



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BÚSQUEDA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS POR
CITOGENÉTICA CLÁSICA Y MOLECULAR EN
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DE *NOVO*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA

SADAI REQUENES MARTÍNEZ

Director: M en C. Mónica Sierra Martínez
Hospital Juárez de México

Asesor interno: Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández



Ciudad de México. Febrero 2017



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.

"El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños"

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios porque Él es la razón de cada meta que he podido alcanzar y de cada sueño por cumplir en mi vida.

A mi familia por acompañarme, impulsarme y apoyarme en todo momento a lo largo de mi carrera y en este proceso final de ella. Pero lo más importante, por ser siempre un buen ejemplo para mí.

A mis amigos, que sin importar cuántos sean, siempre están para apoyarte en cualquier situación y siempre son suficientes para pasar un tiempo de agradable compañía.

A mis maestros y asesores de tesis por dedicar su tiempo, por compartirme lo más valioso de sus conocimientos y por ser la mejor guía en mi formación como profesional y en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	6
II.	INTRODUCCIÓN.....	7
III.	MARCO TEÓRICO	8
	2.1 LEUCEMIA	8
	2.1.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	8
	2.2 EPIDEMIOLOGÍA	9
	2.3 FACTORES DE RIESGO.....	10
	2.4 CLASIFICACIÓN	11
	2.4.1 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA	11
	2.4.2 CLASIFICACIÓN INMUNOFENOTÍPICA.....	12
	2.5. CUADRO CLÍNICO.....	13
	2.6. TRATAMIENTO	13
	3.7. MÉTODOS DE DETECCIÓN	14
	3.7.1. HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA	15
	3.8. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	16
	3.8.1. ALTERACIONES NUMÉRICAS.....	16
	3.8.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES.....	17
	3.9. FACTORES PRONÓSTICO	22
IV.	ANTECEDENTES.....	25
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
VI.	JUSTIFICACIÓN	26
VII.	HIPÓTESIS	27
VIII.	OBJETIVOS	27
IX.	MATERIAL Y MÉTODO	28
	8.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	28
	8.1.2 SIEMBRA Y COSECHA	28
	8.2 OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO.....	28
	8.2.1 ANÁLISIS.....	28
	8.3 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA.....	29
	8.3.1 SONDAS.....	29
	8.3.2 HIBRIDACIÓN DE SONDAS CENTROMÉRICAS (VYSIS)	29

8.3.3 HIBRIDACIÓN DE SONDAS DE LOCUS ESPECÍFICO (CYTOCELL)	30
8.3.4 ANÁLISIS.....	30
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
XI. CONCLUSIONES	48
XII. PERSPECTIVAS.....	49
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ✓ ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ✓ CGH: Hibridación genómica comparativa.
- ✓ DS: Desviación estándar.
- ✓ FAB: Grupo Franco-Americano-Británico.
- ✓ FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia.
- ✓ HTVL-1: Virus linfotrópico de células T humanas.
- ✓ LDH: Deshidrogenasa láctica.
- ✓ LLA: Leucemia linfoblástica aguda.
- ✓ OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ✓ RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- ✓ VC: Valor de corte.
- ✓ WBC: Cuenta de leucocitos.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Incidencia y mortalidad por leucemia en México</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. Translocación BCR-ABLt(9;22)(q34;q11).....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3. Puntos de rompimiento en BCR</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4. Puntos de rompimiento en ABL</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. Fusión génica TEL-AML.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6. Marcaje de sonda para BCR-ABL1</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7. Marcaje de sonda para TEL-AML1.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 8. FISH en núcleos interfásicos</i>	<i>32</i>
<i>Figura 9. Deleción del cromosoma 10 observada en un paciente pediátrico con LLA.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10. Alteraciones cromosómicas estructurales de pacientes adultos con LLA.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 11. Metafase de un paciente adulto hipodiploide con cariotipo compuesto</i>	<i>42</i>

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS	11
CUADRO 2 CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS	12
CUADRO 3 GRUPOS DE RIESGO	23
CUADRO 4 FACTORES PRONÓSTICO EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LA INFANCIA.....	24
CUADRO 5 CARACTERÍSTICAS INICIALES Y CLASIFICACIÓN DE PACIENTES CON LLA.....	34
CUADRO 6 ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS	36
CUADRO 7 ANÁLISIS DE SONDAS CENTROMÉRICAS 4, 10, 21, X, Y EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.....	38
CUADRO 8 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA <i>TEL/AML</i> EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.....	39
CUADRO 9 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA <i>BCR/ABL</i> EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.....	40
CUADRO 10 ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES ADULTOS.....	41
CUADRO 11 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA <i>BCR/ABL</i> EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES ADULTOS.....	45
CUADRO 12 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS INICIALES DE PACIENTES CON LLA	46

I. RESUMEN

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad neoplásica que resulta de una proliferación clonal no controlada de los precursores inmaduros del linaje linfoide, su acumulación conduce a una insuficiencia de la médula ósea y posibles infiltraciones en otros órganos. Su frecuencia es del 80% en niños y del 20% en adultos. Los métodos de citogenética convencional y molecular son una herramienta útil para la detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales con valor pronóstico, las cuales son importantes para seleccionar el mejor tratamiento y dar un seguimiento al paciente. Objetivo: Detectar alteraciones cromosómicas por medio de citogenética clásica e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de *novo*. Material y método: Las muestras obtenidas fueron aspirados de médula ósea. Se realizaron cultivos a 24, 48 y 72 horas sin estimulación y se analizaron los cariotipos con bandas G. Para la búsqueda de hiperdiploidías (sondas centroméricas 4, 10, 21, X e Y) y translocaciones [t(12;21) y t(9;22)] se realizó la técnica de FISH, esto mediante la desnaturalización de las muestras y las sondas a 75°C y su posterior hibridación a 37°C. Finalmente se analizaron los resultados y se reportaron con base en la nomenclatura cromosómica internacional (ISCN, 2013). Resultados: Se obtuvieron 17 muestras de médula ósea de pacientes con LLA y se dividieron en 2 grupos (niños y adultos), obteniendo 4 y 13 muestras respectivamente. Se logró obtener el resultado de cariotipo de 5/17 pacientes, observando 3/17 con alteraciones cromosómicas estructurales, 1/17 con alteraciones cromosómicas numéricas y 1/17 con cariotipo normal. Los resultados obtenidos de la técnica de FISH fueron 4/17 pacientes con alteraciones numéricas; de los cuales 3 eran de edad pediátrica (2 con pérdida del cromosoma 4 y 1 con pérdida del cromosoma 10) y 1 de edad adulta, presentando pérdida del loci *ABL*. Conclusión: La citogenética convencional y la FISH como técnica complementaria permitieron la detección de alteraciones cromosómicas con importancia pronóstica, por lo cual, son métodos importantes para proporcionar un correcto tratamiento y seguimiento al paciente.

II. INTRODUCCIÓN

La leucemia es una enfermedad neoplásica que afecta al tejido hematopoyético, la cual resulta de una proliferación clonal que se produce de manera no controlada en los precursores inmaduros del linaje linfóide o mielóide, su acumulación conduce a una insuficiencia de la médula ósea y a posibles infiltraciones en otros órganos. Esta enfermedad es considerada el tipo de cáncer que más se presenta en la edad pediátrica (25-35% de los casos) (Zhang y cols., 2015). En México existe una incidencia de 116,146 casos al año, de los cuales 58,858 son casos femeninos y 57,288 masculinos (Globocan, 2012).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) afecta a las células blásticas de linaje linfóide, se ha observado que es el tipo de leucemia más común en niños (aproximadamente en un 80% de los casos), con un pico de incidencia de 3 a 5 años de edad, siendo este rango de buen pronóstico; mientras que en adultos se presenta en un 20% de los casos y es considerada de mal pronóstico (Sánchez y cols., 2007; Zhang y cols., 2015).

Para la LLA se han identificado distintos tipos de alteraciones cromosómicas que predominan en la enfermedad, las cuales pueden ser de tipo numéricas o estructurales. Éstas permiten proporcionar un diagnóstico, pronóstico y el seguimiento de la enfermedad al paciente (Jiménez, 2008). Para la detección de estas alteraciones cromosómicas se utilizan diferentes técnicas, una de ellas es la citogenética convencional; es una técnica sencilla en la que se visualiza el genoma de manera global, pero puede llegar a presentar fallas en el cariotipo; por lo cual se han introducido técnicas moleculares como la transcriptasa inversa (RT-PCR), y de citogenética molecular como la hibridación genómica comparada (CGH) y la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para complementar a la citogenética clásica. La técnica de FISH ha mejorado la detección en un 90% de los casos, ya que puede detectar alteraciones cromosómicas que no se observan en el cariotipo, pues es una técnica de alta sensibilidad y especificidad (Dixon, 2015).

III. MARCO TEÓRICO

2.1 LEUCEMIA

La leucemia es el tipo de cáncer del tejido hematopoyético caracterizado por una proliferación de las células inmaduras no funcionales provenientes de un linaje linfoide o mieloide, la acumulación de éstas produce la disminución de las células sanas en la médula ósea e incluso puede ocasionar infiltraciones a otros órganos. Se dividen de acuerdo al tipo celular afectado en leucemias linfoides o mieloides, y según el grado de evolución en crónicas y agudas. Las leucemias se originan por una mutación en el material genético, provocando alteraciones en las funciones y mecanismos de señalización normales de la célula, con las cuales se puede producir un bloqueo en la diferenciación celular, en la apoptosis, y por tanto una proliferación no controlada (Hernández, 2009).

2.1.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia aguda representa un 30% de los casos de cáncer, siendo la linfoblástica aguda cinco veces más frecuente que la mieloide aguda. La LLA es el tipo de leucemia que avanza de manera rápida y que provoca la proliferación de una gran cantidad de células blásticas de tipo linfoide. Es importante el diagnóstico de esta enfermedad, porque se ha observado que se presenta en un 80% de los pacientes de edad pediátrica, principalmente en un pico de edad de entre tres y cinco años; el 20% se observa en pacientes adultos. (Zhang y cols., 2015). Además muchos de los casos pediátricos con LLA han tenido buenos resultados, ya que presenta una tasa de supervivencia del 80%, y en adultos del 40% (Moorman, 2012).

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La LLA representa el 12% de todas las leucemias diagnosticadas. Se sabe que el 60% de los casos se presenta en menores de 20 años de edad. Además se ha observado un mayor pico de incidencia con respecto a la edad, principalmente entre los tres y los cinco años. También se sabe que este tipo de leucemia es la más común en pacientes menores de 15 años de edad (aproximadamente en el 80% de los casos), mientras que en los pacientes adultos, la incidencia es del 20% (1/100,000 habitantes al año). También es importante mencionar que presenta una frecuencia mayor en hombres que en mujeres, así como en pacientes caucásicos. Para el caso de México, la LLA se encuentra ubicada en el octavo lugar en incidencia y mortalidad (Figura 1). La tasa de incidencia es de 2/100,000 habitantes, principalmente en la Ciudad de México, Chiapas y Jalisco, en éstos se han presentado la mayor tasa de mortalidad, especialmente en pacientes mayores de 65 años de edad (Sánchez y cols., 2007).

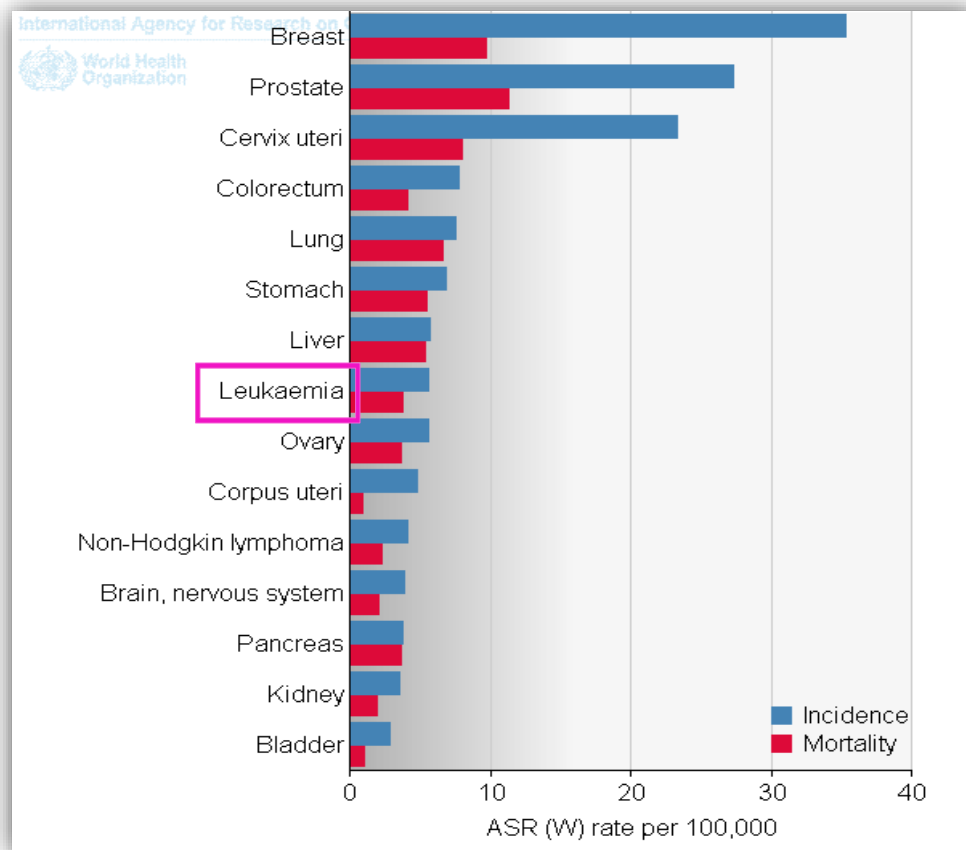


Figura 1. Incidencia y mortalidad por leucemia en México

Tomado de GLOBOCAN, 2012.

2.3 FACTORES DE RIESGO

No se conoce una causa exacta que provoque la LLA, sin embargo, existen factores de riesgo físicos, químicos, biológicos y genéticos que pueden predisponer al desarrollo de esta enfermedad:

- a) Factores físicos: Estos factores están involucrados con la exposición a radiaciones ionizantes. Las consecuencias de éstas dependen muchas veces de otros factores como la intensidad, el tiempo de exposición, la dosis recibida y la diferente susceptibilidad.
- b) Factores químicos: La exposición a sustancias químicas también está asociada a un mayor riesgo de presentar LLA; principalmente las sustancias alquilantes, metales pesados, derivados del benceno y otros hidrocarburos policíclicos. Además se ha encontrado una asociación en el desarrollo de esta enfermedad en el abuso del alcohol y el tabaco durante el embarazo y la exposición postnatal a pesticidas (Ferrís y cols., 1999).
- c) Factores biológicos: Se ha observado también en otros estudios que virus como el *HTVL-1* y el *Citomegalovirus* han tenido un papel en la transformación celular en algunas leucemias (Salinas y cols., 2012).
- d) Factores genéticos: También existe una tendencia familiar, por ejemplo, cuando se tienen hermanos con esta enfermedad puede aumentar el riesgo de desarrollarla. Además, hay una predisposición genética en personas que presentan alteraciones como síndrome de Down, en donde el riesgo es diez veces mayor; o con inestabilidad cromosómica como la anemia de Fanconi. A pesar de esto, ninguno de los factores por sí solo es una causa suficiente (Colldeforns y cols., 2004).

2.4 CLASIFICACIÓN

De manera general las leucemias se clasifican de acuerdo con su evolución en el tiempo y con la célula blástica de la cual se originan. En el caso de la LLA proliferan las células blásticas de linaje linfóide de forma rápida.

Además, se estableció una clasificación de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) con base en tres criterios: la morfología celular, el inmunofenotipo y su perfil citogenético. La FAB inicialmente se basó en la morfología y la citoquímica, pero estos dos criterios no fueron suficientes (Bain, 2014).

2.4.1 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Para determinar la morfología celular de las LLA se toman en cuenta algunas características, como son el tamaño, morfología y grado de maduración de los núcleos, el tamaño celular, la cantidad de citoplasma y la presencia de nucléolos y vacuolas (Jaime, 2012). De acuerdo con estas características se pueden definir tres variantes morfológicas que se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS

Clasificación	Descripción
L₁ LLA	Tamaño celular pequeño a mediano, blastos regulares, con alta proporción nucleocitoplasmática
L₂ LLA	Tamaño celular grande, nucléolos posiblemente visibles, abundante citoplasma
L₃ LLA	Blastos con citoplasma fuertemente basófilo, prominentes vacuolas

Tomado de Bain, 2014.

2.4.2 CLASIFICACIÓN INMUNOFENOTÍPICA

Para el caso del inmunofenotipo, se tienen descritos seis tipos: Pre-pre B, común, pre-B, B, pre-T y T. Este criterio de clasificación se da de acuerdo a las características inmunofenotípicas de los linfoblastos y su grado de maduración, con base en la presencia de marcadores celulares de tipo B o T. A diferencia de las células linfoides normales, los blastos leucémicos tienen una expresión genética descontrolada, por lo cual se produce una variación en el inmunofenotipo, como se observa en el cuadro 2 (Colldeforns y cols., 2004).

CUADRO 2 CLASIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS

Línea celular B	Marcador
Pre-pre B	HLA-DR+, TdT+, CD19+
Común	HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD10+
Pre-B	HLA-DR+, TdT+, CD10±, Ig citoplasmática +
B	HLA-DR+, CD10±, CD19+, Ig+
Línea celular T	
Pre-T	TdT+, CD3 citoplasmático+, CD7+
T	TdT+, CD3 citoplasmático+, CD1a/2/3+

Tomado de Colldeforns y cols., 2004.

2.5. CUADRO CLÍNICO

El desarrollo de la LLA varía de acuerdo con el cuadro clínico que se manifiesta, estas manifestaciones expresan el grado de insuficiencia de la médula ósea, el grado de agudeza y las infiltraciones a otros órganos (Sánchez y cols., 2007).

Los pacientes acuden al médico por infecciones, fiebre de origen infecciosa, hemorragias por causa de trombocitopenia o dolor óseo debido a infiltraciones. Los síntomas que más se suelen presentar son la fatiga, dolor óseo o articular, fiebre, masas anormales y pérdida de peso. Cuando hay infiltración, el hígado, los ganglios linfáticos y el bazo son los órganos más afectados; la esplenomegalia, hepatomegalia y palidez son los signos más comunes, los cuales pueden explicarse por la trombocitopenia y el aumento de blastos en la médula ósea y sangre. Debido a la manifestación de estos signos y síntomas, es posible detectar la LLA en un examen rutinario.

El diagnóstico diferencial no es difícil, ya que son pocas las veces que se confunde con otro tipo de tumores que llegan a invadir la médula ósea, como el neuroblastoma y el linfoma de Hodkin. El aspecto técnico más complejo en cuanto al diagnóstico es la clasificación por marcadores inmunológicos y citogenéticos (Jaime, 2012; Sánchez y cols., 2007).

2.6. TRATAMIENTO

El tratamiento de la LLA está basado en los resultados de los estudios de estratificación de riesgo. El objetivo es eliminar las células leucémicas de manera gradual para conseguir la remisión completa, ésta se puede lograr en un 80% de los niños y en un 40% de los adultos.

De manera general, un adulto se debe tratar con esquemas más intensos de quimioterapia que los utilizados en niños. La quimioterapia es el uso de fármacos que sirven para eliminar las células malignas e inhibir su capacidad de proliferación y división, estos fármacos se administran vía oral o intravenosa. La radioterapia es utilizada cuando se presentan infiltraciones a otros órganos y en pacientes con leucemia de células T. El tratamiento se divide en cuatro etapas:

- ✓ Etapa I: Inducción a la remisión. Consiste en quimioterapia múltiple combinada durante el primer mes de tratamiento.

- ✓ Etapa II: profilaxis del SNC. Su objetivo es eliminar las células que puedan introducirse en el sistema nervioso central.
- ✓ Etapa III: Intensificación posinducción. La finalidad es eliminar por completo las células leucémicas residuales cuando el paciente se encuentra en remisión.
- ✓ Etapa IV: mantenimiento o tratamiento continuo de erradicación. Se eliminan las células residuales durante dos o tres años y se establece una vigilancia durante toda la vida del paciente (Grupo Berlín-Fráncfort-Münster, (s.f.); Jaime, 2012).

3.7. MÉTODOS DE DETECCIÓN

El diagnóstico de la LLA se define con base en las características clínicas, en la biometría hemática y en los estudios que se obtienen del aspirado de médula ósea (Sánchez y cols., 2007).

Para establecer este diagnóstico es importante que la cuenta de blastos linfoides sea mayor al 25% en médula ósea (Colli y cols., 2015). Teniendo este porcentaje, se puede realizar un estudio para detectar las alteraciones cromosómicas.

Para esto se utilizan diferentes técnicas, la principal y la más utilizada es la citogenética clásica. Este método consta básicamente en la visualización de los cromosomas en un cariotipo, para esto se realiza un cultivo celular y la obtención de células en división. La citogenética clásica permite detectar las alteraciones cromosómicas superiores a 10Mb mediante la visualización de este cariotipo (Hernández y cols., 2011).

Además de la citogenética, también se utilizan métodos de biología molecular como la técnica de la transcriptasa reversa (RT-PCR), la cual detecta los transcritos formados por las translocaciones que se presentan en las leucemias, un ejemplo de estos son los puntos de ruptura en las regiones de los genes *BCR* y *ABL* (Jiménez y cols., 2008).

Por otro lado, están las técnicas de citogenética molecular, como la hibridación genómica comparada (CGH), que permite detectar las ganancias o pérdidas de material genético, como las duplicaciones y deleciones, éstas pueden ser de regiones pequeñas o cromosomas completos; sin embargo, no es posible detectar alteraciones balanceadas como las translocaciones (Clavijo, 2013).

3.7.1. HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA

Una de las técnicas más utilizadas en la citogenética molecular es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), ya que puede detectar secuencias específicas incluso cuando los núcleos están en interfase; y es capaz de detectar alteraciones numéricas y estructurales, como las translocaciones y las deleciones.

La técnica de FISH es una técnica sencilla que consiste en la hibridación de una sonda de ADN marcada con un fluoróforo, complementaria a una secuencia específica de interés en muestras fijadas en portaobjetos. Su sensibilidad varía entre 10^{-2} a 10^{-4} Mb dependiendo del tipo y cantidad de sonda utilizada, el tamaño de la sonda puede variar desde Kb hasta 1 Mb. Los diferentes tipos de sondas que se pueden utilizar son:

- ✓ **Centroméricas o de ADN satélite:** son sondas α o β satélite que hibridan en secuencias repetitivas de la región centromérica del cromosoma. Son útiles para detectar alteraciones cromosómicas numéricas.
- ✓ De secuencia única o locus específico: hibridan con secuencias cromosómicas específicas que corresponden a una banda cromosómica o a un gen. Con este tipo de sondas se pueden detectar tanto alteraciones cromosómicas estructurales como numéricas.
- ✓ De pintado cromosómico: hibridan con secuencias de cromatina en determinados brazos o en cromosomas completos. Con éstas también es posible detectar alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales pero solo en células en metafase. Éstas son útiles cuando los cromosomas son de mala calidad (Acevedo, 2000; Martínez, 2014).

Las sondas centroméricas pueden utilizarse de manera simultánea, esto aumenta la sensibilidad de la técnica y pueden detectarse clonas hiperdiploides en LLA. Por otro lado, el uso de sondas de secuencia única sirven para observar alguna anomalía característica de la estirpe leucémica, como la t(9;22) (Acevedo, 2000; Volpi, 2008).

La técnica de FISH es muy útil como ayuda complementaria al estudio citogenético convencional, pues se ha observado que muchos de los casos con LLA presentan fallas en el cariotipo. Algunas de éstas pueden ser un escaso crecimiento celular, bajo índice mitótico o la obtención de metafases de mala calidad; de tal manera que el uso de FISH ha mejorado la eficiencia del análisis citogenético y

contribuido a la observación de nuevas anomalías cromosómicas, pues es una técnica de alta sensibilidad y especificidad (Wan, 2014).

3.8. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El análisis citogenético de la LLA nos permite identificar las diferentes alteraciones cromosómicas que son de gran importancia para el pronóstico, el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad para el paciente. Los pacientes con LLA frecuentemente presentan un cariotipo con alteraciones, éstas pueden ocurrir en el número de los cromosomas, o en su forma estructural (Ramos y cols., 2001).

Las alteraciones cromosómicas además pueden ser de dos tipos: balanceadas y no balanceadas. En la LLA las más comunes son las balanceadas, en ellas ocurren cambios sin que se pierda o gane material cromosómico, por ejemplo, las translocaciones o las inversiones. Y las alteraciones no balanceadas, son aquellas en donde ocurre una pérdida o una ganancia en el material genético, éstas pueden ser de pequeños segmentos como las deleciones, o grandes, como la pérdida o ganancia de cromosomas completos. La mayoría de los genes afectados en estas mutaciones intervienen en los procesos de regulación de la proliferación y muerte celular (Salinas y cols., 2012).

3.8.1. ALTERACIONES NUMÉRICAS

Dentro de las alteraciones cromosómicas numéricas se encuentran las poliploidías y las aneuploidías.

Las poliploidías consisten en la ganancia de dos o más juegos cromosómicos que son múltiplos del número haploide 23; las triploidías por ejemplo, tienen una dotación de 69 cromosomas y las tetraploidías de 92 cromosomas. Por otro lado, las aneuploidías son aquellas en donde se presentan ganancias o pérdidas de material sin incluir el juego completo cromosómico; las más frecuentes son las trisomías (ganancia de un cromosoma) y las monosomías (pérdida de un cromosoma), y pueden afectar a uno o más cromosomas autosómicos o sexuales (Alonzo, 2007; Martínez, 2014).

2.8.1.1 HIPERDIPLOIDÍA

En el caso de las hiperdiploidías, se encuentran subdivididas de acuerdo al número de cromosomas ganados en hiperdiploidías altas e hiperdiploidías bajas. Cuando se presentan más de 50 cromosomas se dice que es una hiperdiploidía alta; y cuando el número va de 47 a 50 cromosomas se le conoce como hiperdiploidía baja. Por el contrario, cuando se pierden cromosomas, se conocen como hipodiploidías (menos de 46 cromosomas) (Nacho, 2003).

En la LLA los pacientes que presentan hiperdiploidía alta (20-30% de los casos) tienen un pronóstico favorable. Aunque la mayoría de los cromosomas están implicados, los que más se ven involucrados son el cromosoma 21, seguido de los cromosomas 6, 4, 8, 10 y 14. Los pacientes que presentan hiperdiploidía baja (13% de los casos) se asocian con mayor frecuencia a alteraciones estructurales, sin embargo, cuando estos presentan trisomías 4 y 10 tienen un mejor pronóstico, con una supervivencia libre de enfermedad a los 4 años del 96%. Mientras que los pacientes con hipodiploidías con número modal menor a 44 cromosomas se encuentran asociados a un pronóstico adverso, con una supervivencia menor a los 11 meses (Martín, 2001; Ramos y cols., 2001).

3.8.2. ALTERACIONES ESTRUCTURALES

En cuanto a las alteraciones cromosómicas estructurales se incluyen diversas anomalías como las translocaciones, las deleciones, duplicaciones, inversiones, isocromosomas y reordenamientos. En la LLA las más comunes son las translocaciones, detectándose en un 60% de los casos con leucemia, en este tipo de alteraciones se presenta un intercambio del material genético entre cromosomas no homólogos; estas translocaciones pueden ser de tipo recíprocas, cuando el intercambio es entre cromosomas diferentes, o de tipo robertsonianas, cuando dos cromosomas acrocéntricos no homólogos se unen por el centrómero. En la LLA las alteraciones cromosómicas estructurales como la translocación t(9;22) y t(4;11) están asociadas con un mal pronóstico (Alonzo, 2007; Martín, 2001).

3.8.2.1. TRANSLOCACIÓN t(9;22) *BCR-ABL*

En la LLA la translocación t(9;22) se presenta en un 20-30% de los casos en adultos y en un 2-5% de los casos en niños. Esta translocación se produce cuando un fragmento del gen *ABL* ubicado en el brazo largo del cromosoma 9 se inserta en el gen *BCR* del brazo largo del cromosoma 22, involucrando a las regiones q34 y q11 respectivamente, al producto de esta fusión se le ha denominado cromosoma Filadelfia (Figura 2) (Artigas, 2006; Farias, 2004).

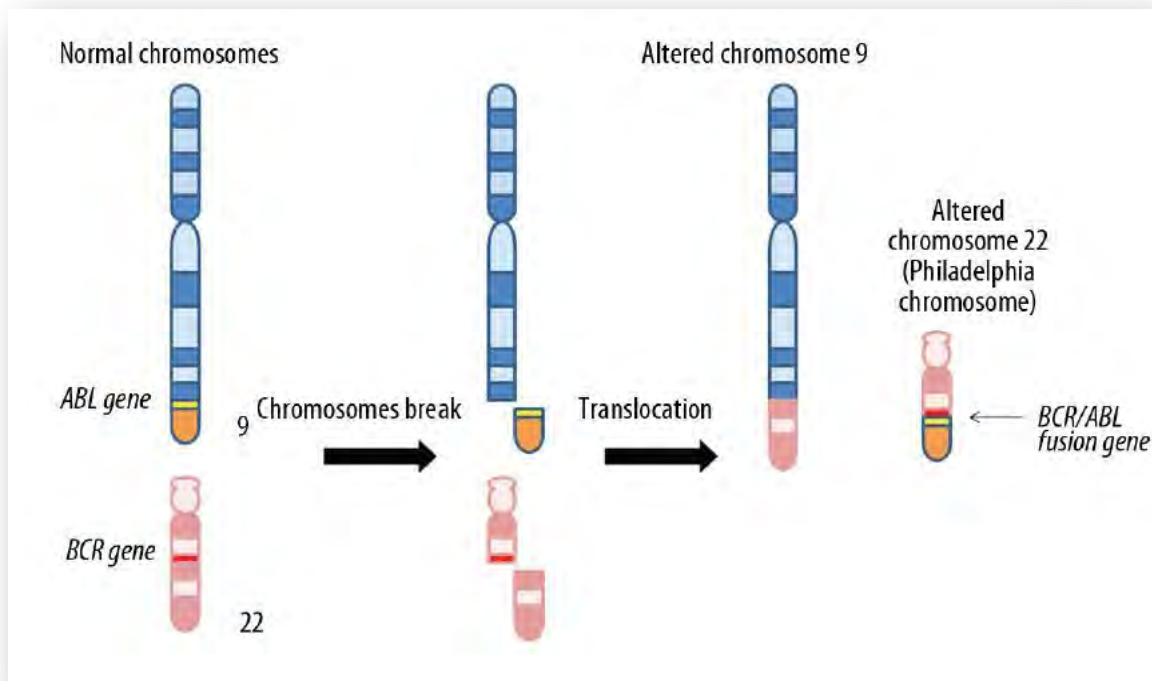


Figura 2. Translocación *BCR-ABL*t(9;22)(q34;q11)

Formación del cromosoma Filadelfia por el intercambio cromosómico entre los cromosomas 9 y 22.
Tomado de Kosior y col., 2016

La translocación de estos genes da origen a un punto de rompimiento conocido como punto de ruptura menor o m-bcr. Se produce una ruptura en el exón e1 y e2 del gen *BCR* (Figura 3) y en el exón a1 y a2 del gen *ABL* (Figura 4), dando como resultado el reordenamiento e1a2. El origen de este reordenamiento produce una proteína de fusión de 190kDa ($p190^{BCR-ABL1}$) con una actividad tirosina cinasa muy elevada, la cual le confiere propiedades de proliferación celular alta y leucemogénesis. Además puede presentarse en menor frecuencia el punto de ruptura mayor o M-bcr, que mayormente se presenta en la leucemia mieloide crónica. Este punto de rompimiento se da por la ruptura en los exones b2 o b3 del gen *BCR* y del exón a2 del gen *ABL*, obteniendo dos posibles reordenamientos, b2a2 (encontrado en un 25-30%) o b3a2 (encontrado en un 55-60%) y produciendo una proteína de fusión $p210^{BCR-ABL1}$ de 210kDa con actividad tirosina cinasa. La presencia del gen de fusión *BCR-ABL* en la LLA se asocia a un pronóstico adverso y los pacientes comúnmente presentan una remisión de corta duración (Artigas, 2006; Farias, 2004; Pignon, 1998).

El gen *BCR-ABL* tiene un papel importante en la patogénesis y el curso clínico, y la proteína que se produce presenta una actividad incontrolada y provoca una falla en la regulación del ciclo celular, en la inhibición de la apoptosis y por tanto, en la proliferación; además se produce una disminución en la adhesión de las células leucémicas con las células del estroma en la médula ósea, provocando así la salida de éstas al torrente sanguíneo (Bravo, 2009; Kosior, 2016).

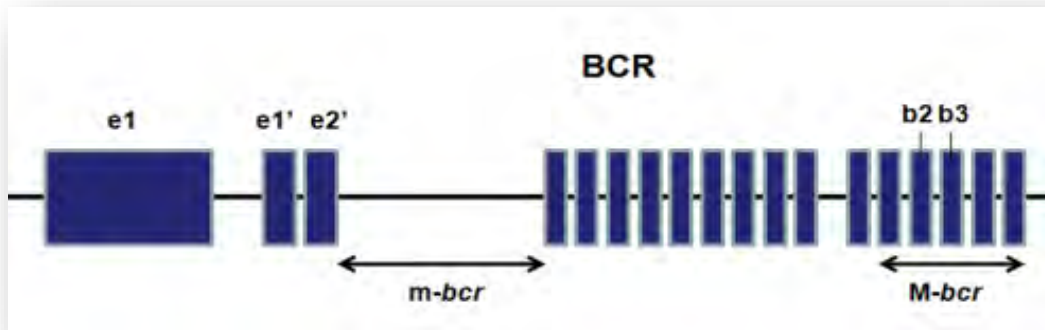


Figura 3. Puntos de rompimiento en BCR

Cuando la ruptura ocurre en la región m-bcr se produce una proteína BCR-ABL de 190 kDa. Cuando ocurre en M-bcr incluye a los exones b2 y b3, produciendo una proteína de 210 kDa. Tomado y modificado de Bravo, 2009.

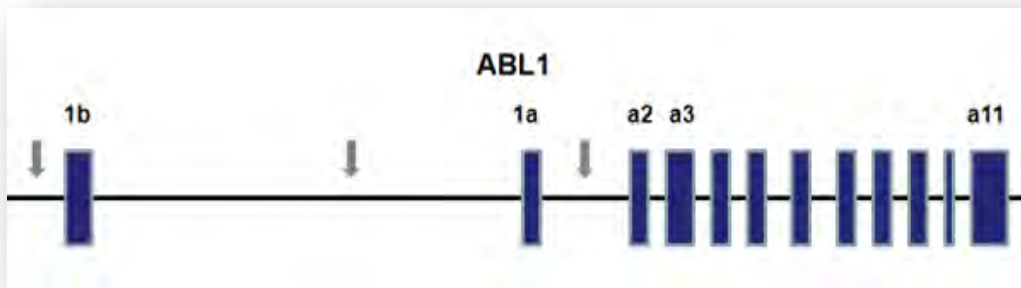


Figura 4. Puntos de rompimiento en ABL

Para la formación del gen de fusión BCR-ABL, la ruptura ocurre principalmente entre los exones 1a y a2. Tomado de Bravo 2009.

3.8.2.2. TRANSLOCACIÓN t(12;21) *TEL-AML*

Otra alteración estructural es la translocación t(12;21) que se produce entre los genes *TEL* (*ETV6*) ubicado en el cromosoma 12 y *AML* (*CBFA2*) del cromosoma 21, produciendo el gen de fusión *TEL-AML* (Figura 5). Esta translocación es la más frecuente dentro de las alteraciones cromosómicas estructurales en la LLA de edad pediátrica y está asociada al inmunofenotipo precursor de células B, observándose en un 20 a 30% de los casos, y en un 3% de los casos de adultos. En los pacientes con edades de 2 a 5 años de edad, con un bajo recuento de leucocitos y con inmunofenotipo de células B se presenta con una mayor frecuencia. Los pacientes con LLA que presentan esta translocación tienen una remisión completa, ya que se ha asociado a un buen pronóstico (Artigas, 2006; Farias, 2004).

Los puntos de ruptura de los genes *TEL* y *AML* ocurren en el intrón 5 del gen *TEL* y en el intrón 1 del gen *AML*, dando como resultado la fusión del exón 1 al 5 del gen *TEL* con el exón 2 al 8 del gen *AML*, de tal manera que el gen quimérico contiene las primeras 1033 bases del gen *TEL* y casi todo el gen *AML*. Esta proteína quimérica se ha visto implicada en la proliferación y supervivencia de las células precursoras B, así como en la inhibición de la actividad de estos genes, que normalmente se encuentran involucrados en funciones de diferenciación y proliferación en las células hematopoyéticas (Morales, 2002; Nacho, 2003).

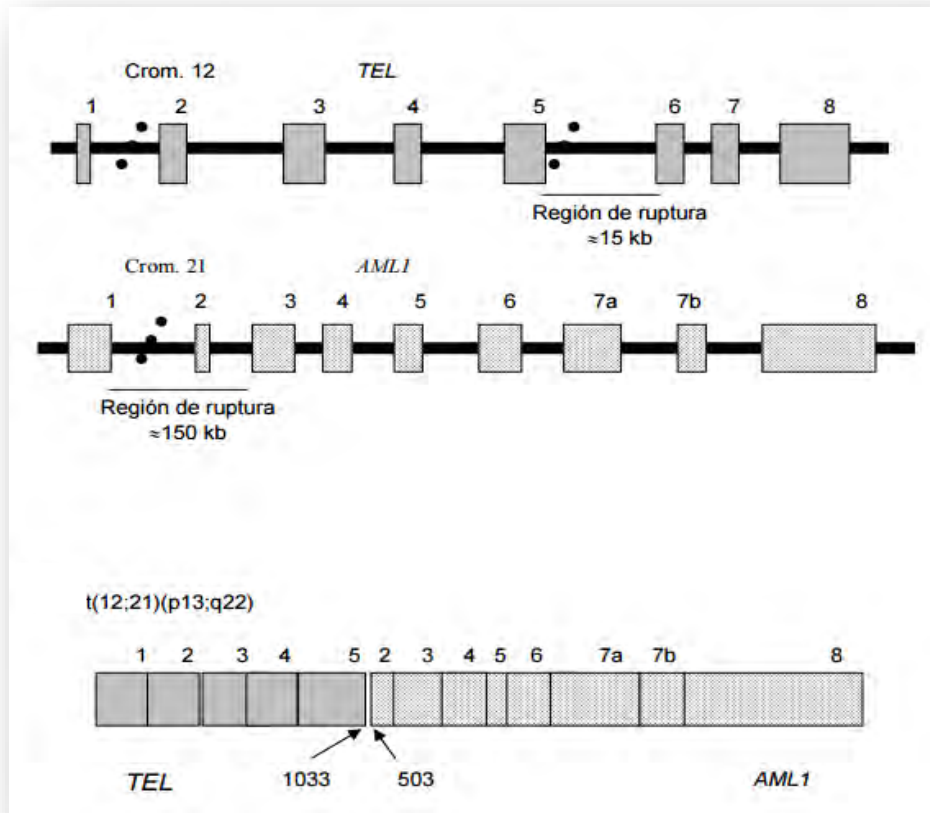


Figura 5. Fusión génica TEL-AML

Regiones de ruptura de los genes TEL y AML involucrados en la translocación t(12;21) (p13;q22) y estructura del transcrito quimérico TEL-AML. Tomado de Morales 2002.

3.9. FACTORES PRONÓSTICO

Con la ayuda de las técnicas antes mencionadas se ha podido conocer la incidencia de las alteraciones cromosómicas en los pacientes adultos y niños. Por ejemplo, la translocación entre el cromosoma 12 y el 21, y las hiperdiploidías tienen una incidencia mayor en los pacientes de edad pediátrica, especialmente en niños de 3 a 5 años. En el caso de los pacientes adultos, la translocación t(9;22) es la que más se presenta (Díaz, 2007).

Estas técnicas también han facilitado la elección de un tratamiento adecuado para cada caso, ya que se han establecido tres grupos de riesgo que determinan el pronóstico del paciente: riesgo favorable, riesgo intermedio y riesgo adverso. Respecto a esto, en el cuadro 3 se observan algunas de las alteraciones que se presentan en pacientes niños y adultos:

CUADRO 3 GRUPOS DE RIESGO

Alteraciones cromosómicas y genes involucrados	Pronóstico	
	Niños	Adultos
Translocaciones:		
• t(5;14)(q35;q32) <i>CALM-AFA10</i>	• Desfavorable	• Desfavorable
• t(1;14)(p34;q11) <i>TAL1</i>	• Favorable	• No analizado
• t(10;14)(q24;q11) <i>TLX1</i>	• Favorable	• Favorable
• t(9;22)(p24;q11.2) <i>BCR-ABL1</i>	• Desfavorable	• No analizado
Deleciones:		
• <i>CDKN2A/2B</i>	• Favorable	• Desfavorable
• <i>BCL11B</i>	• No analizado	• Favorable
• <i>TP53</i>	• No analizado	• Desfavorable
Amplificaciones:		
• <i>NUP214-ABL1</i>	• Desfavorable	• No analizado
Deleciones puntuales:		
• <i>NOTCH1/FBWX7</i>	• Favorable	• Favorable
• <i>DNMT3A</i>	• Sin impacto	• Desfavorable
• <i>IDH1/2</i>	• No analizado	• Desfavorable
• <i>WT1</i>	• No analizado	• Desfavorable
• <i>RUNX1</i>	• Sin impacto	• Desfavorable

Tomado y modificado de Genesca y cols., 2015.

Además de las alteraciones cromosómicas, existen otros factores que pueden determinar el grupo de riesgo del paciente, por ejemplo los pacientes que tienen entre uno y nueve años de edad de género femenino suelen tener un pronóstico favorable, así como aquellos que presentan un inmunofenotipo de células pre-B y alteraciones cromosómicas como las hiperdiploidías y trisomías 4 y 10, como se muestra en el cuadro 4:

CUADRO 4 FACTORES PRONÓSTICO EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LA INFANCIA

Factor de riesgo	Pronóstico favorable	Pronóstico desfavorable
Edad	1-9 años	<1 y >9 años
Género	Femenino	Masculino
Hepatoesplenomegalia	Ausente	Masiva
Leucocitos al diagnóstico	<50,000 por μ L	>50,000 por μ L
Tipo morfológico (FAB)	L ₁	L ₂
Respuesta a la inducción en el día 28	Sin blastos periféricos	Con blastos periféricos
Estado del SNC	SNC 1	SNC 2 o 3
Citogenética	Hiperdiploidía, trisomías 4 y 10	Hipodiploidía, t(9;22), t(4;11)
Genética molecular	TEL-AML1	Reordenamiento del gen MLL
Inmunofenotipo	Precursor de células B	Precursor de células T, LLA de células B maduras

Tomado y modificado de Pérez, 2012.

IV. ANTECEDENTES

De acuerdo con Pérez y cols., (2001) realizó un estudio en México donde encontró que el 77.1% de 150 pacientes estudiados presentaban cariotipos con alteraciones, de los cuales 20 tuvieron tanto alteraciones numéricas como estructurales. De los pacientes con alteraciones numéricas, las más frecuentes fueron las hiperdiploidías de 51-65 cromosomas y de 47-50 cromosomas, siendo los cromosomas 4, 6, 18 y 21 los más implicados; para las hipodiploidías, los más implicados fueron el cromosoma 6, 17, 18 y 21. En cuanto a las anomalías estructurales, la más frecuente fue la t(9;22), seguido de la t(1;19).

Un estudio realizado en México a 53 pacientes de edad pediátrica por Jiménez y cols., (2008) obtuvo que el 30% fueron positivos a translocaciones, de éstos el 13.5% fueron positivos a la t(12;21), el 3.8% a la t(9;22), el 11.5% a t(1;19) y solo un 1.8% fueron positivos a las últimas dos.

De acuerdo a Calderón y cols., (2012) realizó un estudio mediante citogenética convencional y FISH, y observó que el 34.7% de los pacientes fueron portadores de alteraciones en los genes *BCR* y *ABL*, 7 de los cuales presentaron fusión entre ambos genes y solo uno de ellos tuvo la ganancia de ambos loci sin presentar la fusión. El 21% fueron portadores de alteraciones en los genes *TEL* y *AML1*, solo uno fue positivo a la fusión y el resto presentó ganancias de ambos loci sin presentar la fusión.

Otro estudio realizado por Barbosa y cols., (2015) en 247 pacientes pediátricos con LLA, observó que el 83% tuvieron al menos una alteración cromosómica, de los cuales, 226 presentaron la t(12;21), 215 con la t(1;19), 229 con la translocación de los genes *BCR/ABL* y 155 presentaron hiperdiploidías.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LLA es la octava causa de muerte por neoplasias en México. Además presenta una frecuencia del 80% en la edad pediátrica y su incidencia es más alta en hombres que en mujeres. Siendo un problema de salud pública.

Los pacientes con LLA comúnmente presentan un cariotipo alterado, pero muchas veces este tipo de estudio no resulta concluyente, por lo que se requiere adicionar otras metodologías para obtener el resultado.

VI. JUSTIFICACIÓN

El estudio citogenético permite identificar las alteraciones cromosómicas presentes en los pacientes con LLA, este tipo de estudio es importante, ya que proporciona datos sobre el diagnóstico, el pronóstico al tratamiento y permite elegir con más certeza los fármacos que deben prescribirse en cada caso. La técnica de FISH es un método alternativo de la citogenética molecular que permite localizar las alteraciones aun cuando no hay metafases disponibles, o cuando el cariotipo es de mala calidad, ya que es una técnica de alta especificidad y sensibilidad. De esta manera, es posible proporcionar un resultado al paciente.

VII. HIPÓTESIS

La técnica de FISH es un método sensible y específico que permite localizar alteraciones cromosómicas específicas cuando existen fallas en el cariotipo, por lo tanto se podrán detectar ambas alteraciones, tanto numéricas como estructurales, en los pacientes con hipocelularidad y material de mala calidad.

VIII. OBJETIVOS

GENERAL

Detectar alteraciones cromosómicas por medio de citogenética clásica e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de *novo*.

PARTICULARES

1. Realizar el estudio citogenético a pacientes con LLA de *novo*.
2. Detectar alteraciones numéricas utilizando sondas centroméricas: 4, 10, 21, XY, y alteraciones estructurales utilizando la sonda t(12;21) por medio de FISH en pacientes pediátricos (0-14 años).
3. Detectar alteraciones estructurales utilizando la sonda t(9;22) por medio de FISH en pacientes adultos (mayores de 15 años).
4. Correlacionar ambas técnicas de detección con los resultados clínicos y hematológicos.

IX. MATERIAL Y MÉTODO

8.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LLA en condiciones estériles.

8.1.2 SIEMBRA Y COSECHA

Se realizó una técnica de cultivo celular por duplicado, agregando 5mL de medio marrowmax suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y se incubaron a 37°C durante 48hrs.

A cada tubo se le agregaron 2 gotas de colchicina y se incubaron por 20 minutos. Se adicionaron 8mL de solución hipotónica y se incubaron a 37°C por 40 min. Pasado este tiempo se centrifugaron y se obtuvo el botón celular, el cual se fijó con solución carnoy 3:1 y posteriormente se realizaron cuatro lavados con esta misma solución. Se obtuvieron las laminillas para la realización del cariotipo y se almacenaron 4 por cada caso a -70°C para la realización del FISH.

8.2 OBTENCIÓN DEL CARIOTIPO

Para la obtención de bandas de los cromosomas se realizó la técnica de bandeo G, que consistió en hacer pasar cada laminilla por un tren de bandeo con las siguientes soluciones: buffer pH 7 con 200 µL de tripsina, agua, buffer pH 7, buffer pH 6.8 con 5mL de colorante Wright y buffer pH 6.8 con 5mL de colorante giemsa. Con un intervalo de tiempo de 8 a 20 segundos, el tiempo varió de acuerdo con los resultados obtenidos.

8.2.1 ANÁLISIS

Se analizaron hasta 20 metafases, utilizando un microscopio Zeiss y el software IKAROS de MetasystemZeiss y los resultados se reportaron de acuerdo a la nomenclatura cromosómica internacional (ISCN, 2013). Un criterio importante para reportar las alteraciones cromosómicas es que deben encontrarse al menos tres células alteradas en el caso de las alteraciones numéricas y dos en el caso de las alteraciones estructurales.

8.3 HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA

8.3.1 SONDAS

Para las alteraciones numéricas se utilizaron las sondas centroméricas de los cromosomas 4, 10, 21, X e Y. Para las alteraciones estructurales, las sondas para las translocaciones t(9;22) y t(12;21), correspondientes a los genes *BCR-ABL* y *TEL-AML1* respectivamente. Las sondas se aplicaron a las muestras de la siguiente manera:

- ✓ Pacientes ≤ 14 años: sondas centroméricas, t(12;21) y t(9;22).
- ✓ Pacientes ≥ 15 años: t(9;22).

Además las sondas centroméricas se aplicaron de manera simultánea para los cromosomas 4 y 21, y para los cromosomas 10, X e Y.

8.3.2 HIBRIDACIÓN DE SONDAS CENTROMÉRICAS (VYSIS)

Se maduraron las laminillas en una solución de 2xSSC a 37°C durante 30 minutos. Después se deshidrataron en una serie de etanol al 70, 80 y 100%. Para la desnaturalización se colocaron las laminillas en una solución de formamida al 70%/2xSSC durante 2 minutos a 72°C. Se deshidrataron nuevamente en series de etanol al 70, 80 y 100%.

Posteriormente se realizó la mezcla de la sonda (1 μ L soda, 3 μ L buffer de hibridación y 1 μ L H_2O) y se desnaturalizó a 72°C por 5 minutos. Después se aplicaron 5 μ L en cada área a analizar; se aplicó un cubreobjetos y se selló. Para la hibridación, se colocaron las laminillas en una caja húmeda protegida de la luz a 37°C durante la noche.

Después de esto se retiraron los cubreobjetos de las laminillas y se lavaron en una solución de 0.3% tween80/0.4xSSC a 72 \pm 1°C durante 2 minutos, seguido por una solución de 0.1% tween80/2xSSC durante un minuto a temperatura ambiente. Finalmente se aplicaron 5 μ L de DAPI en cada área y se colocó un cubreobjetos.

8.3.3 HIBRIDACIÓN DE SONDAS DE LOCUS ESPECÍFICO (CYTOCELL)

Se maduraron las laminillas en una solución de 2xSSC a 37°C durante 30 minutos y luego se deshidrataron en una serie de etanol al 70, 85 y 100% durante 1 minuto en cada uno. Después se precalentaron las laminillas a 37°C durante 5 minutos. Se aplicaron 5µL de sonda en cada laminilla, se aplicó un cubreobjetos y se selló. Se desnaturalizó la muestra y la sonda simultáneamente a 75°C durante 5 minutos. Posteriormente se hicieron hibridar en una caja húmeda protegida de la luz a 37°C durante la noche.

Después se retiraron los cubreobjetos de las laminillas y se lavaron en una solución de 0.3% tween80/0.4xSSC a 72±1°C durante 2 minutos, seguido por una solución de 0.05% tween80/2xSSC durante un minuto a temperatura ambiente. Finalmente se aplicaron 5µL de DAPI en cada área y se colocó un cubreobjetos.

8.3.4 ANÁLISIS

Para analizar las alteraciones cromosómicas se utilizó un control por cada tres casos y se analizaron hasta 200 núcleos por sonda para las alteraciones numéricas y hasta 200 núcleos por cada muestra para las alteraciones estructurales. El análisis fue de manera simultánea para los cromosomas 4 y 21, y los cromosomas 10 y X/Y, y de manera independiente para las translocaciones t(9;22) y t(12;21); utilizando el software ISIS (MetasystemZeiss). Finalmente se calculó el valor promedio de las células anormales de los controles y se les sumó tres veces la desviación estándar (valor de corte).

Las sondas para las alteraciones cromosómicas numéricas se encuentran marcadas de la siguiente manera:

- ✓ *BCR-ABL*: La sonda se extiende 169Kb centromérica a *BCR* e incluye los genes *GNAZ* y *RAB36*. Una segunda sonda cubre una región de 148Kb, que se ubica a 261Kb telomérica a *BCR*. Ambas marcadas en verde. Para *ABL1*, la sonda cubre 346Kb desde la mitad del gen *FUBP3* hasta un punto de 64Kb telomérico al *ABL1*. Una sonda adicional cubre una región de 173Kb que se extiende por todo el gen *ASS1*. La sonda *ASS1* se sitúa a 212Kb del extremo centromérico del gen *ABL1*. Ambas marcadas en rojo (Figura 6).
- ✓ *TEL-AML1*: La sonda para *TEL1* cubre una región de 180Kb entre los marcadores D12S845 y D12S89, y una segunda sonda centromérica al gen *TEL1 (ETV6)*, que se extiende 168Kb desde

el marcador D12S1898. Ambas marcadas en rojo. Para *AML1*, existen dos sondas marcadas en verde, una cubre una región de 148Kb centromérica al gen *AML1* (*RUNX1*), que incluye el gen *CLIC6*, y la segunda cubre una región de 167Kb, que incluye los marcadores D21S1895 y D21S1921 (Figura 7).

De tal manera que para ambas alteraciones los núcleos se pueden observar como se muestra en la figura 8.

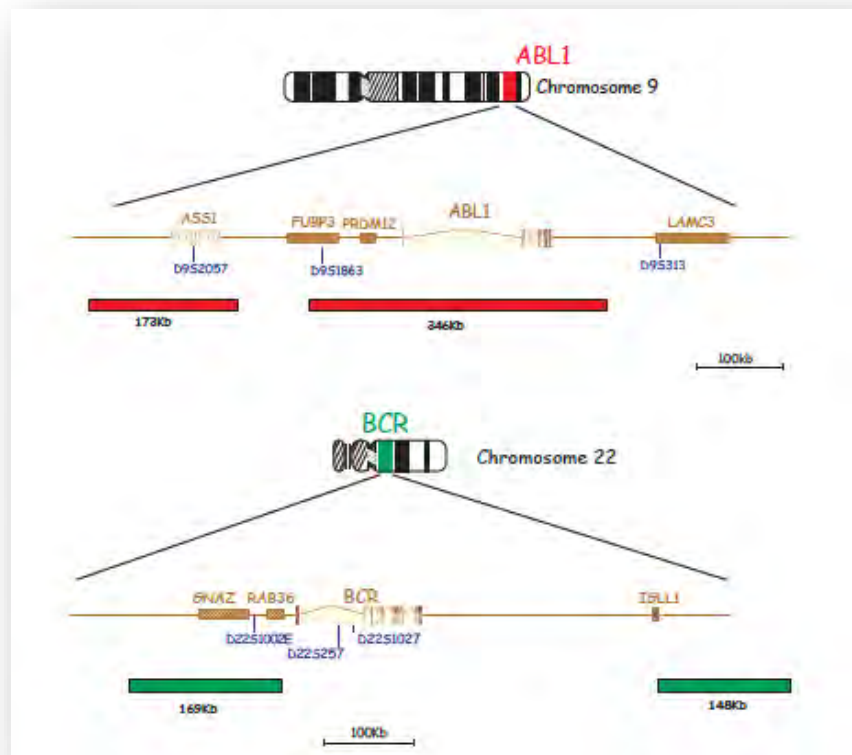


Figura 6. Marcaje de sonda para BCR-ABL1

ABL1 marcado en rojo y *BCR* marcado en verde.

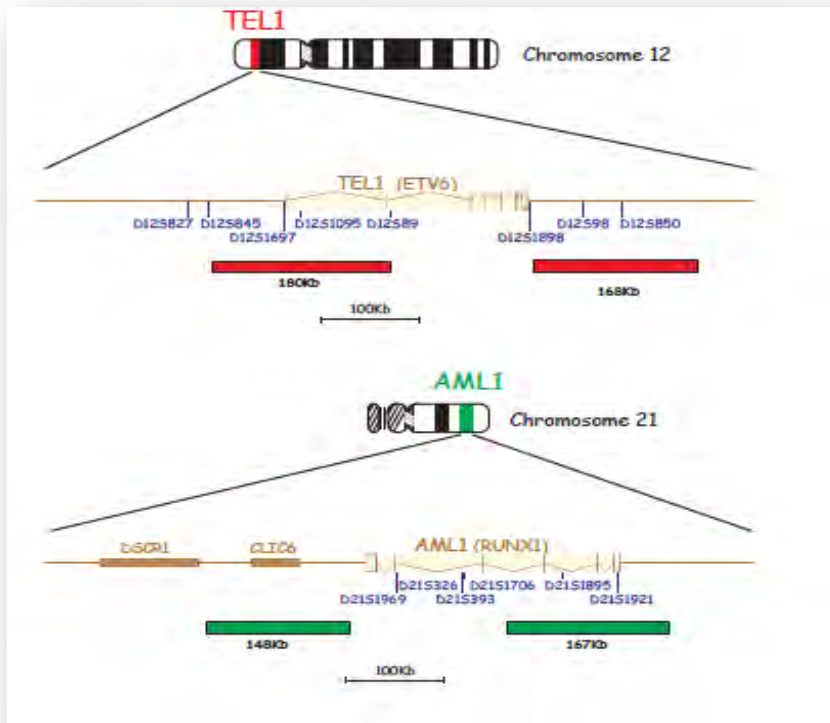


Figura 7. Marcaje de sonda para TEL-AML1

TEL marcado en rojo y AML marcado en verde.

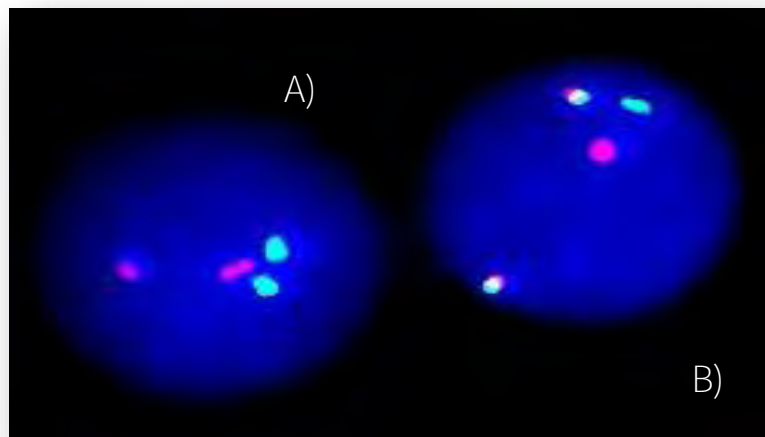


Figura 8. FISH en núcleos interfásicos

A) Núcleo normal: dos señales verdes y dos señales rojas. B) Núcleo con translocación: dos señales fusionadas, una señal verde y una señal roja.

8.3.4.1 CRITERIOS DE ANÁLISIS

Para el análisis de la FISH se aplicaron los criterios siguientes:

- ✓ Núcleos definidos, no sobrelapados, rotos ni dañados.
- ✓ Los núcleos analizados se encontraban en un área donde el 90% presentaba señales de hibridación.
- ✓ Las señales de hibridación se encontraban dentro del núcleo.
- ✓ Las señales presentaron la misma intensidad y estaban separadas por el diámetro de una señal.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se incluyeron 17 pacientes con LLA. La proporción de género observada fue de 9/17 del género femenino y del 8/17 del género masculino. Las muestras de los pacientes se dividieron por grupos **de edad en niños (≤ 15 años) y adultos (≥ 16 años), obteniendo 4 y 13 muestras respectivamente. En el grupo de niños se obtuvo un rango de edad entre 1 y 14 años, con una media de 8.5 años y la edad más frecuente fue de 14 años; mientras que en el grupo de adultos, el rango de edad fue de 16 a 56 años, con una media de 30.7 años, siendo la edad más frecuente 18 años. En cuanto a la clasificación morfológica e inmunofenotípica de la LLA se presentaron con la misma frecuencia la morfología L_2 y el inmunofenotipo pre-B en 16 de 17 casos y la morfología L_1 y el inmunofenotipo B en 1 de 17 casos, estos datos se muestran en el cuadro 5.**

CUADRO 5 CARACTERÍSTICAS INICIALES Y CLASIFICACIÓN DE PACIENTES CON LLA

CARACTERÍSTICA	NÚMERO
Género	
Femenino	9/17
Masculino	8/17
Edad	
Niños ≤ 15	4/17
Adultos ≥ 15	13/17
Clasificación morfológica	
L_1	1/17
L_2	16/17
Clasificación inmunofenotípica	
PRE-B	16/17
B	1/17

La frecuencia de esta enfermedad es ligeramente mayor en el género masculino y edad pediátrica, con un pico de incidencia entre los 3 y 5 años, los pacientes que tienen entre 1 y 9 años de edad se encuentran asociados a un pronóstico favorable (Jaime, 2012). De acuerdo a Quero y cols., (2012)

estudió un grupo de 110 pacientes, de los cuales el 45.5% fueron mujeres y el 54.5% hombres; esta mayor frecuencia en hombres coincide con otro estudio realizado por Combariza y cols., (2007), en donde reporta una mayor frecuencia de pacientes masculinos. Por otra parte, Zaliova y cols., (2016) estudió un total de 22 muestras, de las cuales, 13 pertenecían a pacientes pediátricos y 9 a pacientes adultos. En este trabajo la proporción de género y edad no coinciden con lo reportado, lo cual puede deberse a la poca cantidad de muestras obtenidas y a que en la LLA de células B existe un ligero predominio de los hombres, con una relación 1.4 a 1 (Ferrís, 1999).

La morfología L_1 y el inmunofenotipo pre-B se asocian a un buen pronóstico; y la morfología L_2 y el inmunofenotipo de células B maduras a un pronóstico adverso (Jaime, 2012). La morfología más frecuente en las leucemias pediátricas es la L_1 , presentándose en un 75% de los casos (Sánchez y cols., 2007), sin embargo en este trabajo se observó con mayor frecuencia la morfología L_2 debido a que se captaron más pacientes de edad adulta, ya que se ha observado que la morfología de tipo L_2 se presenta mayormente en los pacientes adultos (Heim, 2015). El inmunofenotipo más predominante es el linaje de las células B (76% de los casos) (Sánchez, 2007). Un estudio realizado por Marsán y cols., (2002) obtuvo una mayor frecuencia de pacientes con LLA de estirpe B de un total de 117 casos estudiados. Estos datos coinciden con este trabajo, pues todos los pacientes presentaron inmunofenotipo de células B.

Se realizó el estudio citogenético a todos los pacientes incluidos a partir de muestras de médula ósea mediante la técnica de bandeo G. De los 17 pacientes incluidos, 5 obtuvieron resultado, 9 presentaron hipocelularidad y 3 presentaron metafases de mala calidad. De los pacientes que obtuvieron resultado, 4/5 presentaron un cariotipo alterado, de los cuales, 3 presentaron alteraciones estructurales y solo uno presentó alteraciones numéricas (cuadro 6 y 10). Se observa que más de la mitad de los pacientes no obtuvo un resultado de cariotipo, esto puede deberse a que existe una posibilidad de fallo en la realización del cultivo celular de alrededor del 20% (Castillo, 2014); sin embargo otros autores mencionan que el rango de cultivos no exitosos oscila entre 6.4% y 34.5% en muestras de médula ósea (Vargas, 2011). Esta posibilidad de fallo ocurre debido a varios factores: una mala obtención de la muestra o su posible coagulación, a la obtención de metafases insuficientes o inadecuadas, a la presencia de alteraciones complejas y a una sobrepoblación mitótica de las células no leucémicas sobre las células leucémicas; lo cual dificulta la detección de células en división para el análisis en médula ósea (Venegas, 2004).

En el cuadro 6 se muestra el estudio citogenético de los pacientes de edad pediátrica, de los cuales, un solo caso obtuvo cariotipo con resultado (caso 4). Este caso presentó una del(10)(p12) que se puede observar en la figura 9.

CUADRO 6 ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS

CASO	EDAD/GÉNERO	MATERIAL CROMOSÓMICO	CARIOTIPO	NÚMERO DE METAFASES ANALIZADAS
1	1/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
2	14/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
3	14/M	Metafases de mala calidad	Sin resultado	0
4	5/F	Obtuvo resultado	46,XX,del(10)(:p12→qter)[5]/46,XX[5]	10

**Resultados basados en (ISCN,2013)*

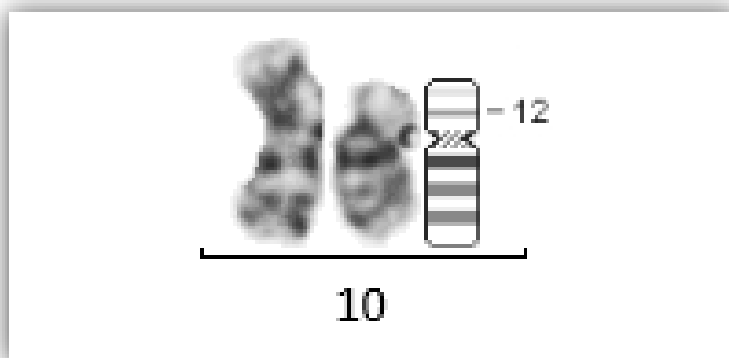


Figura 9. Deleción del cromosoma 10 observada en un paciente pediátrico con LLA

46,XX,del(10)(:p12→qter)

(ISCN,2013)

Esta delección no se encuentra descrita para la LLA; a pesar de esto, algunos autores han reportado casos donde la delección se presenta asociada con otras alteraciones; un estudio realizado por Binato y cols., (2013) caracterizó 5 pacientes pediátricos con LLA, reportando un caso de inmunofenotipo B con cariotipo 46,XY,del(10)(p12) asociado a la t(11;22)(q23;q?), así también Raimondi y cols., (1992) reportó otro caso de LLA pre-B pediátrico con cariotipo 47,XX,+21,del(10)(p12) asociado con una trisomía 21. También se ha relacionado con un inmunofenotipo de células B y células precursoras T (Mancini, 2002). A pesar de que esta delección no está descrita para la LLA, se sabe que en la región 10p12 se ubica el gen *MLLT10*, el cual codifica a un factor de transcripción (Pruitt, 2012). Además se ha visto implicada en otras alteraciones estructurales importantes descritas en algunos tipos de leucemias mieloides, como la t(10;11)(p12;q23) (Morero, 2006).

Dado que no se pudo obtener los resultados de cariotipo en todos los casos, se realizó FISH para la búsqueda de alteraciones numéricas (hiperdiploidías) y estructurales (translocaciones 12;21 *TEL/AML* y 9;22 *BCR/ABL*) en este grupo de pacientes.

Para el análisis de las alteraciones numéricas y estructurales de ambos grupos de pacientes se obtuvieron los valores de corte [promedio de células alteradas +3(DS)], mediante el análisis de muestras de sangre periférica de dos y seis donadores sanos respectivamente. Para los valores de corte de las sondas centroméricas, se analizaron de manera simultánea los cromosomas 4 y 21, y los cromosomas 10, X e Y en un promedio de 229 núcleos. Y para las sondas de locus específico *TEL/AML* y *BCR/ABL* se analizaron un promedio de 200 núcleos por sonda.

En el cuadro 7 se muestra el análisis de las sondas centroméricas correspondientes a los cromosomas 4, 10, 21, X e Y, y su número modal en casos pediátricos. Con base en los valores de corte, se puede observar valores significativos para la pérdida del cromosoma 4 en dos pacientes, y para la pérdida del cromosoma 10 en un paciente.

CUADRO 7 ANÁLISIS DE SONDAS CENTROMÉRICAS 4, 10, 21, X, Y EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

NÚMERO DE CASO	SEÑALES POR NÚCLEO														N	NÚMERO MODAL
	CEP 4			CEP 10			CEP 21			CEP X			CEP Y			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	0	1		
1	3*	97	0	3	97	0	3	97	0	100	0	0	0	100	81	45,XY,-4
2	2*	98	0	0	100	0	3	97	0	100	0	0	0	100	206	45,XY,-4
3	0	100	0	0	100	0	3	97	0	100	0	0	0	100	144	46,XY
4	0	100	0	12*	88	0	0	100	0	0	100	0	0	0	127	45,XX,-10

VC: -4=0%, -10=3% -21=6%, -X=0%, -Y=0%, +4=0%, +10=0%, +21=0%, +X=0%

* = Valor significativo, presentaron alteraciones numéricas

De acuerdo con los resultados, no se observaron hiperdiploidías en estos pacientes. A pesar de que las hiperdiploidías se presentan con mayor frecuencia en pacientes pediátricos (20-30%), solo se obtuvieron 4 muestras de este grupo de edad, además el pico de mayor frecuencia se observa de los 3 a los 5 años; lo cual podría explicar los resultados obtenidos, ya que dos de nuestros casos tenían 14 años y solo uno se encontraba dentro de este pico de frecuencia (Gibbons, 1999a).

Se observó una monosomía del cromosoma 4 en los casos 1 y 2. Esta monosomía no se encuentra descrita como tal dentro de la LLA. Sin embargo el cromosoma 4 se ha observado como uno de los más implicados en las hipodiploidías (Gibbons, 1999b). Los pacientes con hipodiploidía se han asociado con un pronóstico adverso y su supervivencia puede ser menor a los 11 meses (Ramos, 2011).

También se obtuvieron valores significativos para una monosomía del cromosoma 10 en el caso 4. Cabe destacar que este mismo caso presentó una delección del mismo cromosoma en el resultado de cariotipo, lo cual sugiere la presencia de dos clonas: una clona con la alteración estructural del(10)(p12) y otra con la monosomía 10. Estos resultados obtenidos podrían deberse al porcentaje

de fallo al obtener células en metafase (6.4-34.5%) (Vargas, 2011), ya que en nuestro caso se lograron analizar 10 metafases mediante citogenética convencional, encontrando 5 células con la alteración estructural (deleción del cromosoma 10); mientras que por la técnica de FISH se analizaron un total de 127 núcleos, observándose un 12% con la monosomía 10. Además, la pérdida de este cromosoma puede deberse a la misma deleción; ya que cuando un cromosoma presenta inestabilidad tiende a perderse en las siguientes divisiones mitóticas, puesto que esta inestabilidad afecta la expresión de diversos genes, responsables de la segregación cromosómica y control del ciclo celular (Ramírez, 2008).

El análisis de las sondas para la fusión génica *TEL/AML* se observa en el cuadro 8 y para la fusión de *BCR/ABL* en el cuadro 9. De acuerdo con los valores de corte, no se encontraron valores significativos con respecto a las fusiones *TEL/AML* y *BCR/ABL*, ni para las pérdidas o ganancias de sus loci.

CUADRO 8 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA *TEL/AML* EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Núm. Caso	% FUSIÓN <i>TEL/AML</i>	% NORMALES	%PÉRDIDAS (1 SEÑAL)		%GANANCIAS (3 SEÑALES)		N
			<i>TEL</i>		<i>AML</i>		
1	0	100	0	0	1	0	100
2	0	100	0	0	0	0	150
3	0	100	0	0	0	0	59
4	0	100	0	0	0	0	67

VC: *TEL/AML*: 0%, -*TEL*=1.3%, -*AML*=1.3%, +*TEL*=0%, +*AML*=0%

CUADRO 9 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA *BCR/ABL* EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

Núm. Caso	% FUSIÓN <i>BCR/ABL</i>	% NORMALES	%PÉRDIDAS (1 SEÑAL)		%GANANCIAS (3 SEÑALES)		N
			<i>BCR</i>	<i>ABL</i>	<i>BCR</i>	<i>ABL</i>	
1	0	100	1	0	0	0	200
2	0	100	0	0	0	0	102
3	0	100	1	0	1.5	0	200
4	0	100	1.5	0	2.5	0	200

VC: *BCR/ABL*: 0%, -*BCR*=3.15%, -*ABL*=4.52%, +*BCR*=0%, +*ABL*=0%

No se obtuvieron valores significativos para las alteraciones de *TEL/AML* y *BCR/ABL*, lo cual podría deberse a que se captaron muy pocas muestras de pacientes pediátricos y sólo 2 de ellos con edades menores a los 10 años; según lo reportado por otros autores la frecuencia de estas translocaciones se ha observado en un 20-30% para *TEL/AML* y en un 2-5% para *BCR/ABL* en niños de 2 a 5 años de edad. (Artigas, 2006; Farias, 2004). No obstante, los resultados negativos a estas translocaciones confieren un pronóstico intermedio a los pacientes (Anguita, 1999).

En el cuadro 10 se muestran los resultados del estudio citogenético de los pacientes de edad adulta. De los 13 casos incluidos, 4 obtuvieron un resultado. De los casos que obtuvieron resultado de cariotipo, se observó un resultado normal (46,XX), una t(8;14)(q24;q24) y una del(6)(q21). Estas alteraciones se muestran en la figura 10. Además en un solo caso se observó alteraciones de tipo numérico, presentando hipodiploidía y cariotipo compuesto: 35~45,X[4],-4[3],-9[4],-10[4],-12[5],-14[3],-18[6],-19[6],-20[4][cp12]. Una de las metafases analizadas se puede observar en la figura 11.

CUADRO 10 ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES ADULTOS

CASO	EDAD/GÉNERO	MATERIAL CROMOSÓMICO	CARIOTIPO	NÚMERO DE METAFASES ANALIZADAS
5	41/F	Obtuvo resultado	46,XX,t(8;14)(q24;q24)[3]/46,XX[19]	22
6	33/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
7	18/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
8	34/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
9	21/M	Hipocelularidad	Sin resultado	0
10	56/F	Obtuvo resultado	46,XX [15]	15
11	38/F	Hipocelularidad	Sin resultado	0
12	26/F	Hipocelularidad	Sin resultado	0
13	31/F	Obtuvo resultado	35-45,X[4],-4[3],-9[4],-10[4],-12[5],-14[3],-18[6],-19[6],-20[4][cp12]	12
14	18/M	Metafases de mala calidad	Sin resultado	0
15	25/F	Obtuvo resultado	46,XX,del(6)(pter→q21:)[3]/46,XX[4]	7
16	43/F	Hipocelularidad	Sin resultado	0
17	16/F	Metafases de mala calidad	Sin resultado	0

**Resultados basados en (ISCN,2013)*

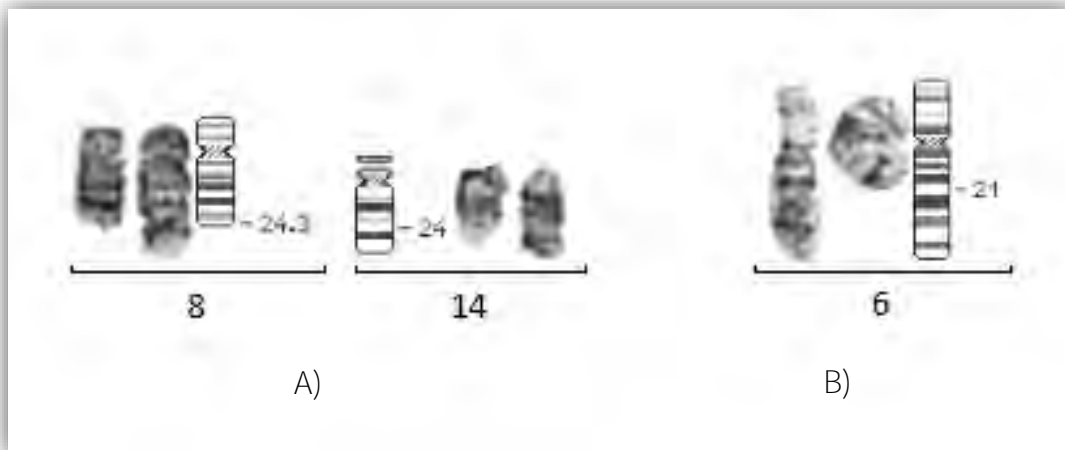


Figura 10. Alteraciones cromosómicas estructurales de pacientes adultos con LLA

A) 46,XX,t(8;14)(q24;q24)

B) 46,XX,del(6)(pter→q21:)

(ISCN,2013)

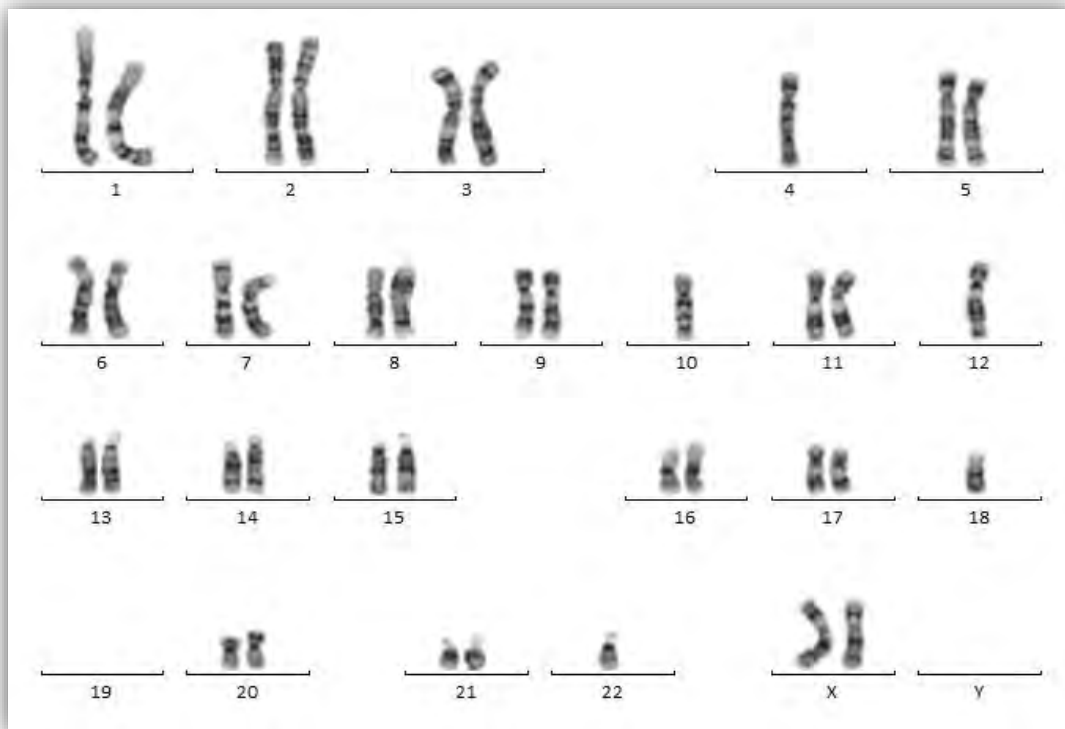


Figura 11. Metafase de un paciente adulto hipodiploide con cariotipo compuesto

Cariotipo: 39,XX,-4,-10,-12,-18,-19,-19,-22

(ISCN,2013)

Los resultados de cariotipo normal (caso 10) han sido reportados por otros autores en un 13-32% de las LLA de linaje B y en un 24-43% en las de linaje T, y de acuerdo a otros autores el resultado de cariotipo normal se ha asociado con un valor pronóstico intermedio (Font, 2007; Mrozek, 2009).

La $t(8;14)(q24;q24)$ (caso 5) se encuentra descrita dentro de las LLA asociada a los linajes B y T como $t(8;14)(q24;q11)$, sin embargo, el punto de rompimiento en 14q abarca el punto de rompimiento de nuestro caso. Esta translocación se presenta con una prevalencia de alrededor del 0.5-1.3% en las LLA y del 2% en las leucemias linfoblásticas de tipo T. La $t(8;14)$ ha sido asociada a un mal pronóstico, con una supervivencia media de 11 meses (Cools, 1999), pero cuando los pacientes presentan inmunofenotipo B tienen una mejor supervivencia cuando son tratados con esquemas intensivos de quimioterapia (Navid, 1999). A pesar de su baja incidencia, otros estudios han reportado que esta translocación se ve asociada comúnmente con las leucemias de células B (Cigudosa, 1992; Charrin, 1996), concordando con nuestro caso, el cual presentó inmunofenotipo pre-B. La región en 8q24 se conoce por codificar a la proteína resultante del oncogen *C-MYC*, que juega un papel importante en la regulación del crecimiento y diferenciación celular; la desregulación de este gen causada por la translocación induce a la transformación maligna de las células precursoras B en la LLA (Bilhou, 1999; Inaba, 1990; Navid, 1999).

La $del(6)(q21)$ (caso 15) se encuentra reportada con mayor frecuencia en las leucemias linfoblásticas principalmente de manera terminal, con una prevalencia del 5-15% mediante análisis citogenético convencional, según Guo y cols., (2015) reportó esta alteración en un 10.4% de su población estudiada mediante citogenética convencional y FISH. También se encuentra asociada al inmunofenotipo de células B y a pacientes de edad adulta; y está reportada como alteración única en el 30% de los casos (Brigaudeau y cols., 1999); estas características coinciden con nuestro caso, el cual presentó esta delección como alteración única y de manera terminal, así como inmunofenotipo pre-B. Otros autores han reportado que esta delección sugiere la pérdida de un gen supresor de tumor situado en la región q21 cuya ausencia puede contribuir al desarrollo y transformación maligna de las células precursoras B y T (Ferdowsi, 2013; Hayashi, 1990). También se ha descrito que la delección en 6q confiere un pronóstico intermedio para las leucemias linfoblásticas y un pronóstico adverso para las leucemias mieloides (Ferdowsi, 2013; Mougalian, 2011).

La hipodiploidía (caso 13), se presenta en un 2-9% en la LLA del adulto, y la hipodiploidía de 30-39 cromosomas se presenta principalmente en adultos jóvenes. Las monosomías más frecuentes son las de los cromosomas 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 18, 19, 21, 22 y los cromosomas sexuales (Font, 2007; Gibbons,

1999b). Estos datos reportados coinciden con nuestro caso con cariotipo compuesto, presentando un rango en el número modal de 35 a 45 cromosomas, y los cromosomas implicados en la hipodiploidía se encuentran dentro de los reportados como más frecuentes. De acuerdo con Pui y cols., (1990) obtuvo un grupo de pacientes con 30-39 cromosomas, donde predominó el género masculino y edades mayores a 40 años, esto coincide con otro estudio realizado por Yamamoto y cols., (2015) donde reporta un caso masculino de edad adulta con hipodiploidía; sin embargo, en nuestro caso fue femenino y menor de 40 años. El pronóstico que se ha asociado a las hipodiploidías es de tipo adverso, con una supervivencia media de 11 meses (Martín, 2001; Ramos, 2011), además, los pacientes pueden presentar una duración corta de remisión completa (Gibbons, 1999b).

Dado que no se logró obtener el resultado del cariotipo en todos los casos de los pacientes adultos se realizó la búsqueda de la translocación 9;22 mediante FISH. En el cuadro 11 se muestra el análisis de la fusión génica de *BCR/ABL* en los casos de pacientes adultos. Con base en los valores de corte, no se observaron valores significativos para la fusión de *BCR/ABL* en ninguno de los casos; sin embargo, se observa un valor significativo para la pérdida del loci *ABL* en el caso 7.

CUADRO 11 ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA *BCR/ABL* EN INTERFASE POR FISH EN PACIENTES ADULTOS

Núm. Caso	% FUSIÓN <i>BCR/ABL</i>	% NORMALES	%PÉRDIDAS (1 SEÑAL)		%GANANCIAS (3 SEÑALES)		N
			<i>BCR</i>	<i>ABL</i>	<i>BCR</i>	<i>ABL</i>	
5	0	100	0	0	0	2	100
6	0	100	2	0	2	0	190
7	0	100	2	0	6*	0	204
8	0	100	0	0	4	0	183
9	0	100	3	0	3	0	198
10	0	100	0	0	0	0	100
11	0	100	0	0	4.7	0	190
12	0	100	0	0	0	0	100
13	0	100	0	0	0	0	85
14	0	100	0	0	0	0	100
15	0	100	0	0	0	0	67
16	0	100	0	0	0	0	96
17	0	100	3	0	2	0	183

VC: *BCR/ABL*: 0%, -*BCR*=3.15%, -*ABL*=4.52%, +*BCR*=0%, +*ABL*=0%

*= Valor significativo, presentó pérdida del loci *ABL*

No se observó la translocación 9;22 a pesar de que es una de las alteraciones mayormente encontrada en este grupo de edad, lo cual podría deberse a que la frecuencia de esta alteración es del 20-30% en estos pacientes (Artigas, 2006) y las muestras estudiadas en este trabajo son pocas con respecto a estos porcentajes. Sin embargo, la ausencia de esta translocación confiere al paciente un valor pronóstico intermedio (Anguita, 1999). Además se puede observar la pérdida de uno de los loci *ABL* en el caso 7; este gen se ha descrito de manera normal como un agente regulador del ciclo celular, ya que tiene funciones proapoptóticas en respuesta a los agentes de daño y estrés genotóxico (Chávez, 2009).

Un estudio realizado por Quintana y cols., (2011) reportó 2 pacientes leucémicos (uno con LLA) con una deleción en la región del gen *ABL*, la cual asociaron con un mal pronóstico y una sobrevida de 36 meses.

En el cuadro 12 se muestran las características hematológicas iniciales de los pacientes estudiados. Estas características son importantes, ya que también confieren un pronóstico al paciente (Sánchez, 2007). En el momento del diagnóstico se obtuvo un rango de 0-86% de blastos en sangre periférica con una media del 25% y un rango de 64-100% de blastos en médula ósea con una media de 86%. El rango de la cuenta de leucocitos (WBC) fue de 96-43,200 por μL con una media de 9,583 por μL , este rango se encuentra por debajo de 50,000 por μL , que de acuerdo con Pérez (2012) se asocia a un pronóstico favorable. En cuanto a la deshidrogenasa láctica (LDH) se obtuvo un rango de 120-700 U/L con una media de 274.5 U/L; la detección de esta enzima es importante porque se encuentra clasificada dentro de los marcadores tumorales más utilizados y ha sido considerada de valor pronóstico en pacientes con tumores en células germinales (Martínez y cols., 2000). Aunque la media se encuentra dentro de los valores normales, algunos casos presentaron cifras elevadas, las cuales se encuentran asociadas a un pronóstico adverso (Torrelio, 2015).

CUADRO 12 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS INICIALES DE PACIENTES CON LLA

Característica	Media	Rango
% Blastos	25.07	0-86
Sangre periférica	86.06	64-100
Médula ósea		
WBC	9,583.05	96-43,200
LDH	274.53	120-700
% Remisión		
Remisión parcial	35.3	
Remisión completa	35.3	
Sin datos	29.4	

Valores normales: Blastos (sangre periférica): 0%, blastos (médula ósea): $\leq 5\%$, WBC: 4,500 - 10,000 por μL , LDH: 105-333 U/L

Después del primer mes de tratamiento (inducción a la remisión), se observó que 6/17 pacientes alcanzaron la remisión parcial, 6/17 alcanzaron la remisión completa y en 5/17 no se especificaron estos datos, ya que a veces los pacientes abandonan el tratamiento o fallecen antes de este tiempo.

El número de muestras incluidas en este estudio fueron pocas debido a que el Hospital Juárez de México **no es un hospital de concentración pediátrica y la LLA “per sé” es poco frecuente en pacientes de edad adulta**. Además, en el laboratorio de citogenética y biología molecular se estudian también otro tipo de padecimientos oncohematológicos.

La causa principal de falla al obtener material para el análisis citogenético se debe principalmente a que la mayoría de las muestras se presentaban hipocelulares (poco material), esto se debe principalmente a la mala toma del aspirado de médula ósea por un arrastre de células sanguíneas, a pesar de que en el laboratorio se realizaron cultivos de 24, 48 y 72 horas para obtener material para el análisis. Además, cabe mencionar que hubo casos en los que se analizaron menos de 20 metafases y según los criterios de la nomenclatura internacional (ISCN, 2013), éstos resultaron no concluyentes.

Una de las preocupaciones en el laboratorio es tratar de reportar un resultado que al hematólogo le permita tomar una decisión terapéutica, por ello es importante la búsqueda por medio de FISH de translocaciones con valor pronóstico como la t(9;22) y la t(12;21), las cuales son específicas para este tipo de leucemia, así como la búsqueda de hiperdiploidías, ya que no requieren células en división, lo que facilita su análisis.

Las 17 muestras estudiadas (incluyendo las hipocelulares) presentaron material suficiente para la búsqueda de estas alteraciones mediante la técnica de FISH. A pesar de que no se encontraron resultados positivos para estas alteraciones, los resultados negativos tanto para las translocaciones como para las hiperdiploidías también son importantes, ya que confieren un valor pronóstico y son de gran utilidad para que el médico seleccione el tratamiento adecuado para el paciente.

XI. CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó el estudio citogenético convencional en los dos grupos de pacientes con LLA de *novo*.
- ✓ La técnica de FISH permitió la detección de alteraciones cromosómicas numéricas en pacientes pediátricos, pero no se encontró la hiperdiploidía como lo reportado en la literatura, sino la pérdida de cromosomas (hipodiploidía), correlacionada con mal pronóstico.
- ✓ No se detectaron las alteraciones estructurales t(12;21) y t(9;22) mediante la técnica de FISH en ambos grupos, sin embargo, se logró identificar pérdidas del loci *ABL*.
- ✓ No se pudo correlacionar los datos hematológicos y clínicos con las alteraciones numéricas y estructurales por el número limitado de pacientes.

XII. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar una estrategia para la correcta toma de muestra en estos pacientes, ya que se presentaron dificultades para obtener el resultado, debido a la hipocelularidad.
- ✓ Incrementar el número de muestras para observar las frecuencias de las alteraciones numéricas y estructurales en estos pacientes.
- ✓ Utilizar métodos de biología molecular para detectar más alteraciones estructurales importantes para el valor pronóstico.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo. (2000). Seguimiento citogenético e hibridación in situ (FISH) en la enfermedad mínima residual. *Medicina (Buenos Aires)*, 60(2), 87-90.
2. Alonzo. (2007). Bases cromosómicas de las alteraciones genéticas humanas. *Química Clínica*, 26(4), 224-228.
3. Anguita, Villegas, González, del Potro, Martínez, Álvarez, Díaz, Ferroa, Espinós. (1999). Relación entre la persistencia del gen BCR/ABL y la recaída en pacientes adultos con leucemia linfoblástica aguda. Elsevier (Madrid), 112 (13), 481-484.
4. Artigas, Cabrera, Melo, Páez, Arriagada, Astete, Roa. (2006). Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista médica de Chile*, 134(11), 1367-1376.
5. Bain. (2014). Chronic neutrophilic leukaemia. *Acta haematologica*, 131(1), 45-45.
6. Billhou, Wlodarska. (1999). Leukaemia Section. *Gene Section*, 82, 886-899.
7. Binato, Meyer, Silva, Garcia, Figueiredo, Hofmann, y cols. (2013). Analyzing acute leukemia patients with complex MLL rearrangements by a sequential LDI-PCR approach. *Cancer letters*, 338(2), 249-254.
8. Bravo, Zenteno. (2009). Detección de la mutación T315I de ABL1, asociada a la resistencia a Imatinib, Dasatinib y Nilotinib en la Leucemia Mieloide Crónica. <https://www.eae-publishing.com/.../es/.../detección-de-la-mutación-t315i-de-abl1?...> 5-15.
9. Brigaudeau, Billhou. (1999). Leukaemia Section. <http://AtlasGeneticsOncology.org>, 17, 212-216.
10. Castillo, Fuentes, Paulos, de la Rosa. (2014). Estudio cromosómico en abortos espontáneos. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 79(1), 40-46.
11. Cigudosa, Calasanz, Gullón, Prósper, Cuesta, Rifón, Rocha. (1992). A new case of acute lymphoblastic leukemia B-cell type with chromosomal rearrangements involving the T-cell receptor breakpoint at band 14q11. *American journal of hematology*, 41(2), 137-139.
12. Clavijo. (2013). Uso de la Hibridación Genómica Comparativa-Array (HGC-a) en pacientes con retraso global del desarrollo y fenotipo particular. Revisión sistemática de la literatura. <http://repository.urosario.edu.co/handle/10336/4219>, 21-24.

13. Colldeforns, Gracia, Maraver, Dolores, Rodríguez, Cobo, Hernández. (2004). Leucemias agudas en el adulto. *Medicine*, 9(21), 1314-1324.
14. Colli, Palomo, Tarres, Zapata, Villegas, Juárez, Martínez, López, Riosvelasco, Ortega. (2015). Inmunofenotipo en el líquido cefalorraquídeo de niños con leucemia linfoblástica aguda. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), 13-20.
15. Combariza, Casas, Rodriguez, Cardona, Ospina, Grajales. (2007). Supervivencia en adultos con leucemia linfocítica aguda de novo tratados con el esquema HyperCVAD en el Instituto Nacional de Cancerología (Colombia), (2005). *Rev Colom Cancerol*, 11(2), 92-100.
16. Cools, Bilhou, Wlodarska, Cabrol, Talmant, Bernard, Hagemeijer, Maryne. (1999). Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with at (4; 12)(q11-q12; p13). *Blood*, 94(5), 1820-1824.
17. Charrin, Magaud, Sebban, Fiere, Dastugue, Hugué, Attal, Sie, Lai, Jouet. (1996). Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*, 87(8), 3135-3142.
18. Chávez, Ayala, Mayani. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica*, 61(3), 221-232.
19. Díaz, González. (2007). Genética molecular en la leucemia linfoblástica aguda del adulto: utilidad diagnóstica y pronóstica. *Medicina clínica*, 129(1), 29-35.
20. Dixon. (2015). Emerging technologies in paediatric leukaemia. *Translational Pediatrics*, 4(2), 116-124.
21. Farias, Granero, Martins. (2004). Diagnóstico laboratorial das leucemias linfocíticas agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40, 91-98.
22. Ferdowsi, Shirkoobi, Toogeh, Gholamreza. (2013). Myelodysplastic Syndrome with 6q Deletion as the Sole Chromosome Abnormality in an Iranian Patient: A Case Report with Review of Literature. *Iranian journal of public health*, 42(10), 1187.
23. Ferlay, Soerjomataram, Ervik, Dikshit, Eser, Mathers, Rebelo, Parkin, Forman, Bray. GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. 1(11) 11[Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

24. Ferrís, García, López, Berbel. (1999). Factores de riesgo para las leucemias agudas infantiles *Anales españoles de pediatría*, 50, 439-446.
25. Font, Granada. (2007). Citogenética de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Medicina clínica*, 129(1), 23-28.
26. Gibbons. (1999a). High hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/hyperploidyID1085.html>, 145-146.
27. Gibbons. (1999b). Severe hypodiploid acute lymphoblastic leukaemia. <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/hypoploidyID1087.html>, 151-152.
28. Guo, Zhai, Qian, Wang, Fan. (2015). [Cytogenetic characteristics of 163 children with acute lymphoblastic leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi/Zhongguo bing li sheng li xue hui= Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology*, 23(2), 312-317.
29. Grupo Berlín-Fránfort-Münster, en Europa. ((s.f.)). Leucemia linfoblástica aguda infantil: Tratamiento (PDQ®). <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/paciente/tratamiento-lla-infantil-pdq>.
30. Hayashi, Yasuhide, Raimondi, Look, Behm, Kitchingman, Pui, Ching-Hon, Rivera, Williams. (1990). Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 76(8), 1626-1630.
31. Heim, Sverre, Felix. (2015). *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells*: John Wiley & Sons, 201-214.
32. Hernández, Zonana, Zaragoza. (2009). Factores asociados a leucemia aguda en niños. Estudio de casos y controles. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 47, 497-503.
33. Hernández, Granada, Solé. (2011). De la citogenética convencional al análisis por micromatrices. Cincuenta años del cromosoma Filadelfia. *Medicina clínica*, 137(5), 221-229.
34. Inaba, Murakami, Oku, Itoh, Ura, Nakanishi, Shimazaki, Nishio, Nakagawa, Fujita, Naohisa. (1990). Translocation between chromosomes 8q24 and 14q11 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics*, 49(1), 69-74.
35. Jaime. (2012). *Hematología: La sangre y sus enfermedades*. Mc Graw Hill, 3era edición, 80-81.

36. Jiménez, Carrillo, Chaves, Jiménez, Vargas, Campos, y cols. (2008). Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. *Revista de biología tropical*, 56(4), 1613-1618.
37. Jiménez, Miranda, Saldaña, Perez, Paredes, Rivera, Velázquez, Ramírez, Carnevale, Orozco. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leukemia research*, 32(10), 1518-1522.
38. Kosior, Lewandowska, Giannopoulos, Krzysztof. (2016). Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies **Inhibitory kinazy tyrozynowej w rozrostowych chorobach układu krwiotwórczego**. *Journal cover*, 70, 819-828.
39. Mancini, Vegna, Castoldi, Mecucci, Spirito, Elia, Tafuri, Annino, Pane, Rege. (2002). Partial deletions of long arm of chromosome 6: biologic and clinical implications in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 16(10), 2055-2061.
40. Marsán, Macías, Rivero, Sánchez, Socarrás, Gramatges, Anissa, y cols. (2002). Inmunofenotipaje y supervivencia global de pacientes pediátricos con leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 18(1), 0-0.
41. Martín, Ramos, Fernández, Martínez, Barreiro, Miranda. (2001). Cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Anales españoles de pediatría*, 55(1), 45-52.
42. Martínez. (2014). *Pediatría Integral* Vol. 18. sepeap (pp. 94).
43. Martínez, Marcos, Domínguez, Arias, Villafranca, Dueñas. (2000). *Marcadores tumorales circulantes con valor pronostico (Circulating tumour markers of prognostic value)*. Paper presented at the *Anales Sis San Navarra*, 24(1), 53-61.
44. Moorman. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood reviews*, 26(3), 123-135.
45. Morales. (2002). Caracterización molecular de la leucemia aguda linfoblástica infantil. <http://148.206.53.84/tesiMiami/UAMI11615.pdf>. 19-21.
46. Morerio, Panarello. (2006). Gene Section. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/AF10.html>, 1, 51-52.
47. Mougalian, Schellhorn. (2011). Adverse prognostic features in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology*, 25(8), 692.

48. Mrozek, Harper, Aplan. (2009). Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 23(5), 991-1010.
49. Nacho. (2003). Leucemias del adulto. *Gaceta médica de México*, 139, 106-112.
50. Navid, Mosijczuk, Head, Borowitz, Carroll, Brandt, Link, Rozans, Thomas, Schwenn. (1999). Acute lymphoblastic leukemia with the (8; 14)(q24; q32) translocation and FAB L3 morphology associated with a B-precursor immunophenotype: the Pediatric Oncology Group experience. *Leukemia*, 13, 135-141.
51. Pignon. (1998). *Translocation bcr-abl: méthodes diagnostiques et intérêt clinique*. Paper presented at the Annales de Biologie Clinique, 57-63.
52. Pruitt, Tatusova, Brown, Maglott, Donna. (2012). NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic acids research*, 40(D1), D130-D135.
53. Pui, Ching-Hon, Carroll, Raimondi, Land, Crist, Shuster, Johnathan y cols. (1990). Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. *Blood*, 75(5), 1170-1177.
54. Quero, Estrada, Pacheco, Reyes, Álvarez, Vargas. (2012). Características clínicas e inmunofenotípicas en un grupo de niños con leucemia aguda linfoblástica. *Pediatría de México*. [revista en internet] 2012; 14: 4.
55. Quintana, Soto, Nava, Álvarez, de Atencio, Rojas, Gutiérrez, Urdaneta, de Tarazona, Cañizalez, González. (2011). Detección del complejo BCR-ABL mediante hibridación in situ fluorescente en pacientes leucémicos venezolanos. *Ciencia*, 19(1).
56. Raimondi, Roberson, Pui, Ching-Hon, Behm, Frederick, Rivera, Gaston. (1992). Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood*, 79(12), 3245-3252.
57. Ramírez, Herrera, Muñetón, Márquez, Isaza. (2008). Analyses of numerical aberrations of chromosome 17 And TP53 gene deletion in gastrointestinal tumors by dual-color fluorescence in situ hybridization (FISH). *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 23(4), 333-342.
58. Ramos, Rozen, León, Martínez, Olarte, Catellanos, Martínez, Montaña, Kassack, Zamora. (2011). Tratamiento de la leucemia linfocítica aguda del adulto: Experiencia de un hospital en la Ciudad de México. *Revista médica de Chile*, 139(9), 1135-1142.

59. Ramos, Martín, Martínez, Fernández, Miranda, Barreiro. (2001). Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. Paper presented at the *Anales de Pediatría*, 55(1), 45-52.
60. Salinas, Sánchez, Coll, Cortina, Rosique, Jiménez, Moraleda. (2012). Leucemias agudas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada acreditado*, 11(21), 1268-1279.
61. Sánchez, Ortega A., Ortega M., Osnaya, Barrientos, Rosas. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26-33.
62. Suárez, Martínez. (2014). *Pediatría Integral*, 18(9), 94).
63. Torrelio, Aranda. (2015). Interpretación de la deshidrogenasa láctica Interpretation of lactate dehydrogenase. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 49(2), 132-134.
64. Vargas, Covarrubias, Gómez, Borbolla, Pacheco, Leova. (2011). Alteraciones citogenéticas en niños con leucemia aguda linfoblástica en Tabasco. *Salud en Tabasco*, 17(1-2), 22-29.
65. Venegas, Rivera. (2004). Estudios citogeneticos en niños con leucemia linfocitica aguda-B en Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 52(3), 551-558.
66. Volpi, Bridger. (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*, 45(4), 385-386.
67. Wan, Thomas. (2014). Cancer cytogenetics: methodology revisited. *Annals of laboratory medicine*, 34(6), 413-425.
68. Yamamoto, Katsuya, Yakushijin, Kimikazu, Matsuoka, Hiroshi, Minami, Hironobu. (2015). Low Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia with Burkitt-like Morphology. *Internal Medicine*, 54(22), 2955-2955.
69. Zaliova, Marketa, Moorman, Anthony, Cazzaniga, Giovanni, Stanulla, Martin, Harvey, Roberts, Kathryn, y cols. (2016). Characterization of leukemias with ETV6-ABL1 fusion. *Haematologica, haematol.* 2016, 101(9), 1082-1093.
70. Zhang, Samad, Pombo, Scelo, Smith, Feusner, y cols. (2015). Global characteristics of childhood acute promyelocytic leukemia. *Blood reviews*, 29(2), 101-125.