases totales. El caso 9 fue el único donde la hipocelularidad de la muestra no pareció afectar la carga tumoral, ya que se analizaron 10 metafases con la t(15;17) y 12 metafases normales.



El aspirado de médula ósea fue realizado por hematólogos, quienes por la complejidad de la extracción algunas veces mandaron muestras muy diluidas (casos 34-36), lo que impidió la viabilidad de los cultivos. Adicionalmente, los casos 30 y 34 son pacientes que por su edad (> 65 años), la médula ósea tiene mayor porcentaje de grasa que de células, lo que puede causar la hipocelularidad de la muestra. Padecimientos como la LMA M7, cursan con fibrosis en médula ósea (aspirado seco), haciendo referencia a este punto, los casos 6, 16 y 28 con morfología de M7 presentaron marcada hipocelularidad.

En las muestras con celularidad regular se encontraron la mayoría de las alteraciones, por lo cual se consideran como el mejor tipo de muestras para el análisis cromosómico, seguramente porque la clona leucémica y las células normales se encuentran en concentraciones adecuadas para el cultivo.

La mayoría de los casos con cariotipo normal (diez casos) se identificaron en el grupo de muestras con hiper celularidad. Solo en tres casos se encontró el i(11), la t(15;17) y la trisomía 3. Es probable que en el cultivo las células normales tengan ventaja en la división sobre las células leucémicas, las cuales generalmente son difíciles de crecer *in vitro*.

En las muestras en las que el porcentaje de blastos fue menor al 20% o había degradación celular, el cariotipo no fue viable. Debido a que los cultivos no fueron estimulados con algún mitógeno, es importante que las muestras sean de buena calidad y que tengan una adecuada cantidad de células vivas que estén dividiéndose (blastos), ya que esto incrementará el índice mitótico. Específicamente en el caso 30 en el que se encontraron blastos de apariencia linfocítica, se debe considerar que la morfología celular puede cambiar debido a la heparina, la cual modifica la morfología nuclear y las características tintoriales del citoplasma y su granulación.

Respecto al diagnóstico de recepción, se tuvieron más casos de M2 y M3, lo cual coincide con lo reportado internacionalmente<sup>47,48</sup>. Sin embargo, cuando los dos analistas de el LAOH realizamos el análisis morfológico del frotis de médula ósea sin

aditivo, seis casos de M2 fueron reclasificados. Por el contrario los nueve casos con diagnóstico de M3 fueron confirmados ya que este subtipo es fácilmente reconocible por morfología, lo que explica la correlación.

En todos los casos en los que se identificó el subtipo M7 se encontraron blastos con prolongaciones citoplasmáticas. Los casos 6 y 17 corresponden a niños, lo cual coincide con la mayor incidencia de este subtipo en infantes (7-10%)<sup>138</sup>; en los cariotipos se encontraron hiperdiploidías/poliploidías y monosmía 7 respectivamente; ambas alteraciones han sido descritas en esta variante<sup>107</sup>, aunque la monosomía 7 le confiere un mal pronóstico. El caso 28 se trata de un adulto, lo cual confirma que este subtipo también afecta a personas mayores, su pronóstico es malo independientemente de que el cariotipo fue normal.

Existió discrepancia entre el diagnóstico de el LAOH y el de recepción en el 33% de los casos y las entidades que fueron confundidas entre sí fueron M2, M4 y M5. Este alto porcentaje de divergencia se debe a que los subtipos M2 y M4 comparten un componente mielocítico y a su vez, los subtipos M4 y M5 comparten células monocíticas, lo que puede generar la confusión. Esto resalta la importancia de elaborar y teñir correctamente los frotis para tener una buena distribución celular, no afectar la morfología e identificar las estructuras celulares.

En la literatura no existe un estudio en el cual se compare el diagnóstico morfológico de dos lugares diferentes, por ello, los altos porcentajes de discrepancia encontrados en esta tesis llaman la atención. Las características celulares a veces son tan sutiles que solamente son identificadas por ojos muy entrenados y aún así, el hematólogo más experimentado puede cometer un error. Es por esto que de la misma manera en que se revisaron los frotis en este trabajo, es conveniente que todos los laboratorios cuenten con un sistema de doble revisión en donde dos analistas interpreten un mismo caso y puedan comparar sus observaciones para emitir un resultado más confiable.

## VII. CONCLUSIONES

Los estudios citogenéticos y morfológicos de la LMA se realizaron sobre muestras de médula ósea, ya que ésta es un enfermedad medular y allí es en donde se encuentra la clona leucémica.

Aunque el cultivo de 72 horas presentó los porcentajes más altos de índice mitótico adecuado y regular, se tienen que mejorar los cultivos de corto plazo ya que las recomendaciones internacionales los sugieren para este padecimiento.

El cariotipo fue viable en el 92% de los casos, en este trabajó se encontró que la calidad y celularidad de la muestra de médula ósea en heparina son factores que contribuyen a la viabilidad y a la identificación de alteraciones en el cariotipo. En las muestras en donde se observó un porcentaje de blastos mayor al 20% y células íntegras, el cariotipo fue viable y, en aquellas con celularidad regular se presentaron la mayoría de las anomalías cromosómicas.

Es por todo lo anterior que se deben cuidar las técnicas de extracción, manipulación, transporte, conservación y procesamiento del aspirado de médula ósea para evitar tener muestras diluidas con el anticoagulante o con características inadecuadas para el procesamiento.

La incidencia de aberraciones cromosómicas fue del 45%, siendo la  $t(15;17)$  y las hipo/hiperdiploidías las alteraciones más frecuentes. A pesar de que se encontró una anomalía cromosómica no reportada en la literatura y otra poco frecuente, se tienen que analizar un mayor número de casos para comprobar su asociación con la LMA y su pronóstico.

Respecto a la evaluación de la correlación entre el diagnóstico de recepción y el obtenido en el LAOH, se encontró que en un alto porcentaje de los casos (33%) hubo discordancia. Esta confusión se dio principalmente entre los subtipos que involucran el mismo tipo de linaje celular, por lo que es recomendable, como se hizo

en este trabajo, contar con la interpretación de dos analistas que contrasten sus resultados y minimicen los errores ocasionados por la subjetividad de la prueba.

En el diagnóstico de las neoplasias hematológicas, el análisis morfológico del frotis de médula ósea se complementa con el estudio citogenético, el cual ayuda a confirmar el diagnóstico, advierte acerca del pronóstico del paciente y del tratamiento que se debe administrar. Es por esto que una comunicación más estrecha entre hematólogos y citogenetistas permitirá el adecuado manejo del paciente y evitará la toma de muestras innecesarias en periodos cortos de tiempo.

Con la información obtenida de este trabajo se pretende mejorar el índice mitótico de los cultivos implementando el método de conteo celular en cámara de Neubauer y la evaluación de la viabilidad celular con azul tripano. De esta forma se espera conocer la cantidad adecuada de muestra que se debe agregar a cada cultivo para tener el número de células vivas necesarias que permitan incrementar el índice mitótico.

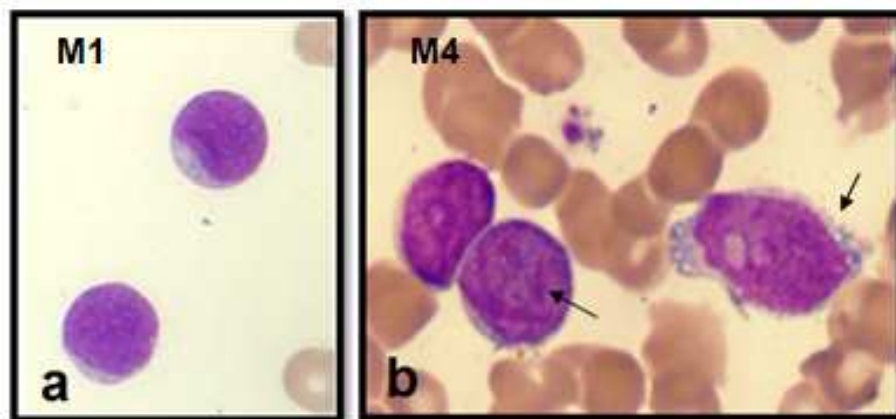
## VIII. APÉNDICE

**Tabla I. Casos en los que no coincide el frotis de médula ósea con heparina y el frotis de médula ósea sin aditivo**

<b>Caso</b>	<b>Diagnóstico de recepción</b>	<b>Morfología del frotis de médula ósea sin aditivo</b>	<b>Morfología del frotis de médula ósea con heparina</b>
<b>3</b>	M4	M5	M4
<b>11</b>	M2	M4	M1
<b>14</b>	M4	M4	M5
<b>16</b>	LMA	M7	M5
<b>20</b>	M2	M2	M5
<b>25</b>	LMA	M4	M5
<b>30</b>	M4 vs M6	M4	L1
<b>33</b>	M5	M4	M5

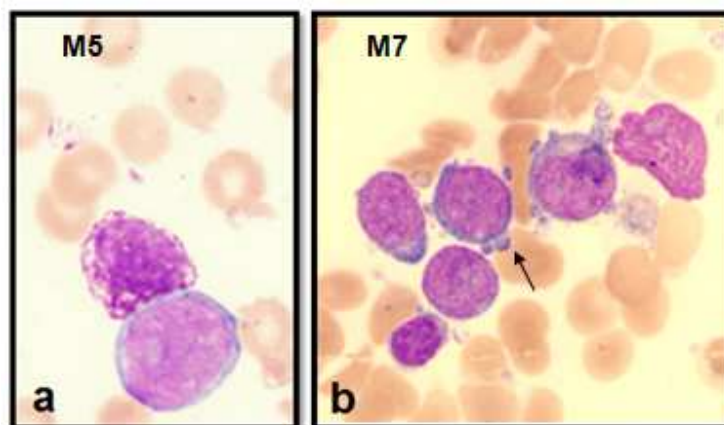
A continuación se presentan las imágenes del frotis de médula ósea con heparina (a, izquierda) y del frotis de la médula ósea sin aditivo elaborado por el hematólogo (b, derecha) y analizado en LAOH de 4 de los 8 casos con discrepancia en el diagnóstico morfológico que se resumen en la tabla anterior (Figuras I-IV).

Caso 11



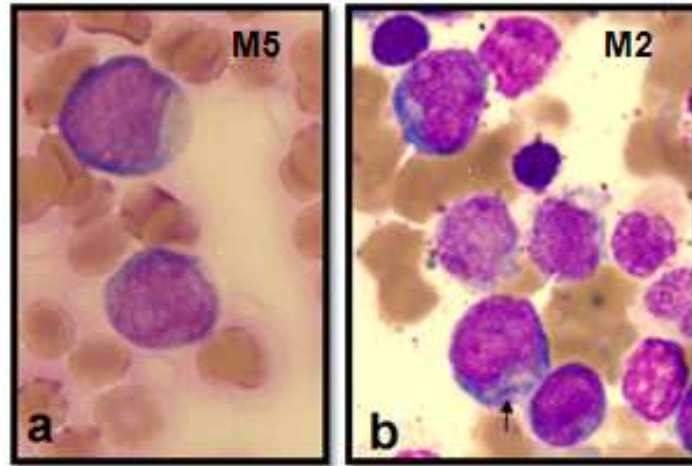
**Figura I. Frotis de médula ósea del caso 11.** a) Médula ósea con heparina, blastos con escasa granulación en el citoplasma. b) Médula ósea sin aditivo, monoblasto con vacuolas (flecha derecha) y mieloblastos con cuerpos de Auer (flecha izquierda)

Caso 16



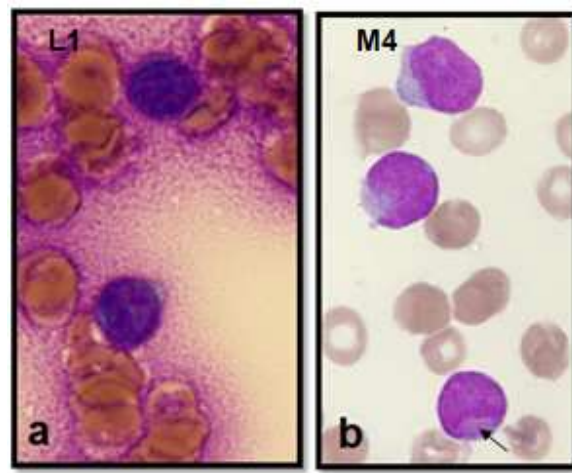
**Figura II. Frotis de médula ósea del caso 16.** a) Médula ósea con heparina, monoblasto con un nucléolo grande y citoplasma basófilo, arriba un núcleo desnudo. b) Médula ósea sin aditivo, blastos con prolongaciones citoplasmáticas en forma de timón, señaladas con una flecha.

Caso 20



**Figura III. Frotis de médula ósea del caso 20.** a) Médula ósea con heparina, monoblasto con núcleo hendido, citoplasma basófilo y vacuolas. b) Médula ósea sin aditivo, mieloblastos con granulación primaria; la flecha indica a uno con un cuerpo de Auer.

Caso 30



**Figura IV. Frotis de médula ósea del caso 30.** a) Médula ósea con heparina, células pequeñas, homogéneas, sin gránulos y con citoplasma escaso. b) Médula ósea sin aditivo, monoblasto en la parte superior y mieloblasto con granulación primaria en la parte inferior.

## IX. REFERENCIAS

- 1 Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia research* **36**, 6-13, doi:10.1016/j.leukres.2011.09.028 (2012).
- 2 Gahrton, G. Historical note on the discovery of the Philadelphia chromosome. *Cancer genetics* **205**, 338-339, doi:10.1016/j.cancergen.2012.03.007 (2012).
- 3 Chandra, H. S. *et al.* Philadelphia Chromosome Symposium: commemoration of the 50th anniversary of the discovery of the Ph chromosome. *Cancer genetics* **204**, 171-179, doi:10.1016/j.cancergen.2011.03.002 (2011).
- 4 Mckenzie, S. in *Hematología clínica* (ed S Mckenzie) Ch. 17, 431-449 (El Manual Moderno, 2000).
- 5 Bene, M. C. & Porwit, A. Acute leukemias of ambiguous lineage. *Seminars in diagnostic pathology* **29**, 12-18 (2012).
- 6 Rubin, P. in *Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes* (ed P Rubin) 566-579 (Elsevier Science, 2003).
- 7 Deschler, B. & Lubbert, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099-2107, doi:10.1002/cncr.22233 (2006).
- 8 Tirado, L., y Mohar, A. Epidemiología de las neoplasias hemato-oncológicas. *Rev Inst Nal Cancerol* **2**, 109-120.
- 9 O'Donnell, M. in *Cancer management: a multidisciplinary approach* (ed R. Pazdur, Coia, L., et al.) Ch. 14, 271-291 (Journal Oncology).
- 10 Thol, F. & Ganser, A. Molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia: a diverse disease with new perspectives. *Frontiers of medicine in China* **4**, 356-362, doi:10.1007/s11684-010-0220-5 (2010).
- 11 McKenzie, S. B. Advances in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology* **18**, 28-37 (2005).
- 12 Khan, I., Malinge, S. & Crispino, J. Myeloid leukemia in Down syndrome. *Critical reviews in oncogenesis* **16**, 25-36 (2011).
- 13 Smith, M. T., Zhang, L., McHale, C. M., Skibola, C. F. & Rappaport, S. M. Benzene, the exposome and future investigations of leukemia etiology. *Chemico-biological interactions* **192**, 155-159, doi:10.1016/j.cbi.2011.02.010 (2011).
- 14 Kerr, J. R. *et al.* Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia. *Journal of clinical pathology* **56**, 873-875 (2003).
- 15 Yoo, E. S. Recent advances in the diagnosis and management of childhood acute promyelocytic leukemia. *Korean journal of pediatrics* **54**, 95-105, doi:10.3345/kjp.2011.54.3.95 (2011).
- 16 Conde, M. in *Linfomas cutáneos* (ed J. Fernández) Ch. 7, 129-157 (Universidad de Cádiz, 2007).
- 17 Freund, M. in *Hematología: Guía práctica para el diagnóstico microscópico* (ed M Freund) Ch. 5, 69-78 (Editorial médica panamericana, 2011).
- 18 Vardiman, J., Brunning, R., Arber, D., Le Beau, M., Porwit, A., Bloomfield, C., Thiele, J., Tefferi, A. in *WHO: Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (ed S. Swerdlow, Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele J., Vardiman, J.) Ch. 1, 29 (IARC, 2008).



- 19 Schoch, C. & Haferlach, T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Current oncology reports* **4**, 390-397 (2002).
- 20 Gaidzik, V. & Dohner, K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Seminars in oncology* **35**, 346-355, doi:10.1053/j.seminoncol.2008.04.005 (2008).
- 21 Harrison, C. J. *et al.* Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 2674-2681, doi:10.1200/JCO.2009.24.8997 (2010).
- 22 Braoudaki, M. & Tzortzatou-Stathopoulou, F. Clinical cytogenetics in pediatric acute leukemia: an update. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* **12**, 230-237, doi:10.1016/j.clml.2012.04.004 (2012).
- 23 Lorsbach, R. B. Megakaryoblastic disorders in children. *American journal of clinical pathology* **122 Suppl**, S33-46 (2004).
- 24 Hitzler, J. K. & Zipursky, A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nature reviews. Cancer* **5**, 11-20, doi:10.1038/nrc1525 (2005).
- 25 Krug, U., Buchner, T., Berdel, W. E. & Muller-Tidow, C. The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Deutsches Arzteblatt international* **108**, 863-870, doi:10.3238/arztebl.2011.0863 (2011).
- 26 Latagliata, R., Petti, M. C. & Mandelli, F. Acute myeloid leukemia in the elderly: 'per aspera ad astra'? *Leukemia research* **23**, 603-613 (1999).
- 27 Pinto, A., Zagonel, V. & Ferrara, F. Acute myeloid leukemia in the elderly: biology and therapeutic strategies. *Critical reviews in oncology/hematology* **39**, 275-287 (2001).
- 28 Leith, C. P. *et al.* Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* **89**, 3323-3329 (1997).
- 29 Willman, C. L. The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program. *Seminars in hematology* **34**, 25-33 (1997).
- 30 Grimwade, D. & Mrozek, K. Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America* **25**, 1135-1161, vii, doi:10.1016/j.hoc.2011.09.018 (2011).
- 31 McKenna, R. W. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clinical chemistry* **46**, 1252-1259 (2000).
- 32 Campbell, L. J. & White, J. S. Cytogenetic analysis in acute myeloid leukaemia. *Methods Mol Biol* **730**, 63-77, doi:10.1007/978-1-61779-074-4\_5 (2011).
- 33 Gilor, S. & Gilor, C. Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: how to get the most out of a sample. *Topics in companion animal medicine* **26**, 109-118, doi:10.1053/j.tcam.2011.02.003 (2011).
- 34 Arzamendi, D. F., X; Puig, M.; Heras, M. . Mecanismo de acción de los fármacos antitrombóticos. *Rev Esp Cardiol Supl.* **6**, 2H-210 (2006).
- 35 Fernández, A. Características de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM). *emergencias* **14**, s38-s41 (2002).
- 36 Turgeon, M. in *Clinical hematology. Theory and procedures* (ed M. Turgeon) Ch. 2, 18-40 (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

- 37 Patel, N. Teach Talk, [http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk\\_Jan2009\\_VS8014.pdf](http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk_Jan2009_VS8014.pdf) (25-07-13).
- 38 *Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología*, [http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/845\\_MS-INS-NT40.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/845_MS-INS-NT40.pdf) (25-07-13)
- 39 Toma de muestras sanguíneas, <http://www.reactivosdemar.com.mx/docs/manuales/manual%20de%20Toma%20de%20muestras.pdf> (25-07-13)
- 40 Perkins, S. in *Wintrobe's, Clinical hematology* (ed J.; Foerster Greer, J.; Rodgers, G.) Ch. 1, 1-21 (Lippincott Williams & Wilkins, 2009).
- 41 Etzell, J. C., L. in *Blood. Principles and practice of hematology* (ed R.; Lux Handin, S.; Stossel, T.) Ch. 2, 15-80 (Lippincott Williams & Wilkins, 2003).
- 42 *Laboratorios Albeitar*, <http://www.albeitar.com/content.php?section=3&element=14> (25-07-13)
- 43 Mckenzie, S. in *Hematología clínica* (ed S Mckenzie) Ch. 18, 455-479 (El Manual Moderno, 2000).
- 44 Leclair, S. in *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas* (ed B Rodak) Ch. 33, 463-469 (Editorial Médica Panamericana, 2005).
- 45 Löffler, H. R., J.; Haferlach, T. in *Atlas of clinical hematology* (ed H.; Rastetter Löffler, J.; Haferlach, T.) Ch. 2, 18 (Springer, 2000).
- 46 Lee, S. H., Erber, W. N., Porwit, A., Tomonaga, M. & Peterson, L. C. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International journal of laboratory hematology* **30**, 349-364, doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01100.x (2008).
- 47 Arber, D., Brunning, R., Le Beau, M., Falini, B., Vardiman, J., et al. in *WHO: Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues* (ed S. Swerdlow, Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele J., Vardiman, J.) Ch. 6, 110-147 (IARC, 2008).
- 48 Foucar, K. in *Adult leukemias* (ed P Wiernik) Ch. 4, 89-127 (BC Decker Inc, 2001).
- 49 Acute myeloid leukemia, M0, <http://www.pathologyoutlines.com/images/marrow/028A.jpg> (27-07-13)
- 50 Acute myeloid leukemia, M1, <http://www.pathologyoutlines.com/images/marrow/029L.jpg> (27-07-13)
- 51 in *Leukaemia diagnosis* (ed B. Bain) (Blackwell Publishing).
- 52 Golomb, H. M., Rowley, J. D., Vardiman, J. W., Testa, J. R. & Butler, A. "Microgranular" acute promyelocytic leukemia: a distinct clinical, ultrastructural, and cytogenetic entity. *Blood* **55**, 253-259 (1980).
- 53 Acute promyelocytic leukemia, <http://www.med-ed.virginia.edu/courses/path/innes/images/wcdjpeg/wcd%20M3%20x100%20b.jpeg> (28-07-13)
- 54 Acute myeloid leukemia, M5a, <http://www.pathologyoutlines.com/images/marrow/068T.jpg> (28-07-13)
- 55 Hasserjian, R. P., Howard, J., Wood, A., Henry, K. & Bain, B. Acute erythremic myelosis (true erythroleukaemia): a variant of AML FAB-M6. *Journal of clinical pathology* **54**, 205-209 (2001).
- 56 Park, S., Picard, F. & Dreyfus, F. Erythroleukemia: a need for a new definition. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **16**, 1399-1401, doi:10.1038/sj.leu.2402549 (2002).
- 57 Acute leukemia, M6b, <http://www.pathologyoutlines.com/images/marrow/089.jpg> (28-07-13)

- 58 *Acute Megakaryoblastic Leukemia* - 1.,  
 <<http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1399&AssetType=Asset>  
 > (28-07-13)
- 59 Thiel, H. D., H; Haferlach, T. in *Color atlas of hematology. Practical microscopic and clinical diagnosis* (ed H; Diem Thiel, H; Haferlach, T.) Ch. 3, 91 (Thieme, 2004).
- 60 Paietta, E. in *Adult leukemias* (ed P. Wiernik) Ch. 5, 131-157 (BC Decker Inc, 2001).
- 61 Schwarzing, I. *et al.* Prognostic significance of surface marker expression on blasts of patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **8**, 423-430 (1990).
- 62 Bradstock, K., Matthews, J., Benson, E., Page, F. & Bishop, J. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood* **84**, 1220-1225 (1994).
- 63 Tien, H. F. *et al.* Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features, and ras mutation in acute myeloid leukemia. A study of 235 Chinese patients in Taiwan. *Cancer genetics and cytogenetics* **84**, 60-68 (1995).
- 64 Promsuwicha, O. & Auewarakul, C. U. Positive and negative predictive values of HLA-DR and CD34 in the diagnosis of acute promyelocytic leukemia and other types of acute myeloid leukemia with recurrent chromosomal translocations. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* **27**, 209-216 (2009).
- 65 Albano, F. *et al.* The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica* **91**, 311-316 (2006).
- 66 Adriaansen, H. J. *et al.* Acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (M4Eo) and inv(16)(p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* **81**, 3043-3051 (1993).
- 67 Ferrara, F. *et al.* Immunophenotypic analysis enables the correct prediction of t(8;21) in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* **102**, 444-448 (1998).
- 68 Satoh, C. *et al.* Aggressive characteristics of myeloblasts expressing CD7 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia research* **33**, 326-331, doi:10.1016/j.leukres.2008.07.006 (2009).
- 69 Rohrs, S. *et al.* CD7 in acute myeloid leukemia: correlation with loss of wild-type CEBPA, consequence of epigenetic regulation. *Journal of hematology & oncology* **3**, 15, doi:10.1186/1756-8722-3-15 (2010).
- 70 Chauhan, P. S. *et al.* Mutation of FLT3 gene in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and its association with clinical and immunophenotypic features. *Med Oncol* **28**, 544-551, doi:10.1007/s12032-010-9485-4 (2011).
- 71 Foran, J. C., K.; Forman, S. in *Atlas of clinical hematology* Vol. II (ed J. Armitage) Ch. 4, 92 (Springer, 2008).
- 72 Campana, D. & Coustan-Smith, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* **38**, 139-152 (1999).
- 73 Shaffer, L. S., M; Campbell, L. . *ISCN, 2009: An International system for Human Cytogenetic Nomenclature*. (2009).
- 74 Paietta, E. P., P. in *Adult leukemias* (ed P. Wiernik) Ch. 6, 161-188 (BC Decker Inc, 2001).
- 75 Reikvam, H., Hatfield, K. J., Kittang, A. O., Hovland, R. & Bruserud, O. Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 104631, doi:10.1155/2011/104631 (2011).

- 76 Chen, J. O., O.; Rowley, J. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nature reviews. Cancer* **10**, 23-36 (2010).
- 77 Speck, N. A. & Gilliland, D. G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature reviews. Cancer* **2**, 502-513, doi:10.1038/nrc840 (2002).
- 78 Hart, S. M. & Foroni, L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* **87**, 1307-1323 (2002).
- 79 Speck, N. A. *et al.* Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer research* **59**, 1789s-1793s (1999).
- 80 Blyth, K., Cameron, E. R. & Neil, J. C. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature reviews. Cancer* **5**, 376-387, doi:10.1038/nrc1607 (2005).
- 81 *t(8;21)(q22;q22)*, <<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0821.html>> (29-07-13)
- 82 Petrie, K. Z., A. AML1/ETO, a promiscuous fusion oncoprotein. *Blood* **109**, 4109-4110 (2007).
- 83 Liu, L. *et al.* RAD51 and XRCC3 polymorphisms: impact on the risk and treatment outcomes of de novo *inv(16)* or *t(16;16)/CBFbeta-MYH11(+)* acute myeloid leukemia. *Leukemia research* **35**, 1020-1026, doi:10.1016/j.leukres.2011.01.014 (2011).
- 84 Eghtedar, A. *et al.* Characteristics of translocation (16;16)(p13;q22) acute myeloid leukemia. *American journal of hematology* **87**, 317-318, doi:10.1002/ajh.22258 (2012).
- 85 Scandura, J. M., Bocconi, P., Cammenga, J. & Nimer, S. D. Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme. *Oncogene* **21**, 3422-3444, doi:10.1038/sj.onc.1205315 (2002).
- 86 *inv(16)(p13q22)*, <<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/inv16.html>> (29-07-13)
- 87 Pandolfi, P. P. PML, PLZF and NPM genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **81**, 472-482 (1996).
- 88 Diverio, D., Riccioni, R., Mandelli, F. & Lo Coco, F. The PML/RAR alpha fusion gene in the diagnosis and monitoring of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **80**, 155-160 (1995).
- 89 Nasr, R., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Guillemin, M. C. & de The, H. Therapy-induced PML/RARA proteolysis and acute promyelocytic leukemia cure. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 6321-6326, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0209 (2009).
- 90 Grignani, F. *et al.* Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* **83**, 10-25 (1994).
- 91 Zelent, A., Guidez F., Melnick, A., Waxman, S., Litch, J. . Translocations of the RARa gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **20**, 7186-7203 (2001).
- 92 Lin, R., Sternsdorf, T., Tini, M., Evans, R. . Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **20**, 7204 - 7215 (2001).
- 93 Degos, L., Wang, Z. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* **20**, 7140 - 7145 (2001).
- 94 Nowak, D., Stewart, D. & Koeffler, H. P. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* **113**, 3655-3665, doi:10.1182/blood-2009-01-198911 (2009).
- 95 Lazarchick, J. J. & Lazarchick, J. Acute promyelocytic leukemia, microgranular variant. *Blood* **104**, 605 (2004).
- 96 Sainty, D. *et al.* A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood* **96**, 1287-1296 (2000).
- 97 Falini, B. *et al.* Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* **92**, 519-532 (2007).

- 98 Liu, H., Cheng, E. H. & Hsieh, J. J. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer biology & therapy* **8**, 1204-1211 (2009).
- 99 Tamai, H. & Inokuchi, K. 11q23/MLL acute leukemia : update of clinical aspects. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH* **50**, 91-98 (2010).
- 100 Balgobind, B. V., Zwaan, C. M., Pieters, R. & Van den Heuvel-Eibrink, M. M. The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **25**, 1239-1248, doi:10.1038/leu.2011.90 (2011).
- 101 Huret, J. 11q23 rearrangements in leukaemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **5**, 46-49 (2001).
- 102 *t(9;11)(p22;q23)*, <<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0911.html>> (29-07-13)
- 103 Oshikawa, G., Kurosu, T., Arai, A., Murakami, N. & Miura, O. Clonal evolution with double Ph followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. *Cancer genetics and cytogenetics* **199**, 56-61, doi:10.1016/j.cancergencyto.2010.01.018 (2010).
- 104 Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J. & Skorski, T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *The Journal of clinical investigation* **120**, 2254-2264, doi:10.1172/JCI41246 (2010).
- 105 *Cytogenetic analysis*, <<http://www.csilaboratories.com/Testing/Cytogenetics.aspx>> (29-07-13)
- 106 Reinhardt, D. *et al.* Acute megakaryoblastic leukemia in children and adolescents, excluding Down's syndrome: improved outcome with intensified induction treatment. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **19**, 1495-1496, doi:10.1038/sj.leu.2403815 (2005).
- 107 Dastugue, N. *et al.* Cytogenetic profile of childhood and adult megakaryoblastic leukemia (M7): a study of the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Blood* **100**, 618-626, doi:10.1182/blood-2001-12-0241 (2002).
- 108 Descot, A. *et al.* OTT-MAL is a deregulated activator of serum response factor-dependent gene expression. *Molecular and cellular biology* **28**, 6171-6181, doi:10.1128/MCB.00303-08 (2008).
- 109 Mercher, T. *et al.* The OTT-MAL fusion oncogene activates RBPJ-mediated transcription and induces acute megakaryoblastic leukemia in a knockin mouse model. *The Journal of clinical investigation* **119**, 852-864, doi:10.1172/JCI35901 (2009).
- 110 Testoni, N. *et al.* 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. *Haematologica* **84**, 690-694 (1999).
- 111 *inv(3)(q21q26)*, <<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/inv3.html>> (29-07-13)
- 112 Nimer, S. D. & Golde, D. W. The 5q- abnormality. *Blood* **70**, 1705-1712 (1987).
- 113 Neuman, W. L. *et al.* Chromosomal loss and deletion are the most common mechanisms for loss of heterozygosity from chromosomes 5 and 7 in malignant myeloid disorders. *Blood* **79**, 1501-1510 (1992).
- 114 Luna-Fineman, S., Shannon, K. M. & Lange, B. J. Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications. *Blood* **85**, 1985-1999 (1995).
- 115 Breems, D. A. *et al.* Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 4791-4797, doi:10.1200/JCO.2008.16.0259 (2008).

- 116 Betz, B. L. & Hess, J. L. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Archives of pathology & laboratory medicine* **134**, 1427-1433, doi:10.1043/2010-0245-RA.1 (2010).
- 117 Haferlach, T. *et al.* Gene expression profiling for the diagnosis of acute leukaemia. *British journal of cancer* **96**, 535-540, doi:10.1038/sj.bjc.6603495 (2007).
- 118 Bacher, U., Schnittger, S. & Haferlach, T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology* **22**, 646-655, doi:10.1097/CCO.0b013e32833ed806 (2010).
- 119 Cotta, C. V. & Tubbs, R. R. Mutations in myeloid neoplasms. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* **17**, 191-199, doi:10.1097/PDM.0b013e31817d5327 (2008).
- 120 Stirewalt, D. L. & Radich, J. P. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature reviews. Cancer* **3**, 650-665, doi:10.1038/nrc1169 (2003).
- 121 Foran, J. M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2010**, 47-55, doi:10.1182/asheducation-2010.1.47 (2010).
- 122 Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B. & Pandolfi, P. P. Nucleophosmin and cancer. *Nature reviews. Cancer* **6**, 493-505, doi:10.1038/nrc1885 (2006).
- 123 Mir Yousuf, A. T., M. . in *Adult leukemias* (ed P Wiernik) Ch. 7, 191-238 (BC Decker Inc, 2001).
- 124 Pufan, T. A., S; Persson, J. The common leukemic fusions in pathogenesis and in treatment response in acute myeloid leukemia. *The open leukemia journal* **3** (2010).
- 125 Saeed, S., Logie, C., Stunnenberg, H. G. & Martens, J. H. Genome-wide functions of PML-RARalpha in acute promyelocytic leukaemia. *British journal of cancer* **104**, 554-558, doi:10.1038/sj.bjc.6606095 (2011).
- 126 O'Connor, R. The pharmacology of cancer resistance. *Anticancer research* **27**, 1267-1272 (2007).
- 127 *Obtención y tinción de un frotis de sangre e identificación de las células sanguíneas <*  
[http://www.bioygeo.info/pdf/Frotis\\_sangre.pdf](http://www.bioygeo.info/pdf/Frotis_sangre.pdf)*>* (29-07-13)
- 128 Passarge. in *Genética. Texto y atlas*. (ed Passarge) 195 (Médica Panamericana, 2007).
- 129 Czepulkowski, B. in *Human cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities* (ed D. Rooney) Ch. 1-24, (Practical approach, 2001).
- 130 McKinney, C. D., Golden, W. L., Gemma, N. W., Swerdlow, S. H. & Williams, M. E. RARA and PML gene rearrangements in acute promyelocytic leukemia with complex translocations and atypical features. *Genes, chromosomes & cancer* **9**, 49-56 (1994).
- 131 Grimwade, D. *et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* **96**, 1297-1308 (2000).
- 132 Boultonwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A. N. & Wainscoat, J. S. Advances in the 5q-syndrome. *Blood* **116**, 5803-5811, doi:10.1182/blood-2010-04-273771 (2010).
- 133 Boultonwood, J., Pellagatti, A. & Wainscoat, J. S. 5q- syndrome. *Current pharmaceutical design* **18**, 3180-3183 (2012).

- 134 Taguchi, F., Hirata, J., Nishimura, J. & Nawata, H. Hypo-triploid acute myeloid leukemia with isochromosome 11q. *International journal of hematology* **56**, 191-195 (1992).
- 135 Otero, L. A., M; Simões, G; Fernandez, TS. Isochromosome 11q associated with amplification of MLL gene in an adult patient with acute myeloid leukemia. *2ª REUNIÃO BRASILEIRA DE CITOGENÉTICA* **1**, 6-12 (2011).
- 136 Trejo, R. M., Aguilera, R. P., Nieto, S. & Kofman, S. A t(1;22)(p13;q13) in four children with acute megakaryoblastic leukemia (M7), two with Down syndrome. *Cancer genetics and cytogenetics* **120**, 160-162 (2000).
- 137 Fischer, K. *et al.* Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias. *Blood* **89**, 2036-2041 (1997).
- 138 Sharma, S. *et al.* Clinico-haematological profile of acute megakaryoblastic leukaemia: report of five cases. *Advances in hematology* **2009**, 461912, doi:10.1155/2009/461912 (2009).