



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE ADN
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

JOSÉ MIGUEL VEGA CARDELAS

ASESOR: M.C. GLORIA LETICIA ARELLANO MARTÍNEZ

COASESORES: Q.C. ISRAEL PARRA ORTEGA

NOEMÍ NÁJERA MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del índice de ADN mediante Citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda.

Que presenta el pasante José Miguel Vega Cardelas

Con número de cuenta: 308323410 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Marzo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
CITOMETRÍA DE FLUJO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ.**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Q.C. ISRAEL PARRA ORTEGA Y Q.B.P. NOEMÍ NÁJERA MARTÍNEZ

**Y PRESENTADO EN EL LVII CONGRESO ANUAL DE LA AGRUPACIÓN
MEXICANA PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOLOGÍA (ANEXO I).**

“Debido a que todo en este mundo viene de arriba de un mundo superior, tal como está escrito, no hay ningún brote de hierba abajo que no tenga su ángel arriba que lo golpea y le dice crece” ... (El Zohar)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la formación académica recibida.

A Dios, por bendecirme con una gran familia, por poner en mi camino las personas indicadas para mi desarrollo personal y profesional, por darme la paciencia para terminar este trabajo, por todo lo que me ha brindado en la vida.

A mis padres, por todo el apoyo que han dado desde el día en que nací, por siempre tener una palabra de aliento y los mejores consejos, por ser mi más grande orgullo y mi mayor motivación, por el amor y la paciencia, por soportarme, por siempre estar ahí, en mis peores momentos.

A mis hermanos por la alegría que representan en mi vida, por siempre presionarme para terminar esta tesis.

Al Q.C. Israel Parra Ortega, por la confianza y el apoyo que me ha brindado, por siempre exigirme ser un mejor químico y tratar de explotar mis capacidades, por todos los consejos y regaños. Por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

A la Q.B.P. Noemí Nájera Martínez, por recibirme de la mejor manera en el laboratorio de citometría de flujo, compartir todos sus conocimientos conmigo, por la confianza que siempre me tuvo, por todos los buenos consejos y regaños.

A la M.C. Gloria Leticia Arellano Martínez por el apoyo en la realización de esta tesis.

Al Q.F.B. Héctor Hernández, por brindarme su amistad, consejos, conocimiento y por tratar de abrirme el panorama del mundo laboral.

A todos los químicos del laboratorio clínico del Hospital infantil de México Federico Gómez, por la amistad y el cariño que me brindaron durante mi estancia.

DEDICATORIA

A:

Dios por haberme dado la vida. La voluntad y la oportunidad de estudiar.

Mis padres Yolanda y Eugenio, ya que son la base fundamental de todos mis logros, por estar siempre a mi lado cuando más los necesito, por mostrar el apoyo y el interés para que estudie y me desarrolle en todos los aspectos de mi vida, por mostrarme que con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr. Por trabajar duro y sin importar cuan cansados terminen el día siempre tener tiempo para mostrarnos su cariño a mis hermanos y a mí. Las palabras nos son suficientes para demostrar mi agradecimiento, pero quiero que sepan este y todos los logros que en el futuro espero lleguen, siempre serán para que ustedes se sientan orgullosos de mí y que mis hermanos tengan el mejor ejemplo que yo pueda darles.

Todos y cada uno de los profesores que he tenido a lo largo de mi vida, pues de ellos es el mérito de inculcarme el amor por la ciencia.

Los niños con LA, espero que este trabajo sea de gran utilidad a la hora de tratar esta enfermedad, y sea una base para brindar un tratamiento adecuado y que a futuro estos niños gocen de una mejor calidad de vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	VI
GLOSARIO.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 El cáncer	1
1.2 La leucemia.....	1
1.2.1 Clasificación de las leucemias.....	2
1.2.2 Factores pronósticos en (LA).....	7
1.2.3 Anormalidades citogenéticas en (LLA)	8
1.2.4 Clasificación de riesgo en (LLA)	9
1.2.5 Clasificación de riesgo en (LMA)	11
1.3 El ciclo celular	11
1.3.1 Fases del Ciclo Celular.....	12
1.3.2 Control del ciclo celular.....	14
1.3.3 Puntos de chequeo que aseguran el control de calidad del ciclo	18
1.3.4 Fase G0 y estado de reposo proliferativo	18
1.3.5 Fase G1 y cáncer	18
1.3.6 Fase G2 mecanismos que regulan la entrada en mitosis.....	20
1.4 Citometría de flujo	21
1.4.1 Inmunofluorescencia.....	22

1.4.2	Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo.....	23
1.4.3	Aplicaciones clínicas de la citometria de flujo inmunotipificación	25
1.4.4	Citometría de flujo y ciclo celular.	25
1.4.5	Índice de ADN.....	28
1.5	Citogenética	29
1.5.1	Cariotipo	29
1.5.2	Cultivo celular	30
1.5.3	El Bando cromosómico.....	30
1.6	Leucemias y poliploidia	32
1.6.1	¿Por qué hay variación en la ploidía celular en las leucemias?	32
1.6.2	Hiperdiploidía y buena respuesta al tratamiento.....	33
1.6.3	LLA hiperdiploide y drogas	33
1.7	Características del kit (BD Cycletest plus DNA reagent kit)	34
1.7.1	Resolución	35
1.7.2	Linealidad	35
1.7.3	Medición del pulso	36
1.7.4	Discriminación de dobletes.....	37
1.7.5	Determinación de la linealidad y la resolución [tubo CEN (núcleos de eritrocitos de pollo)].	38
1.7.6	Determinación de la proporción de las fases del ciclo celular y la discriminación de singuletes de dobletes [tubo CTN (núcleos de timo de carnero)].	39
2	JUSTIFICACIÓN	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo general	42
3.2	Objetivos específicos	42
4	MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1	Muestras	43
4.2	Reactivos	43
4.3	Controles.....	43
4.4	Criterios de inclusión	43
4.5	Criterios de exclusión	44

4.6	Fundamento de la determinación del Índice de ADN	44
4.7	Procedimiento del estudio	44
5	RESULTADOS.....	46
6	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	54
7	CONCLUSIONES	58
8	REFERENCIAS.....	59
9	ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo convencional de desarrollo hematopoyético.	2
Figura 2. Blastos de la LAM1	3
Figura 3. Promielocitos atípicos de la LAM3	3
Figura 4. Blastos monocíticos de una LAM5a	4
Figura 5. Blastos monocíticos de una LAM5b	4
Figura 6. Células blásticas en una LAM7.	4
Figura 7. Blastos de una LLA 1.	5
Figura 8. Blastos de una LLA 2.	5
Figura 9. Blastos de una LLA 3.	5
Figura 10. Ciclo de división celular.....	13
Figura 11. Fases del ciclo celular.....	14
Figura 12. Eventos moleculares en la transición G1/S del ciclo celular	15
Figura 13. Progresión del ciclo celular	16
Figura 14. La proteólisis juega un papel importante en la regulación del ciclo celular	17
Figura 15. Mecanismos de regulación de la fase G1.....	20
Figura 16. Regulación de la transición G2/M en mamíferos	21
Figura 17. Componentes de un citómetro	22
Figura 18. Parámetros que se pueden analizar mediante citometría de flujo.....	23
Figura 19. Método de marcaje o tinción fenotípica para células.	25
Figura 20. Histograma de una población celular normal.....	27
Figura 21. Histograma de una población celular problema.....	28
Figura 22. Linealidad en un citómetro de flujo.....	36
Figura 23. Forma en que el citómetro analiza las células.....	36
Figura 24. Parámetros arrojados de la medición de pulsos	37
Figura 25. Forma en que se discriminan dobletes de singuletes	37
Figura 26. Lectura del control CEN (núcleos de eritrocitos de pollo) discriminación dobletes de singuletes	38
Figura 27. Lectura del control CEN (núcleos de eritrocitos de pollo) Linealidad	38
Figura 28. Lectura del control CTN (núcleos de timocitos de carnero) discriminación de las distintas fases del ciclo celular en singuletes dobletes y tripletes.	39
Figura 29. Lectura del control CTN (núcleos de timocitos de carnero) localización de las fases G ₀ /G ₁ , S, G ₂ /G ₁	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas estructurales no aleatorias en la LLA.....	9
Tabla 2. Sistema de clasificación del Children´s Oncology Group.....	10
Tabla 3. Características para la clasificación FAB de la leucemia mieloide aguda.	11
Tabla 4. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo.	24
Tabla 5. Las técnicas de bandeó más usadas.	31
Tabla 6. Ventajas de la citometría de flujo frente a la citogenética para la medición del Índice de ADN.....	31
Tabla 7. Hiperdiploidía de Índice bajo y cambio en la estratificación de riesgo	53
Tabla 8. Hipodiploidía y cambio en la estratificación de riesgo.....	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafica 1. Se muestra la distribución del género dentro de los pacientes analizados.....	46
Grafica 2. Distribución del tipo de leucemia aguda analizada expresada en porcentaje. ...	46
Grafica 3. Distribución de los tipos de LLA-B en los pacientes analizados	47
Grafica 4. Distribución de la ploidía en los 27 casos con LLA-B analizados	47
Grafica 5. Distribución de los valores de leucocitos en los casos hipodiploides.....	48
Grafica 6. Distribución de los leucocitos en los casos hiperdiploides de índice bajo.....	48
Grafica 7. Distribución de los leucocitos en casos hiperdiploides de índice alto	49
Grafica 8. LLAB en muestras con hiperdiploidía	49
Grafica 9. Distribución de la LLA-B en los casos con hiperdiploidía de índice alto	50
Grafica 10. Distribución de la LLA-B en los casos con hiperdiploidía de índice bajo.....	50
Grafica 11. Distribución de la LA en la hipodiploidía.....	51
Grafica 12. Cantidad de muestras que presentarán células en fase S.....	51
Grafica 13. Muestras con hipodiploidía de índice bajo que presentarán células en fase s.	52
Grafica 14. Muestras con hiperdiploidía de Índice alto que presentarán células en fase S	52

GLOSARIO

Cáncer: Conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo.

Neoplasia: Formación anormal en alguna parte del cuerpo de un tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno.

Leucemia: Son enfermedades progresivas de los órganos hematopoyéticos caracterizadas por una alteración de la proliferación y el desarrollo de los leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea.

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA): neoplasia que se origina por la proliferación en médula ósea y tejidos linfoides de células blásticas de origen B o T.

Blastos: Células hematopoyéticas inmaduras que se encuentran en la médula ósea.

Alteraciones Genéticas: Mutaciones que cambian el número de cromosomas (anomalías numéricas) o la estructura de un cromosoma (anomalías estructurales).

Ciclo celular: Conjunto de eventos que van desde el nacimiento y el crecimiento hasta la división de una célula cualquiera.

Apoptosis: Es una destrucción o muerte celular programada (provocada por el mismo organismo) con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento, está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Inmunofenotipo: Caracterización de las células según los marcadores inmunológicos que hay en su interior y superficie.

Citogenética: Es el estudio de los cromosomas tanto en número como en estructura.

Ploidía: Cantidad de ADN en la célula, es el número de juegos completos de cromosomas en una célula.

Hipodiploidía: Se le llama así cuando el ADN es menor a lo normal, en humano menor a 46 cromosomas.

Hiperdiploidía: Se le llama así cuando el ADN es mayor a lo normal, en humanos mayor a 46 cromosomas.

Cariotipo: Es la constitución cromosómica de un individuo.

Citometría de flujo: Método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz.

Inmunofluorescencia: Es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.

Fluorocromo: es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente.

Aneuploidía: Cantidad anormal de ADN en la célula, la cual puede ser hipodiploide o hiperdiploide.

Diploidía: Cantidad de ADN de una célula somática para una especie en particular (2n) en el caso del ser humano consta de 46 cromosomas

Índice ADN: Se define como un coeficiente entre los valores de contenido de DNA relativo de las células en estudio (en fase G₀/G₁) y de DNA en células diploides normales (en fase G₀/G₁)

Singulete: para términos de IADN definimos singulete a un solo núcleo.

Doblete: para términos de IADN definimos doblete como dos núcleos adheridos, los cuales pueden interferir a la hora de la lectura en el citómetro, si no se discriminan adecuadamente.

Triplete: para términos de IADN definimos triplete como tres núcleos adheridos, los cuales pueden interferir a la hora de la lectura en el citómetro, si no se discriminan adecuadamente.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
CdK	cinasa dependiente de ciclina
CC	Ciclo celular
COG	Children´s Oncology Group
EMR	Enfermedad Mínima Residual
LA	Leucemia Aguda
LLA	Leucemia Linfoblastica Aguda
LLM	Leucemia Mieloide Aguda
LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
OMS	Organización Mundial de la Salud
Rb	Retinoblastoma
RC	Remisión completa

RESUMEN

La existencia de factores genéticos en el desarrollo de la leucemia es evidente debido a diversas anomalías cromosómicas, tanto numéricas como estructurales. Dentro de las estructurales encontramos translocaciones, inversiones y deleciones. Mientras que dentro de las numéricas se encuentra la ploidía celular, la cual tiene vital importancia en la leucemia ya que se le ha concedido un significado pronóstico. De este modo el ADN hiperdiploide con un número mayor a 50 cromosomas ha sido asociado en conjunto de otros parámetros como factor de buen pronóstico, mientras que la pseudodiploidía e hipodiploidía se asocian a pronósticos desfavorables. Se analizaron las muestras de 29 niños con LLA que acudieron al Hospital Infantil de México Federico Gómez, se identificaron los patrones de hiperdiploidía, pseudodiploidía e hipodiploidía en relación con el número de leucocitos, edad, género y el tipo de translocación presente encontró lo siguiente: De los 29 casos analizados 15 (52%) correspondían a niñas y 14 (48%) a niños, 27 (93%) presentaron inmunofenotipo linfoide y 2 (7%) inmunofenotipo mieloide. Dentro de las leucemias con inmunofenotipo linfoide el 100% fue LLA-B no se encontró ninguna leucemia con inmunofenotipo T, se determinó que 9 (33%) fueron LLA Pre-B y los 18 (67%) casos restantes corresponden a LLA Pre-B común. El análisis del ADN mostro que 31% fueron hiperdiploides de índice alto, 31% hiperdiploides de índice bajo, 28% hipodiploides y 10% diploides. Mediante el panel de translocaciones emavishion que realiza el departamento de Biología Molecular se encontró que 63% de los casos hipodiploides presentaban alguna alteración de tipo estructural encontrándose las siguientes translocaciones; t(16;21), t(9;22), t(12;21), t(15;17) y t(9;21). Cabe mencionar que las translocaciones t(15;17) y t(9;21) corresponden a los dos casos de leucemia mieloide. En los casos diploides no se encontraron alteraciones estructurales. Dentro de los 9 casos con Índice de ADN hiperdiploide bajo se encontró que 2 (22%) tenían alteraciones de tipo estructural encontrándose las siguientes translocaciones; t(12;21) y t(9;11). Mientras que en los casos con índice de ADN hiperdiploide alto se encontraron también 2 casos con alteraciones estructurales t(1;19) y t(8;21). Se obtuvo una herramienta pronóstica y diagnóstica para la determinación de anomalías numéricas del ADN en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda del Hospital Infantil Federico Gómez.

1 MARCO TEORICO

1.1 El cáncer

Se estima que en el mundo existen 12 millones de personas diagnosticadas con cáncer, de los cuales el 3% son niños. Asimismo el cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial. Cada año, más de 160 000 menores de 20 años son diagnosticados con cáncer en países desarrollados en donde 3 de cada 4 niños sobreviven al menos 5 años después de iniciar su tratamiento, a diferencia de los países en vías de desarrollo en los cuales más de la mitad (60%) mueren (Jemal A, et al. 2011).

México no es la excepción, y aproximadamente cada año 7 000 niños adquieren la enfermedad, dichos casos incidentes, sumados a los prevalentes, hacen que anualmente cerca de 18 000 niños y adolescentes requieren atención oncológica (Perfil Epidemiológico de cáncer en México 2011).

1.2 La leucemia

Las leucemias representan las neoplasias hematológicas más frecuentes. Son enfermedades progresivas de los órganos hematopoyéticos caracterizadas por una alteración de la proliferación y el desarrollo de los leucocitos y sus precursores en la sangre y médula ósea.

Las leucemias son el resultado de una mutación somática en una única célula madre hematopoyética, que desencadena una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras. La célula en la que se produce la transformación es un precursor que pierde la capacidad de seguir su proceso normal de maduración (en la figura 1 se muestra la maduración normal de las células sanguíneas). Las alteraciones genéticas que acompañan a la transformación leucémica de una célula suelen ser adquiridas. En las Leucemias Agudas (LA) las células blásticas proliferan en la medula ósea y remplazan la celularidad normal de la misma, lo que provoca una disminución de las tres series hematopoyéticas en sangre periférica (anemia, leucopenia y trombocitopenia) (Merino A. 2010).

En la actualidad la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es el cáncer más común de la infancia y en México se ha reportado una de las mayores tasas de incidencia de América Latina. En el 2012 la principal causa de morbilidad hospitalaria entre la población menor de 20 años fue el cáncer de órganos hematopoyéticos (58.8% de los hombres y 59.5% de

las mujeres). Más del 50% de los menores de 20 años que ingresan a un hospital por cáncer es debido a una leucemia (INEGI 2015).

Alteraciones en el microambiente de la médula ósea o ambiental pueden alterar una o varias líneas de diferenciación. El resultado de las alteraciones moleculares es un desequilibrio del ciclo celular o la abolición de los mecanismos de apoptosis, que tiene como consecuencia la prolongación de la vida celular.

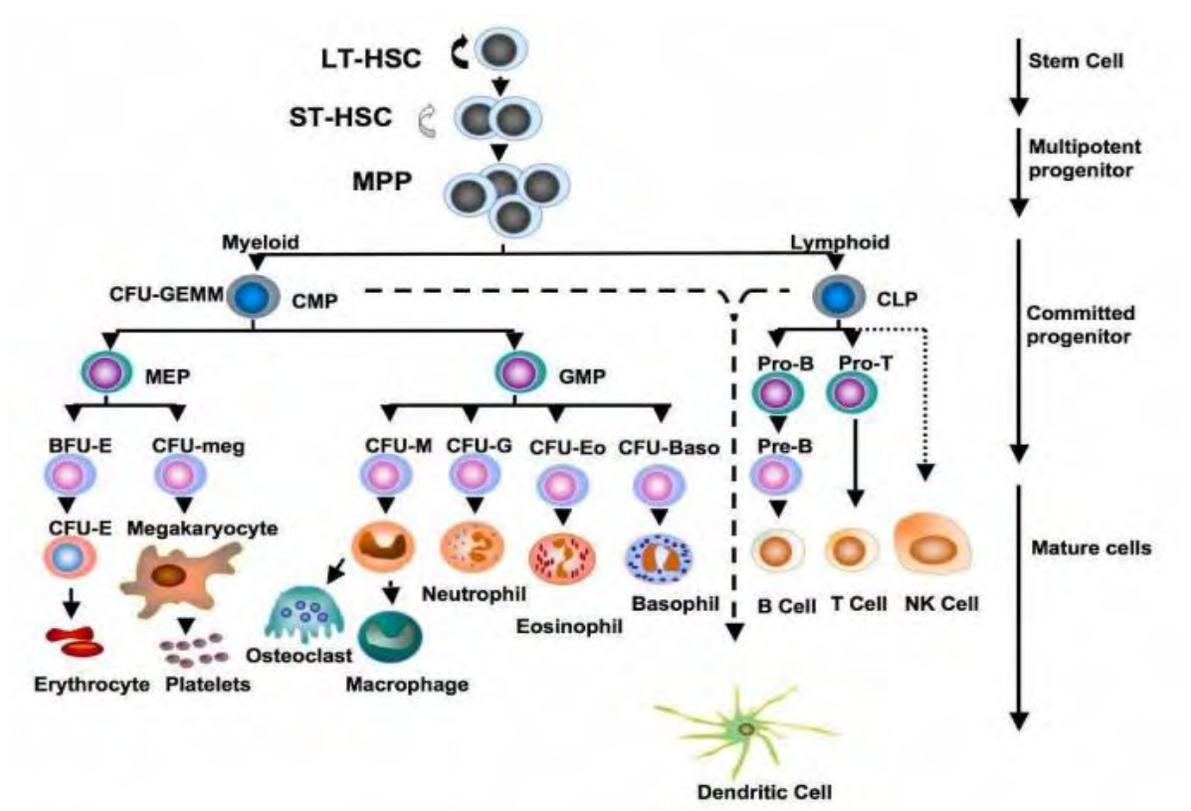


Figura 1. Modelo convencional de desarrollo hematopoyético, (adaptación de la figura obtenida de www.molmed.lu.se/HSC_regulation.htm).

1.2.1 Clasificación de las leucemias

La leucemia se puede clasificar de acuerdo a su origen como Leucemia Mieloide o Leucemia Linfóide, y de acuerdo a su maduración como Agudas o Crónicas, dando como resultado a cuatro grupos de leucemia con diferentes características cada una: Leucemia linfocítica Crónica (LLC), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

La clasificación más utilizada para distinguir a estas neoplasias fue la propuesta en 1976 por un grupo de citólogos franceses, americanos y británicos (FAB). Esta clasificación es puramente morfológica y se basa en características citológicas y en el uso de tinciones citoquímicas (Romero A; Jiménez RM, 2002).

El grupo cooperativo FAB diferenció las siguientes variedades morfológicas de LAM:

1. LAM0 (mínimamente diferenciada).
2. LAM1 (mieloblástica sin maduración). (fig. 2)
3. LAM2 (mieloblástica con maduración).
4. LAM3 (promielocítica). (Fig. 3)
5. LAM4 (mielomonocítica).
6. LAM5 (monocítica). (Fig. 4 y 5)
7. LAM6 (eritroide).
8. LAM7 (megacarioblástica). (Fig. 6)

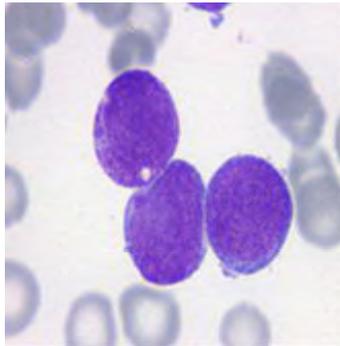


Figura 2. Blastos de la LAM1 (sin maduración) en sangre periférica: el citoplasma puede contener una fina granulación azurófila o algún bastón de Auer. (Merino A. 2010)

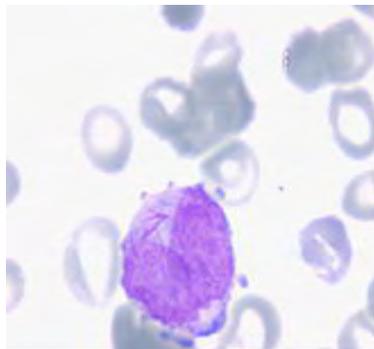


Figura 3. Promielocitos atípicos de la LAM3: tamaño mediano-grande, núcleo de perfil irregular con incisura amplia (signo de hachazo) de cromatina laxa e inclusiones citoplasmáticas alargadas. (Merino A. 2010)

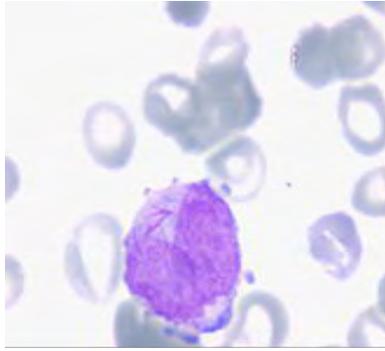


Figura 4. Blastos monocíticos de una LAM5a. Tamaño grande, relación entre núcleo citoplasma moderada. Perfil nuclear redondo y núcleo de cromatina laxa e inmadura. El citoplasma es moderadamente amplio e intensamente basófilo y con pseudópodos. (Merino A. 2010)

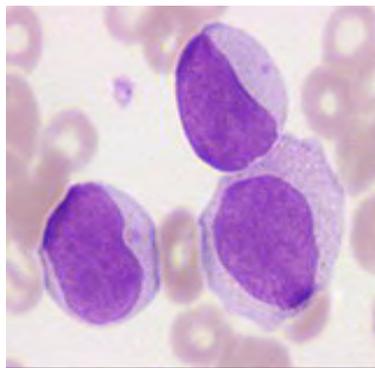


Figura 5. Blastos monocíticos de una LAM5b. Obsérvese la menor basofilia citoplasmática respecto a la LAM5a y un perfil nuclear ligeramente indentado. (Merino A. 2010)

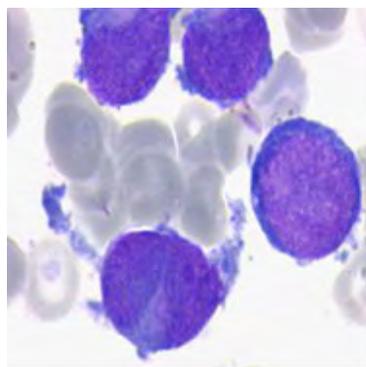


Figura 6. Células blásticas en una LAM7. Obsérvese que el citoplasma es basófilo, granular, y muestra un aspecto muy similar a las plaquetas circulantes con presencia de pseudópodos. (Merino A. 2010)

Mientras para la diferenciación de LLA se han considerado tres subtipos morfológicos.

1. L1. (células pequeñas, cromatina homogénea) (Fig. 7)
2. L2. (células grandes, cromatina heterogénea) (Fig. 8)
3. L3. (tipo Burkitt) (Fig. 10)

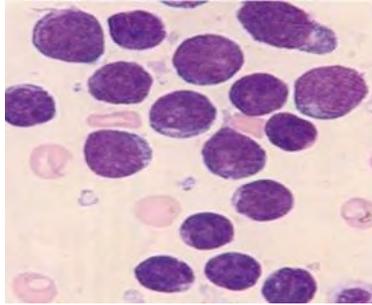


Figura 7. Blastos de una LLA 1. Son pequeños del tamaño de 2 linfocitos, escaso citoplasma, cromatina fina, nucléolos apenas visibles, núcleo redondo, relación núcleo-citoplasma alta. (Rodak BF, 2010)

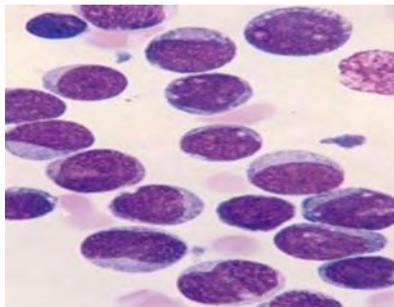


Figura 8. Blastos de una LLA 2. Son grandes y heterogéneos con abundante citoplasma, núcleos, irregulares, cromatina abierta. Nucléolos visibles. (Rodak BF, 2010)

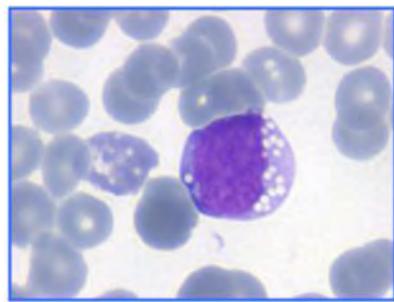


Figura 9. Blastos de una LLA 3. Son intensamente basófilos y muestran vacuolas de contenido lipídico (positivas para el rojo aceite) en el citoplasma y también en el núcleo. (Rodak BF, 2010)

La clasificación de la LLA se ha modificado teniendo en cuenta criterios inmunológicos, que nos determinan la naturaleza y maduración de la población blástica (Coronel R. 2005).

Línea B:

- (B-I) pro-B; CD19+ y/o CD79a+ y/o CD22+
- (BII) pre-pre-B o común; CD10+
- (BIII) pre-B; IgM citoplasmática
- (BIV) B; Ig superficie

Línea T

- Pro-T; CD7+
- Pre-T; CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+
- Cortical; CD1a+
- Madura; CD1a- y CD3 membrana +

En 1997 propiciado por la OMS se creó un comité de expertos para elaborar una clasificación de todas las neoplasias de estirpe hematológica

Los criterios establecidos por la OMS para la clasificación diagnóstica de los pacientes con leucemia aguda se fundamenta en la evaluación morfológica, el inmunofenotipo y las alteraciones genéticas recurrentes presentes en las células neoplásicas de la médula ósea y en otros tejidos infiltrados por el tumor (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid

Tissues 2008)

Esta clasificación diferencia neoplasias mieloides y linfoides;

1) Las neoplasias mieloides las divide en 4 grupos:

- Enfermedades mieloproliferativas
- Síndromes mielodisplásicos
- Enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas
- Leucemias agudas mieloides

I. LAM con anomalías genéticas recurrentes:

- a) t(8;21), t(15;17), inv (16), t(9;11), t(6;9) inv (3), t(1;22)

- b) mutaciones NPM1, FLT3, CEBPA
 - II. LAM con displasia
 - III. LAM relacionadas con tratamientos previos (agentes alquilantes o inhibidores de la topoisomerasa II).
 - IV. LAM no caracterizadas previamente, que incluyen:
 - a) Subtipos de la clasificación FAB
 - b) Leucemia Aguda Basófila
 - c) Panmielosis aguda con mielofibrosis
 - V. Sarcoma mieloide
 - VI. Proliferaciones mieloides en relación con el síndrome de Dawn.
 - VII. Neoplasias de células blásticas dentríticas plasmocitoides.
- 2) Las neoplasias linfoides las clasifican según sean B o T y, dentro de cada grupo, distinguen neoplasias de elementos precursores y maduros.
- Leucemias agudas linfoblásticas de precursores B.
 - I. LAL-B con t(9:22) (q34;q11).
 - II. LAL-B con alteraciones de 11q23.
 - III. LAL-B con t(1;19) (q23;p13).
 - IV. LAL-B con t(12;21) (p12;q22).
 - Leucemia células de Burkitt
 - Leucemias agudas linfoblásticas de precursores T.

1.2.2 Factores pronósticos en (LA)

El estudio de los factores pronóstico ha permitido, entre otras cosas, determinar el impacto de la terapéutica, basada en las diferentes características de los pacientes y de las mismas neoplasias. De esta forma, pueden brindarse terapias diferenciadas, es decir menos agresivas y de menor duración, cuando así se requiera, particularmente, los diferentes estudios y publicaciones relacionadas con el pronóstico de pacientes con LA tienen alrededor de tres décadas, esto ha contribuido de manera significativa, a que se pueda lograr la curación de gran parte de estos pacientes.

Los factores que tienen un valor pronóstico son los siguientes (hematología clínica 5a ed):

1. Edad. Entre 1 y 9 años es la de mejor pronóstico, seguida por la de 10 a 15 años. La edad inferior a 1 año confiere pronóstico más desfavorable.

2. N.º inicial de leucocitos. Se considera como criterio mayor riesgo las cifras por encima de $50 \times 10^9/L$.
3. Características citogenéticas. Son indicativos de alto riesgo los casos con hipodiploidía (menos de 45 cromosomas), con t(4;11) o reordenamiento del gen en MLL y las formas con t(9;21) o fusión de genes BCR/ABL (también llamado cromosoma Ph'). Por el contrario, indican un pronóstico favorable el hallazgo de hiperdiploidía de 50 o más cromosomas y la t(12;21) o fusión de genes TEL-AML1. En otras alteraciones cromosómicas consideradas hasta hace pocos años como indicativas de mal pronóstico, como la t(1;19) y la t(8;14) han dejado de serlo con los tratamientos actuales.
4. La rapidez de la respuesta al tratamiento inicial es un importante factor pronóstico, y puede evaluarse de dos formas: la desaparición o persistencia de blastos circulantes tras 7 días de monoquimioterapia con prednisona (Criterio del grupo alemán BFM) o la persistencia de blastos en aspirado de médula ósea a los 14 días del inicio del tratamiento (criterio seguido por el grupo americano CCSG y los grupos españoles Phetema y SHOP)
5. El fracaso en alcanzar la remisión completa (RC) con el tratamiento de inducción confiere un pobre pronóstico. Actualmente, un refinamiento en la valoración de la remisión completa (RC) o constituye la valoración de la enfermedad residual mínima (ERM)
6. El inmunofenotipo es otro elemento que parece no tener discusión ya que las leucemias de células tipo B tienen mejor pronóstico, en comparación con las de tipo T y M. mientras que dentro de las leucemias de células B, la leucemia de precursores de células B (CD10+) es de mejor pronóstico, por otra parte las B maduras (CD10 -) son de peor pronóstico.

1.2.3 Anormalidades citogenéticas en (LLA)

Se pueden demostrar cariotipos anormales en 50 a 60% de los casos de LLA. Las anormalidades parecen ser más comunes en la LLA-B y en la LLA común, que en la LLA-T. Se han descrito tanto hiperdiploidía como hipodiploidía. Los pacientes quienes tienen cifras cromosómicas mayores de 50 tienen un mejor pronóstico con remisión prolongada. Un cariotipo normal también se vincula con un mejor pronóstico. Los pacientes con anormalidades numéricas o estructurales o de ambos tipos, con cifras modales inferiores a 50, tienen un peor pronóstico. Cerca de 10 a 15% de los niños con LLA tiene el cromosoma de Ph el cual se vincula con un pronóstico adverso. El subtipo FAB L3 se

caracteriza por una translocación de 8 a 14, t(8;14). En particular, las siguientes aberraciones se vinculan con un pronóstico adverso; t(9;22), t(8;14), t(4;11) (McKenzie, 2000). La tabla 1 muestra algunas aberraciones estructurales vinculadas a Leucemia Aguda Linfoblástica.

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas estructurales no aleatorias en la LLA

Imunofenotipo	Anormalidad Cromosómica	Genes implicados
LLA de línea celular B	t(4;11)(q21;q23) t(5;14)(q31;q32)	IL-3, IgH
LLA célula pre-B	t(1;19)(q23;p13)	prl, E2A
LLA célula B	t(8;14)q24;q32 t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	c-myc, IgH c-myc, IgK c-myc, Igλ
LLA célula T	t(11;14)(p13;q11) t(1;14)(p34;q11) t(8;14)(q24;q11) t(10;14)(q24;q11) t(1;14)(p32;q11) t(14;14)(q11;q32) t(7;9)(q35-36;q34) t(7;14)(q35-36;q11) t(7;7)(p15;q11) t(7;14)(p15;q11) inv(14)(q11;q32) inv(14)(q11;q32)	tcl-2, TCRα TCRα c-myc, TCRα Tcl-3, TCRα TCRα TCRα TCRβ TCRβ TCRY TCRY TCRα Tcl-1, TCRα
Variable	t(9;22)(q34;q11) del 9(p21-22)	c-abl, bcr If-α, If-β1

*IL-3, interleucina 3; IgH, K, Y, inmunoglobulina pesada, cadenas ligeras kappa y lambda; TCRα, β, Y, receptor de célula T de genes α, β, Y, bce, región del grupo del punto de ruptura; If-α, β1, genes α, β1 del interferón. (De Hematología Clínica, McKenzie SB.)

1.2.4 Clasificación de riesgo en (LLA)

Después del tratamiento debe llevarse a cabo una evaluación estricta del riesgo de recaída en el momento del diagnóstico, de manera que los pacientes no sean sobretratados o subtratados. La edad, y el recuento leucocitario, el inmunofenotipo y el genotipo de las células leucémicas y la respuesta temprana al tratamiento de ventana o de la inducción de la remisión, son frecuentemente utilizados para la clasificación de riesgo. La mayoría de los oncólogos pediatras en países desarrollados clasifican a los pacientes en riesgo habitual, alto o muy alto. En fecha reciente el Children's Oncology Group (COG) ha propuesto un sistema que clasifica a los pacientes en 4 categorías la tabla 2 muestra este sistema de clasificación (Rivera L. s.f.)

Tabla 2. Sistema de clasificación del Children´s Oncology Group (COG).

	Riesgo bajo	Riesgo estándar	Riesgo alto	Riesgo muy alto
Edad	>1 año y <10 años	1 a 9 años	<1 y >10 años	
Genero	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	
Cuadro clínico	Leucemia reciente	Leucemia reciente	Leucemia avanzada	
Infiltración extramedular	Ausente	Ausente	Presente	
Leucocitos	<10 000	>10000µL y 50000µL	>50 000	
FAB	L1	L1 y L2	L3	
Inmunofenotipo	PCB CD10+	PCB CD10+ o –	B madura, T	
Genética	Hiperdiploidia (≥53 cromosomas). Triple trisomía de los cromosomas 4, 10 y 17, t(12/21)	Cariotipo normalseudodiploidia. Una o dos de las trisomías (4, 10 o 17), t(1;19)	Hipodiploidia (30 a 43 cromosomas)	t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), casi haploide
Índice de ADN	≥ 1.16	1 a 1.15	<0.8	<0.6
RT-PCR	TEL/AML1	E2A/PBX1		Bcr-abl, MLL/AF4
Respuesta a la prednisona	< 1 000 blastos en SP o <25% de blastos en MO en el día 7 de la ventana	< 1 000 blastos en SP o <25% de blastos en MO en el día 7 de la ventana	> 1 000 blastos en SP o > 25% de blastos en MO en el día 7 de la ventana	
Citorreducción temprana	M0 en M1 al día 14 de la inducción	M0 en M1 al día 14 de la inducción	M0 en M2 en el día 14 de la inducción	>10 ² a la semana 16

Adaptado de COG y varios talleres. (Rivera L.)

1.2.5 Clasificación de riesgo en (LMA)

Una vez realizado el diagnóstico de LMA, se clasifica de acuerdo a la FAB y se establecen factores de riesgo para el tratamiento. La tabla 3 muestra la clasificación FAB para LMA.

Tabla 3. Características para la clasificación FAB de la leucemia mieloide aguda.

Subtipo FAB	Nombre	Criterio diagnóstico	Histoquímica
M1	Leucemia aguda mieloblástica sin diferenciación	<90% de blastos no eritroides, 10% de células con maduración granulocítica o monolítica	MP+
M2	Leucemia aguda mieloblástica con diferenciación	30 a 89% de blastos no eritroides, 10% de células con maduración granulocítica, <20% de células monocíticas	MP+
M3	Leucemia promielocítica	<20% de promielocitos hipogranulares anormales cuerpo auer+	
M3V	Leucemia promielocítica variante	Promielocitos con citoplasma granular frío microgranular	
M4	Leucemia mielomonocítica		MP+ NSE+
M4Eo	Leucemia mielomonocítica con eosinofilia	>30% de blastos no eritroides, <80% de células con linaje monocítico Eosinófilos anormales con gránulos y cúmulos de eosinófilos de basófilos grandes	MP+ NSE+ Eos. PAS+
M5	Leucemia aguda monocítica	>80% de blastos no eritroides son monoblastos, promonocitos o monocitos M5a = > 80% de células monocíticas son monoblastos M5b = < 80% de células monocíticas son monoblastos	PAS+
M6	Eritroleucemia		
M7	Leucemia aguda megacariocítica	< 80% de células no eritroides son blastos, pero < 50% de células son eritroblastos >30% de células no eritroides son megacarioblastos, prolongaciones citoplasmáticas, mielofibrosis	Peróxidos Plaquetas MP+

(Consejo nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia Rivera L)

1.3 El ciclo celular

El ciclo celular (CC) es el conjunto de eventos que van desde el nacimiento y el crecimiento hasta la división de una célula cualquiera; es decir, la proliferación propiamente dicha. La importancia de este proceso la vemos, por ejemplo en el cuerpo humano, donde se regeneran constantemente los epitelios (como los de cavidades intestinales), así como células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos); e incluso algunas células pueden accionar su CC como mecanismo de defensa (los hepatocitos en la regeneración del hígado); todo ello para mantener no solo la integridad sino también las

funciones biológicas adecuadas del organismo frente a las condiciones que le impone el ambiente (López F. 2002).

En organismos multicelulares el control del ciclo celular es de importancia crucial ya que es la base del crecimiento proporcional de órganos y tejidos y se encuentra implicado en el mantenimiento del organismo. La alteración en la regulación y control del ciclo celular es una de las principales causas que conducen al cáncer. El ciclo celular procede según una secuencia definida de eventos cuyas últimas consecuencias dependen de la finalización completa de cada evento anterior. El objetivo de esta dependencia es distribuir replicas completas y exactas de genoma en las dos células hijas (Boticario C. & Cascales M. 2012).

1.3.1 Fases del Ciclo Celular

Una célula no puede dividirse a menos que proceda a través de dos procesos alternativos, la duplicación de su genoma (fase S) y la verificación de la mitosis (fase M). Se denomina fase G1 (G, gap) y el periodo entre S y M se denomina G2 (Figura 10). Así el ciclo celular consiste en las fases siguientes:

1) Interfase,

- Fase de síntesis (S): en esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de las células hijas.
- Fase G1 y G2 (intervalo): entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula está muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos), de lo contrario las células se harían más pequeñas con cada división.

La serie de fases antes mencionadas: G1, S, G2, M y G0, consta a su vez, de dos subgrupos: un estado indeterminado (A) y un estado determinado (B). El primero consiste en la porción variable de G1 que coincide con G0, y el segundo en la porción fija de G1, S, G2, M y porción fija de G1. La indeterminación del estado A se debe a la variabilidad de G1 (Boticario C. & Cascales M. 2012).

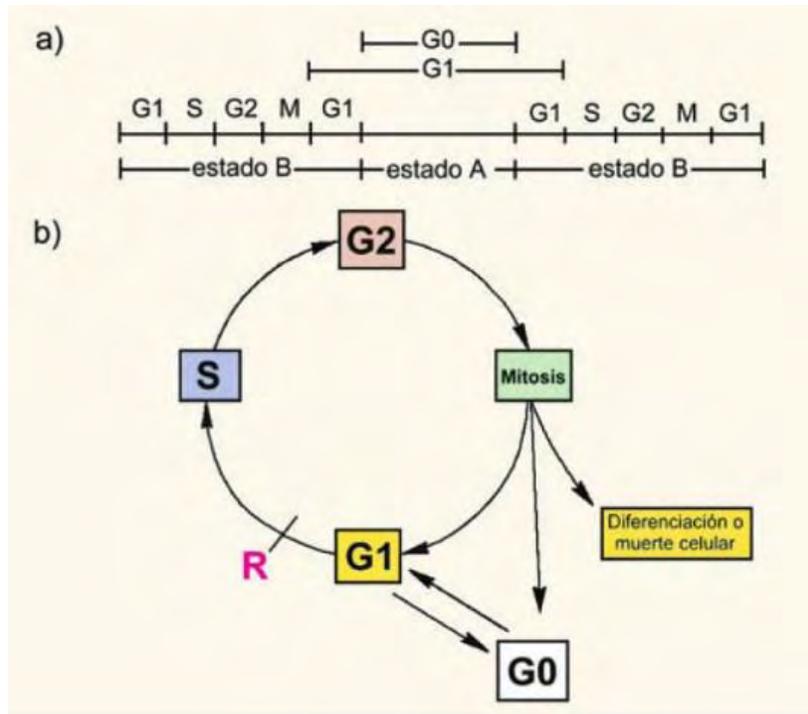


Figura 10. Ciclo de división celular. (a) Modelo de transición: estado A indeterminado, porción de G1 que coincide con G0; estado B determinado que consiste en G1, S, G2, M y porción fija de G1. (b) G0 es el estado hacia el cual se dirigen las células cuando el ciclo se detiene en G1 debido a diversas condiciones ambientales. Se muestran las transiciones irreversibles hacia la diferenciación celular terminal o hacia la muerte celular. R, punto de restricción (Boticario C. & Casales M. 2012).

2) Fase M

Mitosis (M): en esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. La fase M para su estudio se divide en:

- Profase: en esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromatidas hermanas) se condensan en el núcleo mientras en el citoplasma se comienza a ensamblar el huso mitótico entre los centrosomas.
- Metafase: comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas se alinean en el ecuador de la célula.
- Anafase: se produce la separación de las cromatidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas hijos, los cuales migran hacia los polos opuestos de la célula.

- **Telofase:** Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil.
- **Citocinesis:** finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas (Fig. 11) (Nuñez R. & Escalona J. 2005).

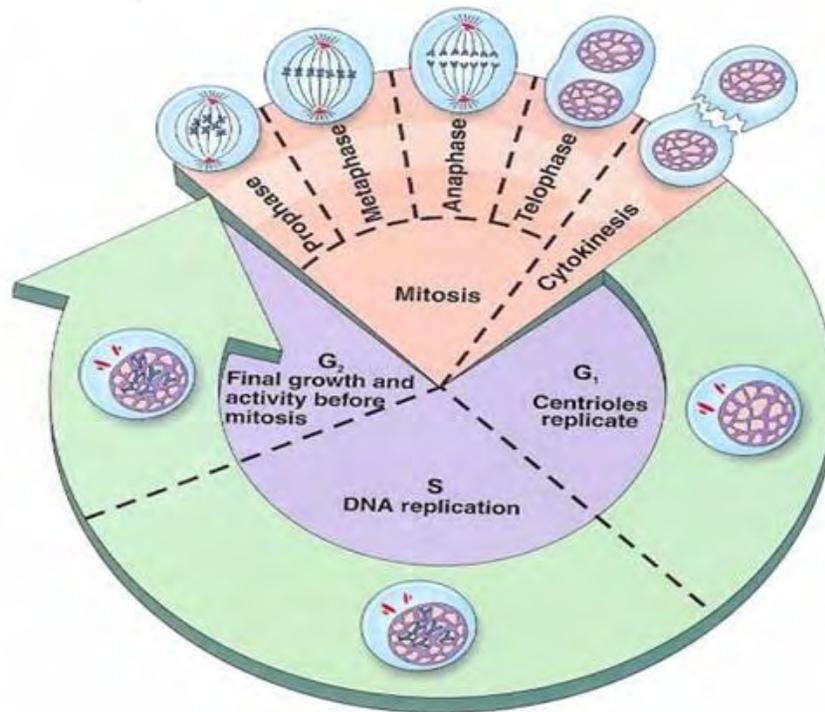


Figura 11. Fases del ciclo celular. (Nuñez R. & Escalona J. 2005)

1.3.2 Control del ciclo celular

En regiones concretas del ciclo, la célula comprueba que se cumplan las condiciones para pasar a la etapa siguiente, y si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene. Dentro de cada célula existen muchas Cdk, moléculas que se usan en la decisión de estos puntos de chequeo. La coordinación del ciclo se controla mediante la regulación de tres transiciones.

1. Salida de mitosis (M/G₁)
2. Transición G₁/S
3. Entrada en mitosis (G₂/M)

Salida de mitosis. Al final del ciclo en G1, justo antes de la entrada en la fase S. En este momento es cuando la célula tiene que tomar la decisión clave: replicar DNA, retrasar la replicación o entrar en estado de reposos proliferativo. Es en este punto donde las células eucariotas dejan el ciclo si las condiciones no son las adecuadas para la división celular o si la célula pasa a G0 por un periodo largo. Este punto en G1 se denomina punto de restricción y se encuentra controlado por la proteína supresora tumoral p53, que puede detener el ciclo, permitirle continuar o conducir a la célula a la apoptosis. Lo anterior mencionado se muestra en la figura 12 (Boticario & Cascales, 2012).

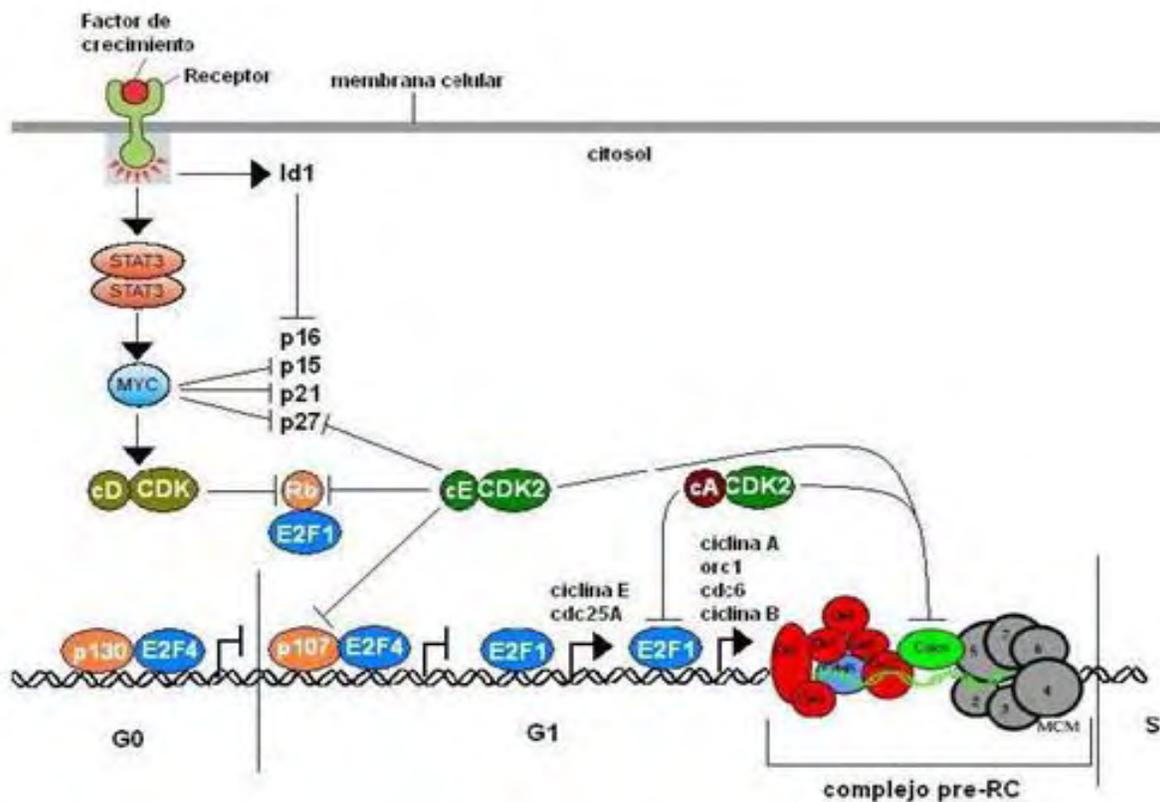


Figura 12. Eventos moleculares en la transición G1/S del ciclo celular. Se muestra hipotética vía de transducción de señales para esquematizar la activación del complejo ciclina D/CDK que promueve del ciclo (arriba izquierda). Son los complejos ciclina E/CDK y ciclina A/CDK2 quienes fosforilan a cdc6 y logran el desensamble del complejo pre-replicative (pre-RC) y el reclutamiento de factores de replicación (como DNA polimerasa) para dar paso a la fa(abajo a la derecha). El complejo pre-RC no se ensambla hasta una nueva fase G1 donde baja la actividad cinasa. Una vez superado el punto R la célula inicia la replicación del DNA. (Quezada M. 2007)

Entrada en mitosis. El segundo punto de verificación se localiza al final de G2 y es el que marca el comienzo de la mitosis. Si este punto se supera, la célula ha de iniciar multitud de procesos celulares que señalizan el principio de la mitosis. El factor promotor de la

fase M (MPF), es el complejo formado por las ciclinas mitóticas con la Cdk de la fase M que inicia los eventos relativos a la mitosis. La naturaleza molecular de este punto de chequeo implica la activación de una fosfatasa conocida como Cdc25, la cual en condiciones favorables elimina el grupo fosfato inhibitorio presente en el complejo MPF. Sin embargo el ADN esta frecuentemente lesionado antes de la mitosis, y para prevenir la transmisión de esa lesión a las células hijas, el ciclo se detiene por inactivación de la fosfatasa Cdc25 inactivación que se lleva a cabo mediante fosforilación por otras protein cinasas (Figura 13). Cuando la célula entra a mitosis se realizan las siguientes funciones, reunión del huso mitótico, rotura de la membrana nuclear y condensación de los cromosomas. Estos eventos conducen a la célula a metafase.

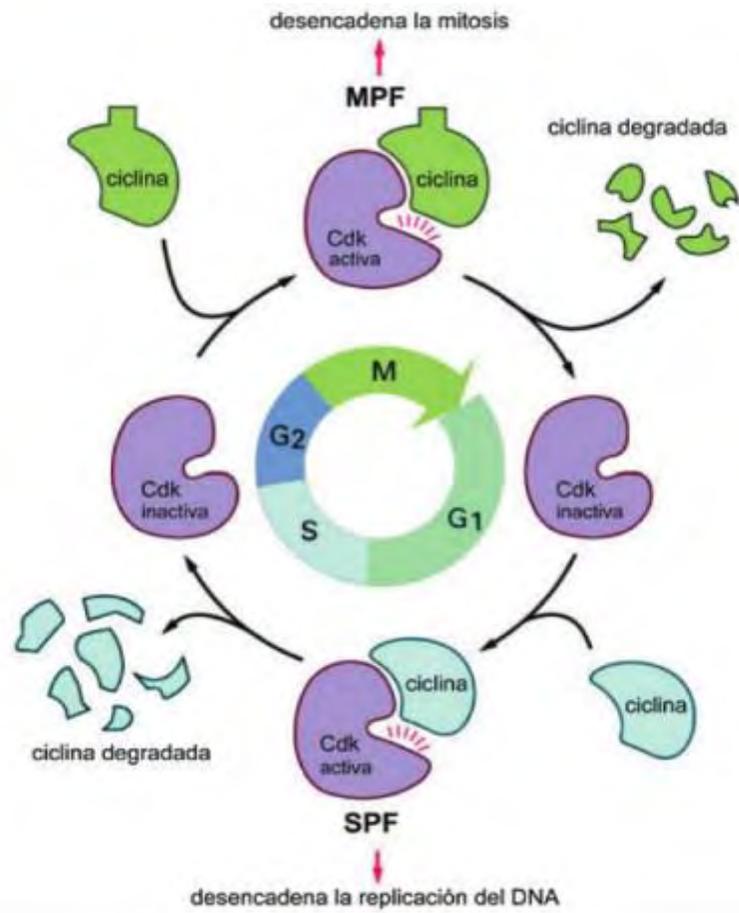


Figura 13. Se muestra la progresión del ciclo celular. SPF (factor promotor de la síntesis del ADN) desencadena la replicación del ADN y MPF (factor promotor de la mitosis). La unión de la ciclina a Cdk promueve la activación de la cinasa, tanto en SPF como en MPF. En ambos casos la separación y degradación de las ciclinas de uno y otro factor, por el sistema de la ubiquitina-proteosoma, deja inactiva la Cdk. (Boticario C. & Casales M 2012)

Transición metafase/ anafase. El tercer punto de chequeo o de verificación se encuentra en el tránsito metafase/ anafase, que es cuando inicia la citocinesis. (Figura 14).

- Anafase es aquella etapa de la mitosis cuando los cromosomas se separan en una célula eucariota. Este tercer punto de chequeo del ciclo está situado a nivel del complejo promotor de la anafase (APC/C) el cual actúa de la siguiente manera:
 - a) Destruye la ciclina B, insertándola a la ubiquitina, proteína que se encarga de marcar proteínas para su destrucción por el proteosoma.
 - b) Desencadena eventos que conducen a la disociación de las cohesinas
 - c) Permite separación de las cromatidas hermanas y su movimiento hacia los polos

Para prevenir la incorrecta agregación de los cromosomas, por una precipitada degradación de la ciclina B y securina, los complejos proteicos mitóticos consistentes en BubR1, Bub3 y Mad2 se unen e inhiben al complejo APC/Cdc20 hasta que todos los cromosomas estén apropiadamente insertos en el uso mitótico y alineados en la placa metafase. Los factores de transporte nuclear Rae1 y Nup98, que se convierten en proteínas mitóticas, previenen los fallos en la agregación de los cromosomas por ensamblaje al complejo APC/Cdh1.

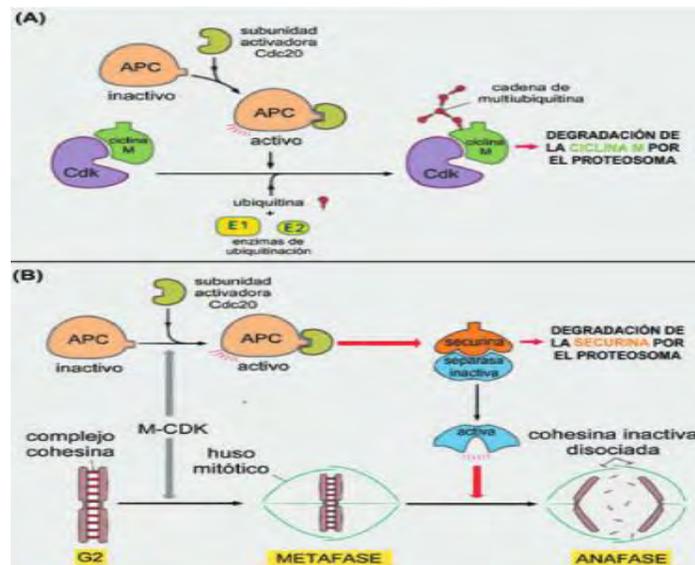


Figura 14. La proteólisis juega un papel importante en la regulación del ciclo celular. (A) degradación de la ciclina M. El complejo promotor de la anafase (APC) interviene en la destrucción de la ciclina M y su posterior degradación por el proteosoma. E1 y E2 son las dos primeras enzimas de la ubiquitinización. (B) Degradación de la securina. Cdc2 se une a APC y activa la E3 ligasa lo cual inicia la ubiquitinización de la securina, lo cual deja libre y activa a la separación que actúa disociando la cohesina y permitiendo la separación de las cromatidas (anafase) (Boticario C. & Casales M. 2012)

1.3.3 Puntos de chequeo que aseguran el control de calidad del ciclo

Lesión del DNA. Este sensor se encuentra antes de que la célula se incorpore a la fase S (punto de verificación G1) y también durante la fase S. La lesión del DNA impide la progresión del ciclo celular hasta que la lesión haya sido reparada. Si la lesión al DNA es tan severa que no puede repararse la célula se autodestruye por apoptosis.

Al final de la fase S. La célula parece controlar también la presencia de fragmentos de Okazaki en la cadena rezagada durante la replicación del DNA. La célula no puede continuar el ciclo si estos fragmentos no han desaparecido.

En la verificación del uso mitótico. Algunos fallos han sido descubiertos en las fibras del huso que atacan los cinetocoros y frenan a la célula en metafase hasta que los cinetocoros se insertan correctamente (Control fase M). Este sistema de verificación detecta el alineamiento impropio del mismo huso, bloquea la citocinesis y desencadena la apoptosis si el daño es irreparable.

Las alteraciones en los puntos de control pueden permitir a la célula continuar dividiéndose a pesar del daño en su integridad.

1.3.4 Fase G0 y estado de reposo proliferativo

Una célula puede dejar el ciclo de manera temporal o permanente. La célula sale del ciclo en G1 y entra en una fase o estado designado G0. Aquí la célula se encuentra en estado quiescente o de reposo proliferativo, estas células se encuentran enormemente ocupadas realizando sus funciones en el organismo. A menudo las células en G0 son diferenciadas terminales y nunca se reincorporan al ciclo, pero seguirán realizando sus funciones hasta que mueran. Para otras células, el estado en G0 puede preceder a la reentrada en el ciclo celular. La mayoría de los linfocitos en la sangre se encuentran en G0, sin embargo, con una estimulación, tal como encontrarse con un antígeno apropiado, pueden reentrar en el ciclo celular a nivel de G1 y proceder a través de nuevas rondas de fases alternativas S y Mitosis.

En G0 hay una activa represión de genes para que se verifique la mitosis. Las células cancerosas no pueden entrar en G0 y están destinadas a repetir el ciclo indefinidamente.

1.3.5 Fase G1 y cáncer

G1 es un periodo en el que intervienen muchas señales que van a influenciar la división celular y la puesta en marcha del programa de desarrollo de la célula. Procesos diversos,

metabólicos, de estrés y ambientales, se integran e interpretan durante este periodo. Es durante G1 cuando la célula toma decisiones tales como renovarse, diferenciarse o morir. Figura 15.

La propia interpretación de estas señales es algo muy delicado y los fallos en la ejecución conducen al cáncer. Cuando las mutaciones permiten a la célula permanecer en estado proliferativo, evitando o eludiendo la diferenciación terminal o la muerte, esa célula está amenazada a escalar un comportamiento degenerativo. Muchos oncogenes y genes supresores de tumores, como también las terapias anticáncer pueden estar ligados a fallos en el control de G1.

Una célula madre que está constantemente rellenando el epitelio intestinal, un linfocito estimulado de repente por antígeno o un angioblasto respondiendo a lesión vascular, todos proceden a través de G1 en circunstancias diferentes, con diferentes señales, diferentes programas de desarrollo y diferentes riesgos de transformación maligna, por ultimo para entrar en fase S todas las células tienen que cumplir el mismo requerimiento esencial: tienen que activar las cinasas dependientes de ciclina.

La Cdk de G1 desencadena la replicación del ADN. En la activación de Cdk2, un complejo prereplicativo recluta DNA helicasa, primasas y polimerasas que causan el desenrollamiento de la doble hélice y la replicación del DNA. La actividad Cdk es esencial para estos procesos, ya que varios componentes del complejo prereplicativo tienen que ser fosforilados. Los nuevos orígenes replicados no se reensamblan con el nuevo complejo prereplicativo hasta que la actividad de Cdk una vez más cae al final de la mitosis. La mitosis a su vez, no procederá hasta que se complete la replicación del DNA. Estos eventos juntos aseguran que el DNA se replicará solo una vez por ciclo.

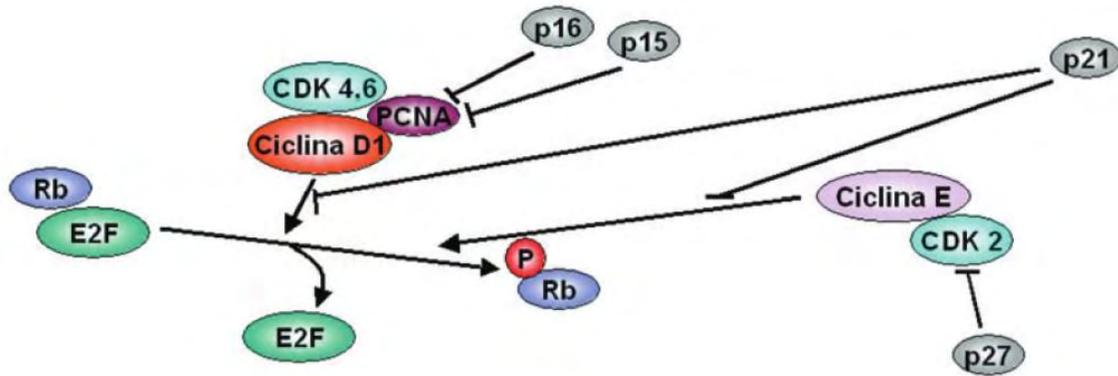


Figura 15. Mecanismos de regulación de la fase G1. En células normales proliferativas la expresión de ciclina E es periódica siendo máxima en la transición G1/S y forma complejos con Cdk2, sugiriéndose que su inducción es crucial para la activación de la replicación del DNA. Parece ser que mientras las ciclinas D son integradoras de señales extracelulares con la maquinaria del ciclo celular, la ciclina E puede ser crucial para la activación del inicio de la replicación del DNA. Las quinasas dependientes de la ciclina D1 fosforilan y mantienen fosforilada la proteína retinoblastoma (Rb) para que el ciclo avance. Los inhibidores de la progresión del ciclo las proteínas p15, p16, p21 y p27, actúan a distintos niveles (Boticario C. & Casales M. 2012).

El papel de G1 en el ciclo celular tiene varios componentes que se encuentran implicados en el cáncer. La sobreexpresión de ciclina D ocurre en el 50% de los cánceres de mama. Mutaciones transmitidas por alelo Rb causa retinoblastoma en la inactivación somática del otro alelo. La inactivación somática de ambos alelos ocurre en varios tipos de cáncer. Niveles bajos de p27 se relacionan con prognosis pobre en muchos tipos de carcinoma, en tumores de cerebro y en linfomas. Todas estas alteraciones pueden coaccionar a las células para entrar en la fase S en lugar de diferenciar o morir. La expansión resultante de la cantidad de células proliferativas incrementa en las células la posibilidad de adquirir mutaciones oncogénicas adicionales (Boticario C. & Casales M 2012)

1.3.6 Fase G2 mecanismos que regulan la entrada en mitosis

Los dos acontecimientos principales en el ciclo celular son, la síntesis del DNA, que es cuando los cromosomas se replican, y la mitosis, que es cuando los cromosomas replicados se dividen en dos células hijas. La entrada en mitosis se regula por un mecanismo común en todas las células eucariontes y está determinada por la activación de la cinasa dependiente de ciclina, una proteína cinasa que requiere ser desfosforilada por la fosfatasa cdc25.

El punto de control en G2 previene a las células de entrar en mitosis cuando el DNA está lesionado, proporcionando una oportunidad para repararlo y deteniendo la proliferación de

células deterioradas. Cuando las células contienen DNA lesionado, el supresor tumoral p53 y la familia Rb de represores transcripcionales aúnan esfuerzos para regular un gran número de genes que codifican proteínas requeridas para G2 y M la eliminación de estas proteínas ayuda a mantener las células detenidas en G2 (Figura 16).

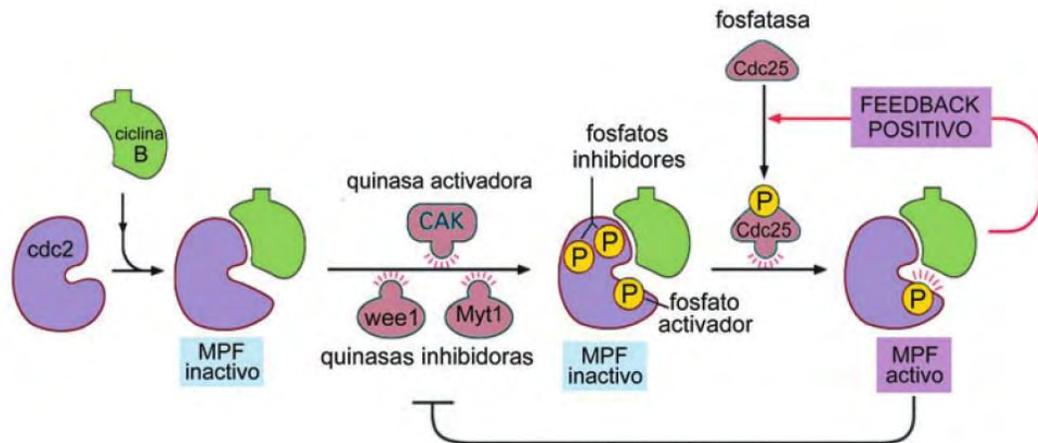


Figura 16. Regulación de la transición G2/M en mamíferos. Una vez formado el factor promotor de la maduración (MPF), conformado por la quinasa Cdc2 y la ciclina B, para su completa activación requiere ser fosforilado en el residuo Tre161 por la CAK (Cdk activating kinase = ciclina H-Cdk7). Sin embargo para evitar una entrada prematura en mitosis el complejo se mantiene en estado inactivo mediante su fosforilación en Tre14 por la quinasa Myt1 y en la Tir15, por la quinasa wee1. Una vez verificada la completa y correcta replicación y la presencia de todos los componentes para la mitosis, en el MPF es desfosforilado en Tre14 y Tir15 por la fosfatasa Cdc25, que requiere, a su vez, ser fosforilada por el MPF para ser activa teniendo así lugar la mitosis. Los sustratos clave fosforilados por el complejo Cdk2/ciclina B activo incluyen la histona H1, la proteína p60, laminas, proteínas centrosómicas y otras que necesitan ser desplazadas de la cromatina para permitir la condensación cromosómica. (Boticario C. & Casales M. 2012)

1.4 Citometría de flujo

En su esencia la citometria de flujo representa un proceso en el que las células u otras partículas biológicas incluidas en un flujo de líquido isotónico son empujadas a pasar, alineadas y de una en una, por delante de uno o varios detectores capaces de recoger y medir diferentes características físicas y/o químicas de esas células o partículas, a la vez que son iluminadas por un haz de luz, habitualmente un láser. En términos generales, las características celulares analizadas mediante esta tecnología son el reflejo de dos grandes grupos de parámetros: por un lado, los derivados de la luz que al incidir sobre la célula o partícula es dispersada y que se relacionan entre otras características con el tamaño y granularidad celulares y, por otra parte los que se asocian con la luz generada como consecuencia de la presencia en la célula de fluorocromos, bien de forma natural

(autofluorescencia) o unidos a ella artificialmente (Orfao A; et al. 2003). Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora, como se muestra en la Figura 17.

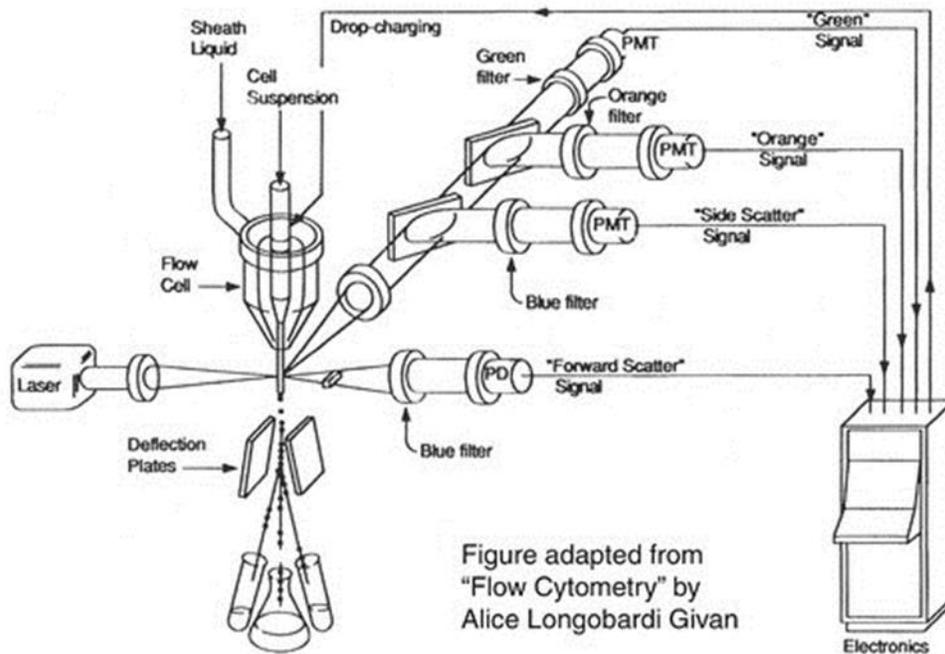


Figura 17. Esquema generalizado de los componentes de un citómetro. La muestra pasa por un flujo laminar producido por otro líquido isotónico y esto hace que las células viajen ordenadas una tras otra. El láser incide en la célula y está dispersa la luz de manera lateral y frontal al tiempo que emite fluorescencia. La luz y la fluorescencia son detectadas por separado. Las señales luminosas son colectadas y transformadas en pulsos que llegan a la computadora. (Salgado LM 2002)

1.4.1 Inmunofluorescencia

El término Inmunofluorescencia se usa para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo. Ya en 1941, Coons informó de la aplicación de esta técnica para localizar antígenos y anticuerpos en secciones de tejido. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Kohler y Milstein en 1975, incrementó drásticamente el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular. La capacidad para detectar simultáneamente la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, abre completamente el campo del análisis multiparamétrico. Cuando una molécula absorbe un haz de luz, y por tanto energía, sus electrones pueden alcanzar

una órbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado una órbita de mayor excitación y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a una órbita de menor energía. En algunos compuestos el electrón excitado cae rápidamente, usualmente en nanosegundos, al estado basal, emitiendo un cuanto de luz o fotón y desprendiendo energía. Esta transición radiante se denomina fluorescencia. A este tipo de compuestos se les denomina fluorocromos. (Barrera L. et al 2004).

El objetivo del análisis por inmunofluorescencia en citometría de flujo es identificar un grupo específico de células que compartan propiedades comunes.

1.4.2 Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula, (Figura 18 y tabla 4). Éstos se dividen en:

- Parámetros nucleares
- Parámetros citoplásmicos
- Parámetros de superficie
- Parámetros extracelulares

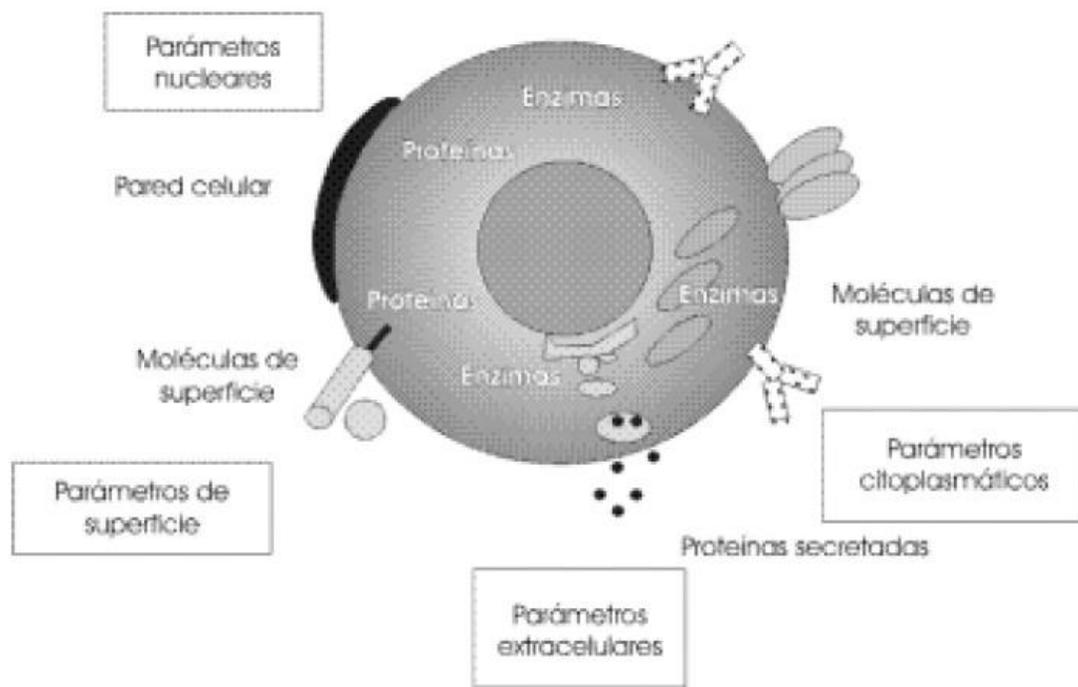


Figura 18. Parámetros que se pueden analizar mediante citometría de flujo. (Barrera L. 2004)

Tabla 4. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo.

Parámetros nucleares	Parámetros basados en ADN	-Contenido de ADN -Contenido de pares GC/AT -Superenrollamiento de ADN -Estructura de la cromatina -Roturas de hebras de ADN	-Ploidía de ADN -Ciclo celular -Apoptosis-necrosis
	ADN + otros parámetros	-ADN/ARN -ADN/proteínas totales -ADN/antígenos nucleares -ADN/antígenos celulares	-Cariotipo en flujo -Regulación ciclo celular de poblaciones específicas
	Parámetros no basados en ADN	-Receptores nucleares -Expresión de genes indicadores ("reporteros") -Morfología nuclear -Componentes nucleares	
Parámetros de superficie	Estructura de la superficie celular	-Receptores de superficie -sitios de unión a lectinas -Densidad de superficie -Pared celular	
	Dinámica de la superficie celular	-unión de ligandos -Transporte/internalización de ligandos -Eflujo de solutos -Exposición de receptores -Potencial de membrana	
Parámetros citoplasmáticos	Componentes intracelulares	-Proteínas totales -Proteínas estructurales -Proteínas funcionales -Glicoproteínas intracelulares -Lípidos intracelulares -Tioles libres	
	Funciones intracelulares	-Actividad enzimática -movimientos de iones -Proteínas de membrana	
	Entorno intracelular	-Concentración de iones -Movimiento de iones -lípidos y proteínas oxidados	
Parámetros extracelulares	Dinámica de la secreción celular	-Captura de proteínas secretadas -Ensayos de cuantificación de suero	-Activación celular -Diferenciación celular

(Barrera L. 2004)

Un aspecto importante y que representa una ventaja de ella, es la posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos. Así, es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la célula como su patrón de secreción de citosinas, o bien, la etapa del ciclo celular en la que se encuentra.

1.4.3 Aplicación clínica de la citometría de flujo e inmunotipificación

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La citometría de flujo permite el análisis de un gran número de células (habitualmente entre 10,000 células por muestra y, más de un millón en los estudios de enfermedad mínima residual). La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba (Figura 19) (Barrera L. 2004).

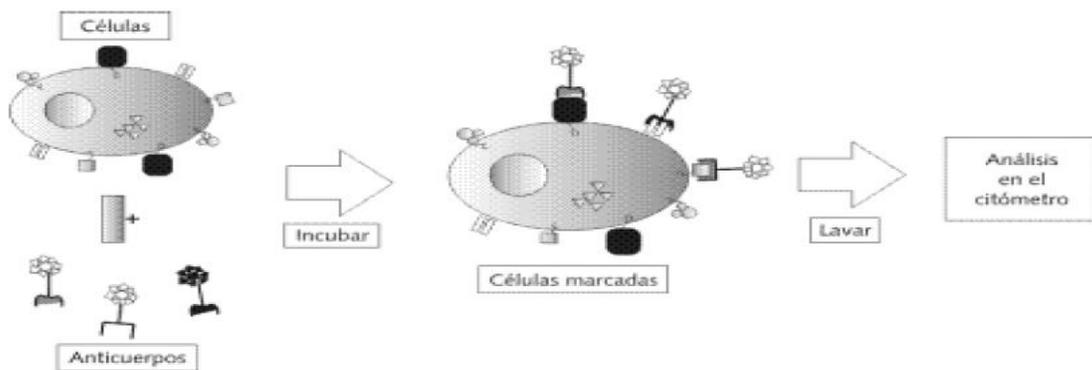


Figura 19. Método de marcaje o tinción fenotípica para células. Los anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos, se unen a los antígenos de la célula (reacción antígeno anticuerpo) (Barrera L. 2004)

1.4.4 Citometría de flujo y ciclo celular.

La citometría de flujo se aplica con éxito para el estudio del ciclo celular, el cual puede ser explorado a lo largo de sus diferentes fases, marcando cada célula con una tinción ligada específicamente al DNA que permite clasificar las poblaciones celulares en G1, S o G2/M. Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del DNA esta la técnica de Vindelov et al (1983) que utiliza yoduro de propidio como fluorocromo y agente intercalante y analiza la distribución del ADN. Este fluorocromo presenta sobre otros la propiedad de ser muy estable y poder ser excitado por un láser de argón estándar, producir histogramas con coeficiente de variación bajos y emitir en la región naranja-roja del espectro. (Metodología e instrumentación de análisis celular)

La cuantificación de ácidos nucleicos mediante el empleo de diferentes compuestos químicos fluorescentes capaces de unirse de forma específica al ADN, al ARN o a ambos representa desde el punto de vista cronológico, una de las primeras aplicaciones de la citometría de flujo.

Existen una gran cantidad de fluorocromos capaces de unirse al ADN celular. De ellos el yoduro de propidio y el bromuro de etidio son los de uso más extendido en citometría de flujo. Ambos se excitan a longitudes de onda de 488 (luz disponible en la mayoría de los citómetros de flujo) y se unen de forma estequiométrica al ADN de doble cadena. Su principal problema radica en que se unen también al ARN de doble cadena, lo que hace aconsejable tratar previamente a las células con ARNasa. Además, para la tinción con estos fluorocromos la membrana de las células necesita haber sido fijada y/o permeabilizada.

En el caso del naranja de acridina no se presentan los problemas anteriores ya que este fluorocromo puede ser utilizado para teñir el ADN en células vivas y la fluorescencia debida a su unión a ácidos nucleicos de cadena simple gran parte del ARN celular se detecta en distinta zona del espectro luminoso naranja en relación con la debida a la unión con la mayoría del ADN celular verde. Sin embargo, este fluorocromo presenta el inconveniente de unirse al material plástico del citómetro de flujo creando problemas en mediciones posteriores.

En líneas generales la cuantificación de ADN proporciona dos tipos de información biológica distintos: por un lado nos orienta sobre la existencia o no de anomalías clonales de ADN aneuploidia de ADN y, por otra parte nos permite conocer la distribución de una población a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (Figura 20) (Orfao A. et. al 2003).

Todos los tejidos contienen tres poblaciones celulares diferentes. La población principal está compuesta por las células que “ciclan”, o sea que se dividen continuamente pasando de una mitosis a otra. Después de un cierto número de ciclos, un pequeño número de células puede dejar el ciclo celular y morir. Hay un tercer grupo celular que abandona el ciclo para mantenerse transitoriamente inactivo y reingresar cuando es estimulado por algún factor del microambiente (Figura 21) (Tsieh Sun 1993).

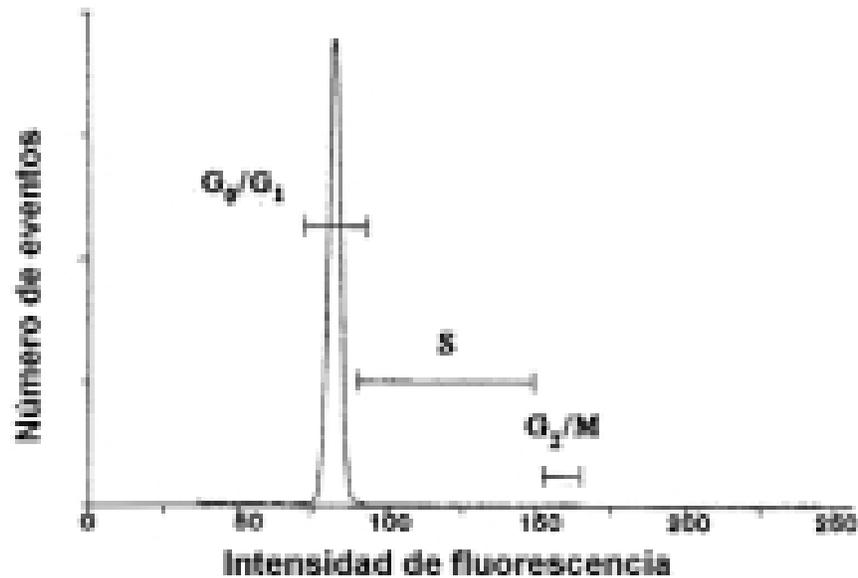


Figura 20. Histograma de una población celular normal. Se estableció como valor diploide las 80 unidades de intensidad de fluorescencia (Frierson H. & Linder J. 1997).

La mayoría de las células de un tejido están en la fase G₀/G₁ del ciclo celular, un grupo mínimo está en fase S y otro grupo también reducido está en la fase G₂/M. De este modo, la citometría de flujo correspondiente a las células de un tejido normal teñido con ioduro de propidio tendrá un histograma del tipo que se muestra en la figura 20. En el eje de las X figura la intensidad de fluorescencia que es expresión del contenido de ADN de las células. En el eje de las Y está el número de células analizado. El mayor número de células corresponde a la fase G₀/G₁ del ciclo celular y su contenido de ADN está en el rango diploide. Las pocas células con una cantidad creciente de ADN son las que se encuentran en fase S y finalmente, un grupo pequeño, que corresponde a la población celular en fase G₂/M, tiene el doble de contenido de ADN ya que lo duplicó para dividirse

(Rovegno, A. 2004)

Cualquier cambio en el contenido de ADN de las células que están en fase G₀/G₁ es considerado anormal y se denomina aneuploide. Si el contenido de ADN es mayor que el normal se llama hiperdiploide, y si es menor hipodiploide. Cuando el contenido anormalmente alto alcanza el doble del normal se utiliza el término tetraploide.

1.4.5 Índice de ADN

El aumento o disminución en el contenido de ADN es frecuente en las células neoplásicas y es la resultante de las anomalías cromosómicas de las mismas.

El índice de ADN se define como un coeficiente entre los valores de contenido de DNA relativo de las células en estudio (en fase G0/G1) y de DNA en células diploides normales (en fase G0/G1) (Gray, Dolbeare, & Pllavincini, 1991).

$$\frac{ADN\ G0/G1\ Muestra}{ADN\ G0/G1\ Normal} = \text{Índice de ADN}$$

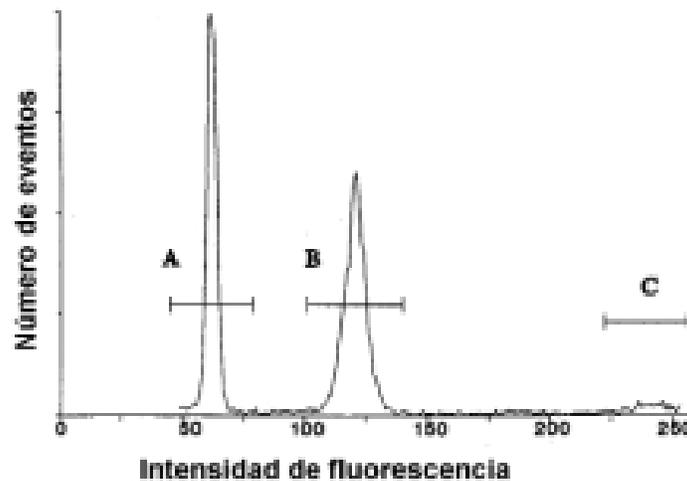


Figura 21. Histograma de una población celular problema. El pico A corresponde al grupo de células normales en fase G0/G1 con ADN en rango diploide establecido en 60 unidades de intensidad de fluorescencia. El pico B es el de la población celular en estudio, cuyo grupo en fase G0/G1 tiene un contenido de ADN de 120 unidades de intensidad, que es el doble del diploide, por lo cual la población tiene contenido de ADN tetraploide. El pico C es el de las células en fase G2/M de la población en estudio, que tienen 4 veces el contenido normal de ADN, expresado por una intensidad de fluorescencia de 240 unidades. (Messing E. 2002)

El parámetro de mayor valor en cuanto a la calidad de los histogramas es el coeficiente de variación del pico G0/G1 (CV) que corresponde al desvío estándar del pico dividido por la media y expresa la dispersión de datos alrededor del valor medio. Cuanto más pequeño es el CV, más sensible fue el análisis. Los grandes CV dejan abierta la posibilidad de que esté incluido un pico aneuploide dentro del pico diploide (Frierson & Linder, 1997).

El índice de ADN más comúnmente medido a través de citometría de flujo permite medir los linfoblastos que se encuentran en fase S del ciclo celular de tal manera que cuando el índice es mayor a 1.16 se identifica a los pacientes con hiperdiploidía (>50 cromosomas). Esto se relaciona con una mayor sensibilidad a los agentes quimio tácticos fase-específicos.

Otra variable de interés en el análisis de los histogramas de ADN es el Índice de Proliferación (PI) o Fracción en fase S que estima el porcentaje de células en esa fase del ciclo celular y que en muchos tumores tiene un valor pronóstico superior al de la ploidía. El propósito de esta determinación es conocer la actividad proliferativa del tumor que es expresión de su agresividad. Los citómetros de flujo tienen incorporados programas para su medición. La fórmula general para este índice es: (Rovegno, A. 2004)

$$PI = \frac{\text{Células en proliferación (S + G2 / M)}}{\text{Población celular total (G0 / G1 + G2 / M)}} \times 100$$

1.5 Citogenética

1.5.1 Cariotipo

Los cromosomas son las estructuras en que se organiza la cromatina nuclear y que tienen una expresión dinámica en las distintas fases del ciclo celular. En la mitosis estas estructuras comienzan un proceso de compactación que alcanza su máximo nivel en la metafase. Los cromosomas se tiñen fácilmente cuando están condensados y pueden ser individualizados con el microscopio óptico. Cada cromosoma contiene una molécula de ADN lineal asociado a distintas proteínas y el contenido de genes es variable aunque esta en relación con su tamaño. Por eso cualquier alteración en el número o la estructura de cromosomas puede ser causa de enfermedades. Para la detección de estas alteraciones se desarrollaron numerosas técnicas y todas ellas requieren de un observador entrenado que las interprete. La citogenética es la rama de la biología que se encarga del estudio de los cromosomas anormales. (Tamar C. et. al. 2008)

El cariotipo es la constitución cromosómica de un individuo y es un estudio de rutina en genética médica. Los cariotipos se pueden informar presentando todos los pares cromosómicos ordenados de acuerdo a su tamaño.

1.5.2 Cultivo celular

Para el estudio cromosómico se debe realizar el cultivo un tejido del individuo donde las células crezcan y se dividan rápidamente. El tejido más accesible para ese fin es la sangre y las células que crecen son los linfocitos. Se incuba a 37°C durante 72 horas. La estimulación de la división celular se logra con la adición de un factor mitogénico como es la fitohemaglutinina. Pasado ese tiempo, se agrega una solución de colchicina al medio para detener la división celular y evitar que las células completen la mitosis. La colchicina actúa inhibiendo la formación del huso mitótico y las células que alcanzan la metafase se acumulan en el cultivo. Luego se agrega una solución hipotónica que hace que las células se hinchen y se las hace estallar con una técnica de goteo sobre un portaobjeto y los cromosomas se liberan. Posteriormente el material se fija y se tiñen de acuerdo a las diferentes técnicas (Tamar C. et. al. 2008)

1.5.3 El Bando cromosómico

Las técnicas de bandeamiento permiten hacer un adecuado análisis de cada uno de los cromosomas. Individualizándolos y permitiendo su análisis e identificación adecuados. Hasta el momento se han descrito las bandas G, las bandas R, las bandas C, las bandas T y las bandas Nor; dentro de ellas las bandas G y las bandas R son las más utilizadas por sus características. Las bandas pueden dividirse en morfológicas si corresponden a la heterogeneidad de la cromatina, dentro de éstas tenemos: las bandas G, las bandas R, bandas Q, bandas C y bandas T y bandeamiento dinámico si depende de los patrones de replicación de los cromosomas (Rooney & Czepulkowski, 1978).

El bandeo G se logra con un tratamiento controlado con tripsina antes de la coloración con Giemsa y produce bandas claras y oscuras en los cromosomas. Las bandas oscuras contienen ADN rico en bases A-T que replica tardíamente y son pobres en genes constitutivos y las bandas claras contienen ADN rico en G-C que replica tempranamente y tienen muchos genes constitutivos, Tabla 5.

Cuando un cromosoma está más enlongado puede mostrar un mayor número de bandas y esto se aprovecha para estudiarlo con mayores detalles. Esta metodología que permite buscar alteraciones estructurales mínimas se conoce como bandeo de alta resolución y se logra sincronizando el cultivo y con preparaciones hechas en profase o prometafase, es decir, antes que los cromosomas alcancen su compactación máxima. Los cromosomas en

la mitad de la metafase muestran un nivel de resolución de 400 bandas mientras que los de alta resolución alcanzan niveles de resolución de 550 y hasta de 850 bandas. (El estudio de los cromosomas humanos, 2012)

Tabla 5. Las técnicas de bandeo más usadas.

Bandeo G:	Tinción con Giemsa previo tratamiento controlado con tripsina que degrada las proteínas y produce bandas claras y oscuras. A las oscuras se llama G+.
Bandeo R:	Tinción con Giemsa previo tratamiento con calor. El bandeo R es el reverso del G.
Bandeo Q:	Tinción con mostaza de quinacrina o acridina. Se examina con microscopio de luz fluorescente intensidades. Las bandas más brillantes se corresponden con las G+.
Bandeo C:	Tinción con Giemsa o fluorocromos (actinomicina D o cromomicina) y tratamiento previo con calor o álcalis. Muestra las regiones cromosómicas que contienen heterocromatina que son las centroméricas de todos los cromosomas y las secciones en 1q, 9q, 16q y distal de Yq.

(Tamar C. et. al. 2008)

Pese a que el cariotipo es el estudio por excelencia para detectar anomalías cromosómicas la citometría de flujo parece tener ciertas ventajas sobre la citogenética a la hora de medir anomalías cromosómicas del tipo numérico. La citometría de flujo nos permite medir gran cantidad de células en comparación con el cariotipo lo cual lo vuelve más reproducible y más sensible por otra parte el tiempo de espera para un resultado es menor, (Tabla 6).

Tabla 6. Ventajas de la citometría de flujo frente a la citogenética para la medición del Índice de ADN

Citometría de flujo	Citogenética
<ul style="list-style-type: none"> • Índice de ADN • Se tiñen los núcleos con yoduro de propidio o naranja de acridina. • Analiza un gran número de células por lo cual es más sensible • Mas reproducible 	<ul style="list-style-type: none"> • Cariotipo • Bandeo G • Cromosomas en metafase • >20 metafases • Depende del analista • El bajo número de metafases lo hace un estudio insensible

1.6 Leucemias y poliploidía

1.6.1 ¿Por qué hay variación en la ploidía celular de las leucemias?

La ploidía se relaciona a la cantidad de ADN en la célula, es el número de juegos completos de cromosomas en una célula. De esta manera encontramos que el ADN puede ser (Ramos M. et. al. 2001):

- ADN Diploide: cantidad de ADN de una célula somática para una especie en particular ($2n$) en el caso del ser humano consta de 46 cromosomas.
- ADN aneuploide: cantidad anormal de ADN en la célula, el cual puede ser;
 1. ADN hiperdiploide; se llama así cuando la cantidad de cromosomas es mayor a 46 en el caso del ser humano, Mediante citometría de flujo este ADN corresponde a un ADN cuyo índice sea >1 , dividiéndose en dos grupos, hiperdiploide de índice bajo con un valor que oscila entre 1-1.16, e hiperdiploide de índice alto con valor > 1.16 .
 2. ADN Hipodiploide; se llama así cuando la cantidad de cromosomas es menor de 46 en el caso del ser humano. Mediante citometría de flujo este corresponde a un ADN cuyo índice sea <1 .
 3. ADN pseudodiploide; se denomina pseudodiploide cuando no existen alteraciones numéricas pero si estructurales como lo son las translocaciones. Mediante citometría de flujo este DNA tiene un índice con valor de 1.
 4. ADN aploide; este ADN corresponde a aquel que ha perdido la mitad del material genético mediante citometría de flujo este DNA tiene un índice <0.6 (Quijano S. et al. 2013)

El análisis citogenético de las células blásticas ha permitido el reconocimiento de alteraciones cromosómicas específicas de gran importancia pronóstica. La mayoría de los casos tienen cariotipos alterados, bien en el número de cromosomas (ploidía) o estructurales, translocaciones, deleciones o inversiones.

La existencia de los factores genéticos en el desarrollo de las leucemias es evidente debido a las diversas anomalías cromosómicas, en LAL la translocación más frecuentes son; $t(8;14)$, $t(9;22)$, $t(4;11)$, $t(1;9)$. Mientras que por el lado de las LMA las translocaciones más recurrentes son; $t(8;21)$, $t(1;22)$ y la $t(15;17)$.

La ploidía tiene especial importancia en la leucemia dado que se le ha concedido valor pronóstico, la hiperdiploidía con un número superior a 50 cromosomas tiene una excelente significancia pronóstica. En tanto los pacientes con pseudodiploidia presentan un peor pronóstico.

1.6.2 Hiperdiploidía y buena respuesta al tratamiento.

Varias teorías intentan explicar el buen resultado en este tipo de leucemias, entre ellas una de las más estudiadas es que estos blastos leucémicos tendrían grandes requerimientos de sobrevida, ya que presentarían marcada tendencia a sufrir apoptosis

(Chikako et al.)

Uno de los trabajos más interesantes fue desarrollado por Chikako y colaboradores. En él demuestra que existe marcada disminución de la sobrevida in vitro de las células con alta hiperdiploidía luego de ser cultivadas en medios enriquecidos, comparado con células de otros números cromosómicos. Las células hiperdiploides mueren rápidamente tanto en cultivos sin estroma como estromales, lo que puede observarse a través de microscopía con cambios morfológicos a las 48 y 72 horas, encogimiento celular y fragmentación nuclear.

Chikako et al también sugiere que el mecanismo de muerte celular de células hiperdiploides es similar a la apoptosis por drogas citotóxicas. Lo que se demuestra por citometría de flujo; con reducción en forward scatter (FSC), que indica reducción del tamaño celular, y aumento en side scatter (SSC) que indica aumento de la granularidad celular. Muestra ligamiento a Annexin V FITC, que es un indicador de apoptosis, y tinción con yoduro de propidio, que es signo de permeabilidad de membrana. Muestra el contenido de DNA, medido por tinción con yoduro de propidio después de permeabilización de la membrana celular y marcación con dUTP-BrdU, que es incorporado en las células con fragmentación del DNA.

1.6.3 LLA hiperdiploide y drogas

Dentro de las teorías que se manejan para la mejor respuesta a los tratamientos habituales de las leucemias linfoblásticas agudas, la más importante de ellas es la respuesta de estos blastos a las drogas quimioterápicas, lo que lleva ya algunos años en estudio.

El metotrexato es una de las drogas más ampliamente usadas para el tratamiento de los niños con diagnóstico de LLA. Diferencias entre individuos en la acumulación en linfoblastos de metotrexato y su metabolito activo, el metotrexato poliglutamato, puede contribuir a los diferentes efectos del tratamiento entre los diferentes subtipos de LLA.

Panetta y colaboradores demostraron mediante un modelo matemático, en blastos de 20 leucemias recién diagnosticadas tratadas con infusiones de metotrexato de 24 horas, que los blastos hiperdiploides acumulan significativamente más metotrexato que sus contrapartes no hiperdiploides y de células T.

Ahora, en la búsqueda de cómo estos blastos hiperdiploides acumulan más metotrexato, Belkov y colaboradores midieron, mediante reacción de polimerasa en cadena reversa, la expresión del carrier reductor de folatos. Los blastos hiperdiploides tenían significativamente expresión más alta de este carrier que los no hiperdiploides, explicando que este mecanismo daría cuenta de la mayor acumulación de antimetabolitos. (Belkov VM, et al 1999)

En relación a hiperdiploidía y presencia de trisomías en clínica, se demuestra también que aquellos blastos con alta hiperdiploidía y trisomías 4 y 10 alcanzan niveles de metotrexato aún mayores, lo que explicaría su comportamiento clínico (Whitehead VM. Et al 1998)

A pesar de que el metotrexato es la droga más asociada a alta hiperdiploidía, Kaspers y colaboradores relacionaron estos blastos con sensibilidad a antimetabolitos y otras drogas. Encuentran una marcada mayor sensibilidad a mercaptopurina, tioguanina, citarabina y asparraginasas que las células no hiperdiploides. No hubo diferencia en cuanto a: prednisolona, dexametasona, vincristina, vindesina, daunorrubicina, mitoxantrona y tenipósido.

1.7 CARACTERÍSTICAS DEL KIT (BD CYCLETEST PLUS DNA REAGENT KIT)

Este proporciona un conjunto de reactivos para el aislamiento y la tinción de núcleos de células de muestras de tejidos frescos o congelados, sólidos o células en suspensión, para el análisis por citometría de flujo diferenciando células normales de células tumorales, se utiliza para la identificación de anomalías numéricas en el ADN de líneas troncales y para estimar el índice de ADN y la distribución de las fases del ciclo celular de estas líneas troncales.

Control de calidad para la determinación de la ploidía y estudio del ciclo celular.

El análisis de citometría de flujo del contenido de ADN ha llegado a ser una importante herramienta para medir e identificar las poblaciones celulares anormales. El estudio del contenido de ADN celular puede proveer la información para el análisis del ciclo celular así como establecer el índice ya sea diploide o aneuploide para células cancerosas. Para el análisis de estas muestras biológicas es necesario un ajuste y control de calidad adecuados para el citómetro de flujo que será usado para el análisis de ADN.

Los reactivos que constituyen el control de calidad están compuestos de núcleos de eritrocitos de pollo (CEN, estos tienen la propiedad de adherirse entre sí, de esta manera el citómetro puede diferenciar la cantidad de ADN de un núcleo en singulete de la de un doblete), los cuales se utilizan para el ajuste del instrumento (voltaje y ganancia), linealidad y la resolución. Y por núcleos de timo de carnero (CTN, estos contienen núcleos en fase G₀/G₁, S y G₂/M) que permiten distinguir los singuletes de dobletes y tripletes y las fases del ciclo.

El control de calidad para determinar el índice de ADN mediante citometría de flujo consta de:

- Optimización
- Resolución
- Linealidad
- Discriminación de dobletes

1.7.1 Resolución

- Se mide por el coeficiente de variación, es la desviación estándar/ media
- Es afectada por la alineación del instrumento, preparación de la muestra, velocidad de flujo
- Permite diferenciar dos picos con una mínima diferencia en la cantidad de ADN

1.7.2 Linealidad

La linealidad refleja la precisión de la correlación entre la intensidad de fluorescencia de la población en estudio y su contenido de DNA. Los factores que afectan la linealidad son el tamaño del láser, forma del haz de láser, modo de análisis del pulso, Figura 22.

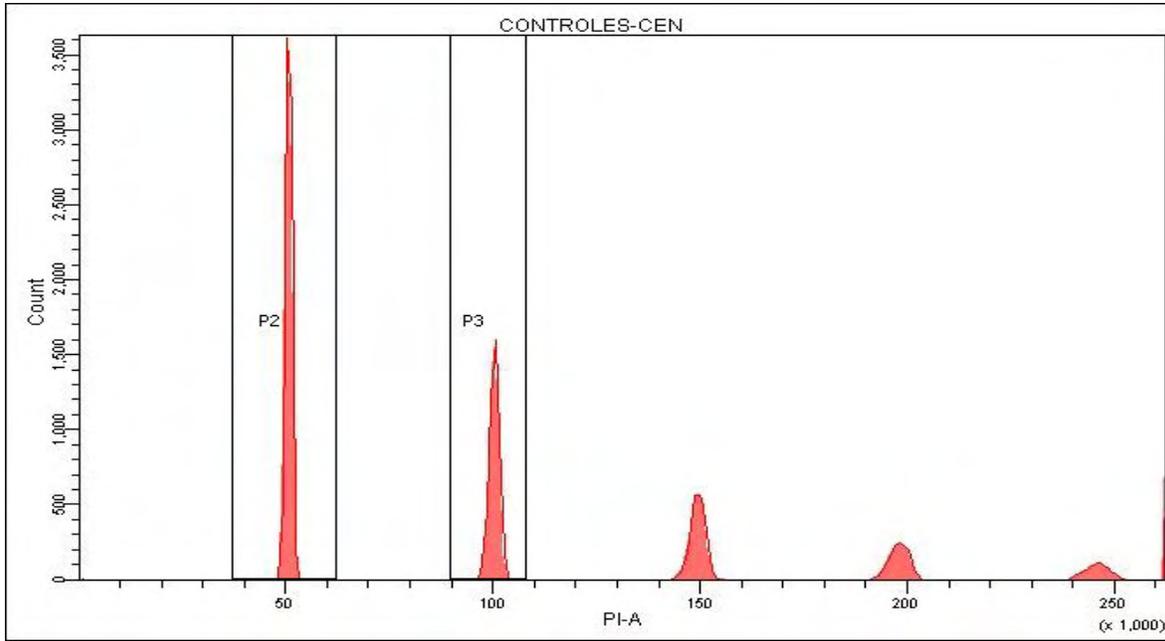


Figura 22. Se muestra un ejemplo de un instrumento con buena linealidad para el caso de índice de ADN ya que nos muestra las células con ADN $2n$ a un voltaje de 50 mientras que las células con doble cantidad de ADN $4n$ exactamente al doble en este caso 100.

1.7.3 Medición del pulso

El citómetro mide la cantidad de tiempo que tarda en pasar un núcleo a través del láser y lo asocia a un voltaje, de tal manera que nos proporciona un ancho de curva, una altura (máximo valor medio) y un área (suma de todas las alturas) (Fig. 23 y 24).

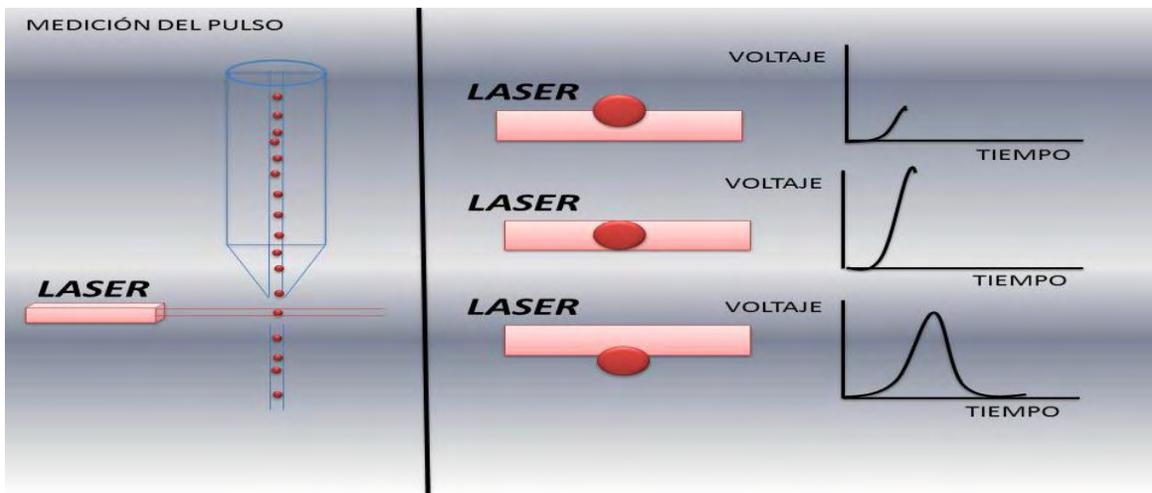


Figura 23. Esquema donde se muestra la forma en que el citómetro analiza las células.

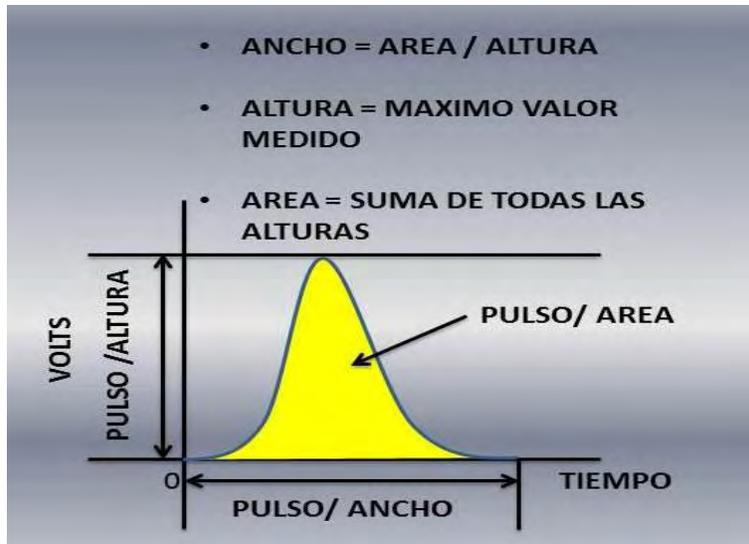


Figura 24. Se muestran los parámetros que arroja la medición de los pulsos cuando un núcleo atraviesa el haz de luz.

1.7.4 Discriminación de dobletes

Los dobletes de G0/G1 tienen el mismo contenido de ADN que las células en G2/M, por lo cual es de vital importancia discriminar los dobletes de los singuletes ya que si no se pueden distinguir los dobletes de las células aisladas, se producirá un falso aumento en los porcentajes de células G2/M (Figura 25).

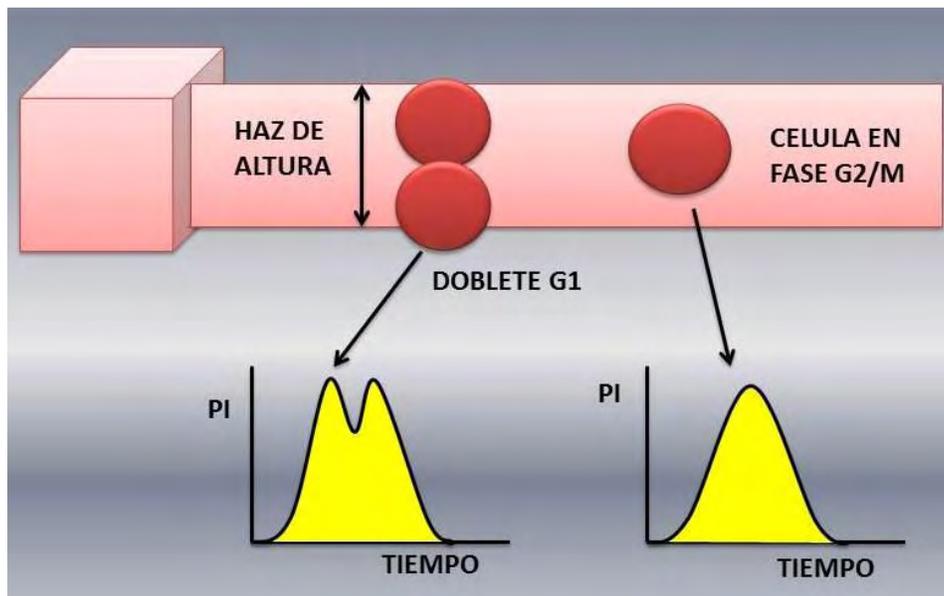


Figura 25. Se muestra la manera de analizar y discriminar los singuletes de los dobletes, ya que un doblete (núcleo adherido a otro núcleo) tiene la misma cantidad de ADN que una célula en fase G2/M, por lo cual el análisis de pulsos tiempo vs voltaje ayuda al equipo a discriminar entre estas dos situaciones.

1.7.5 Determinación de la linealidad y la resolución [tubo CEN (núcleos de eritrocitos de pollo)].

Esta preparación contiene singuletes, dobletes, tripletes y demás agregados, por lo que nos monitorea la linealidad y la resolución de la prueba.

Se instala el tubo CEN y adquieren 10,000 eventos, se mueve el voltaje de FSC y el SSC, hasta ver los núcleos CEN y que estén englobados en la región de P1 (Figura 26).

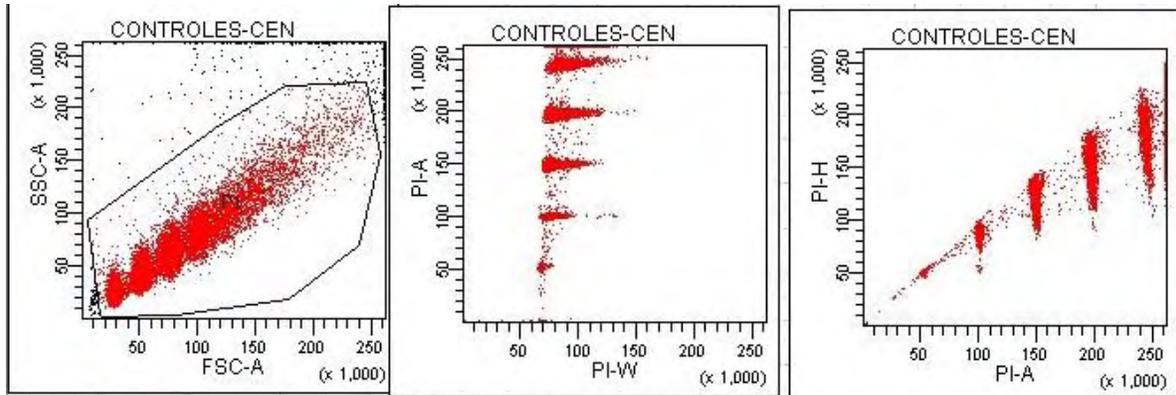


Figura 26. Se observa la correcta discriminación de los singuletes, dobletes, tripletes y demás agregados en los histogramas.

Se mueve el voltaje de PI hasta que los singuletes primer pico llegue a valor de 50,000 de la escala lineal del histograma de PI-A para determinar la linealidad y que se observe en los gráficos de PI-H vs PI-A vs PI-W claramente los singuletes dobletes y demás agregados como se muestra en los histogramas de anteriores, (Figura 27).

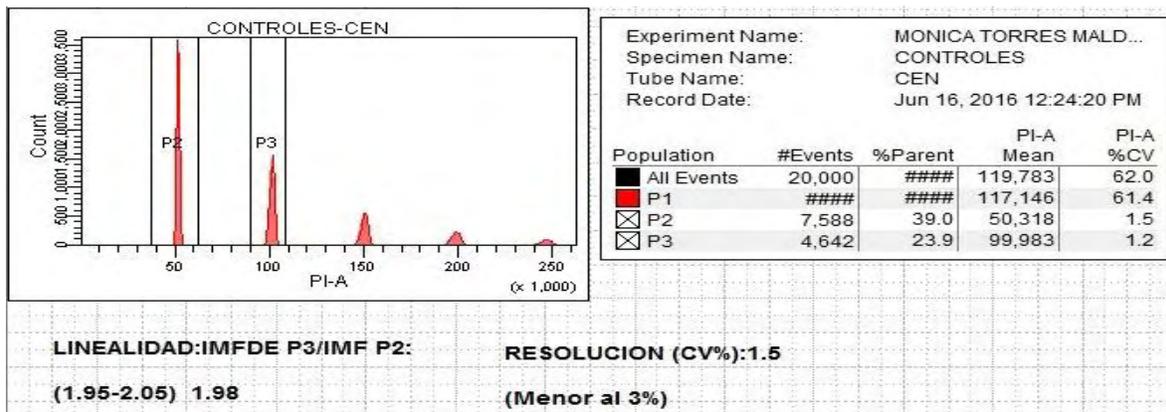


Figura 27. Se muestra en el histograma el pico del singulete (P2) deben caer en 50,000 y 100,000 el de los dobletes (P3) y demás agregados como se aprecia en el histograma. La resolución y linealidad del equipo deben estar dentro de los valores indicados.

Se corrobora que la linealidad este entre el intervalo de 1.95-2.05 al dividir la intensidad media de fluorescencia de PI-A (PI-A Mean) de P3 entre el valor de PI-A Mean de P2 y el PI-A %CV < 3% (Por ejemplo ver el cuadro de estadística de P3=101,004 y de P2= 50,705, la linealidad=1.99 y la resolución del pico de P2 en PIA %CV=2.9).

1.7.6 Determinación de la proporción de las fases del ciclo celular y la discriminación de singuletes de dobletes [tubo CTN (núcleos de timo de carnero)].

Con este tubo CTN se provee de una fuente estable de núcleos que contienen todas las fases del ciclo celular, la mayoría de los núcleos están en la fase G0/G1 (2n DNA) y una pequeña proporción están en la fase S y G2+M (4n DNA) de núcleos en singulete. Los núcleos en doblete de la fase G0/G1 (4n DNA) también están presentes y pueden ser discriminados de las fases G2+M de singuletes (4n DNA), al usar estos núcleos y mediante un procesador de pulsos de dobletes (DDM), lo que permite estimar los porcentajes de células que se encuentran en cada una de las fases que es lo que se requiere determinar (Figura 28).

Se instala el tubo CTN y adquiere, se mueve el voltaje de FSC y el SSC, hasta ver los núcleos CEN y que estén englobados en la región de P1.

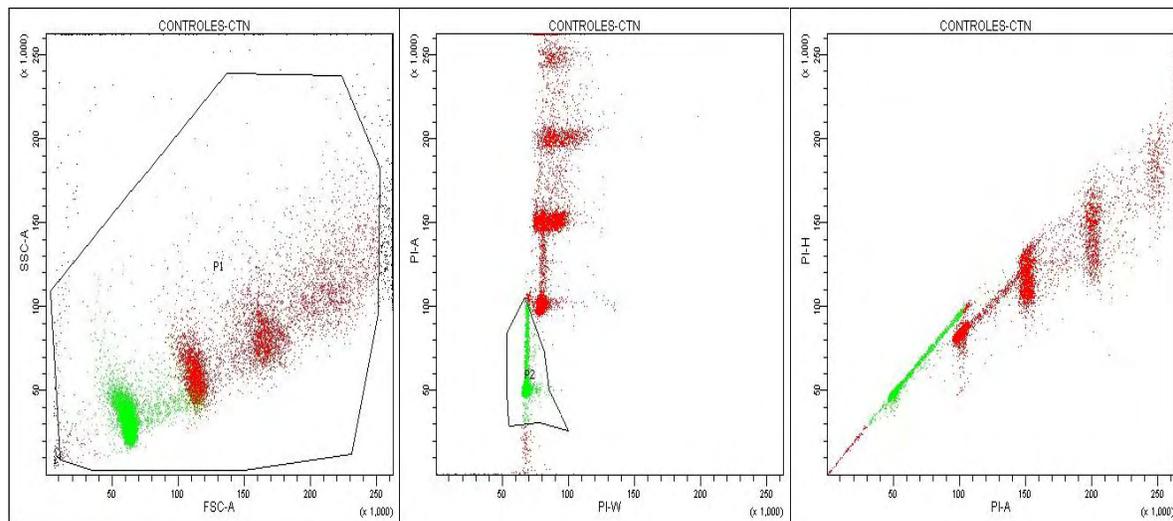


Figura 28. Se muestra que los núcleos del control estén englobados en la región P1, y se muestra marcado en color verde la fracción de las células que corresponde a los singuletes en la región P2 se encuentran las fases G0/G1, S y G2/M. (Tomado del inserto del kit)

Mover el voltaje de PI hasta que la fase de G0/G1 de los singuletes (primer pico en verde) llegue al valor de 50,000 de la escala lineal del histograma de PI-A para determinar las fases del ciclo y sus proporciones y que observe en los gráficos de PI-A vs PI-W la región de P2 debe englobar las fases G0/G1, S y G2+M de los singuletes (región en verde, en forma de L) y en el de PI-H vs PI-A (Figura 29).

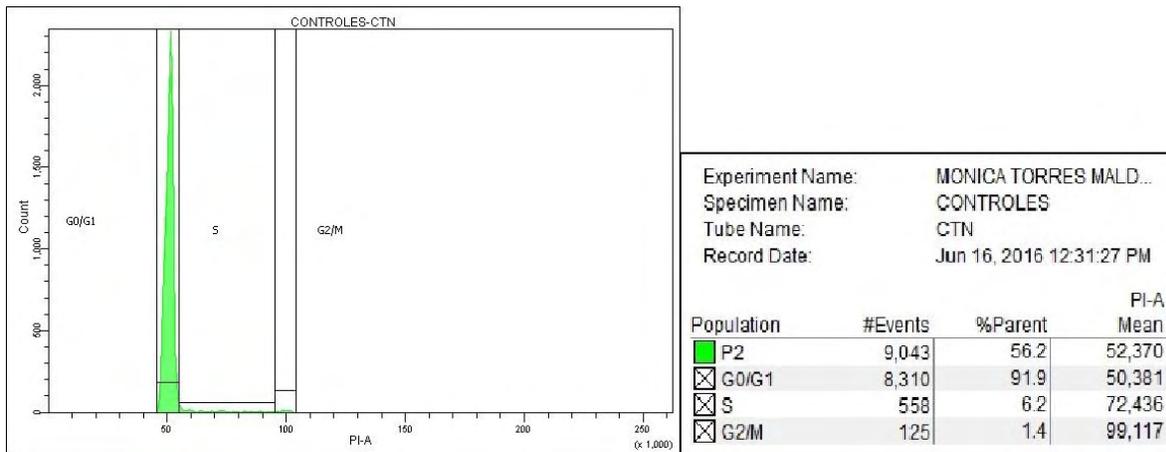


Figura 29. Aquí se muestra como la fase G0/G1 de los singuletes (pico verde) este exactamente en 50,000.

2 JUSTIFICACION

El contenido de ADN ha sido intensamente correlacionado en conjunto con otros parámetros como factor pronóstico de la respuesta al tratamiento en pacientes con leucemia. Se ha descrito que pacientes con ADN hipodiploide tienen un peor pronóstico que los pacientes con ADN hiperdiploide. Debido a que en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, no se lleva a cabo este estudio se espera que una vez implementada la prueba esta se emplee de manera rutinaria, ya que ofrece la ventaja de tener un resultado en un tiempo menor y a menor costo comparado con los métodos actualmente utilizados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar el índice de ADN mediante citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda del Hospital Infantil de México Federico Gómez para determinar la frecuencia de las anomalías clónales de ADN (aneuploidias de ADN) en pacientes con leucemia aguda

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la utilidad del índice de ADN como uno de los factores pronóstico para la leucemia aguda
- Implementar el índice de ADN como un estudio de rutina en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Muestras

- a. Sangre periférica anticoagulada con EDTA, obtenida de personas clínicamente sanas
- b. Médula ósea anticoagulada con EDTA, obtenida de pacientes con leucemia aguda, que no han recibido tratamiento.

4.2 Reactivos

Solución de tripsina en regulador de espermina y un detergente no iónico, disgrega los lípidos de la membrana y del citoesqueleto, RNasa A para digerir el RNA.

Solución inhibidora de la Tripsina y RNasa A en regulador de citratos estabilizado con espermina.

Yoduro de propidio (PI) y espermina en regulador de citratos. El PI se une al DNA en forma equivalente en una concentración de 125 µg/mL.

Regulador de citratos-sacarosa-DMSO, para lavar y colectar tejidos, para congelar o descongelar.

4.3 Controles

Suspensión de CEN (Núcleos de eritrocitos de pollo) en un regulador y etanol

Suspensión de CTN (Núcleos de timo de carnero) en un regulador con formaldehído y 0.01% de timerosal

Solución de 50-µg/mL de PI en regulador

EL presente estudio se realizará mediante citometría de flujo utilizando el equipo FACSCANTO II de BD. (En los anexos 2, 3, 4, 5, 6, 7, se muestra la secuencia completa de análisis realizados)

4.4 Criterios de inclusión

- Solo se ocuparán médulas óseas de pacientes recién diagnosticados con leucemia mediante inmunofenotipo y que no hayan recibido tratamiento hasta la extracción de la muestra.

4.5 Criterios de exclusión

- Muestras que no sean médula ósea
- Muestras provenientes de pacientes con tratamiento
- Muestras de pacientes en recaída

4.6 Fundamento de la determinación del Índice de ADN

Este método involucra disolver la membrana de los lípidos con un detergente no iónico, eliminar el citoesqueleto de las células y las proteínas nucleares con tripsina, digerir el RNA con RNasa A y estabilizar el cromosoma con espermidina. El yoduro de propidio (PI) se une estequiométricamente al DNA aislado de los núcleos para que por citometría de flujo se detecte el pico de máxima emisión de esta molécula (580nm).

4.7 Procedimiento del estudio

1. Etiquetar dos tubos Falcon™ de 12x75mm, uno como sangre periférica y otro como leucemia.
2. Agregar 300µL de sangre periférica a un tubo y 300µL medula ósea al otro tubo respectivamente
4. Centrifugar ambos tubos a 460 G por 5 min (1500 rpm).
5. Decantar el sobrenadante cuidadosamente evitando que el paquete celular se pierda durante este paso.
6. Realizar 2 lavados de las células con 2 mL SSF centrifugando a 460 G por 5 min, resuspendiendo de forma cuidadosa en 2 mL de dimetil sulfoxido.
7. Centrifugar ambos tubos a 460 G por 5 min (1500 rpm).
8. Decantar el sobrenadante cuidadosamente y resuspender las células de ambos tubos en 1mL del regulador de citratos.
9. Contar las células en contador hematológico (coulter)

10. Con el valor obtenido realizar los cálculos para agregar en otros tubos (etiquetados como SP al primero, MO al segundo y Mx MO/SP al tercero) 500mil células de SP, 500mil células de MO y una mezcla de 350mil células de MO más 150mil células de SP.

10. Adicionar a los 3 tubos 250µL de solución de tripsina en regulador de espermina y un detergente no iónico. Incubar a TA por 10 min.

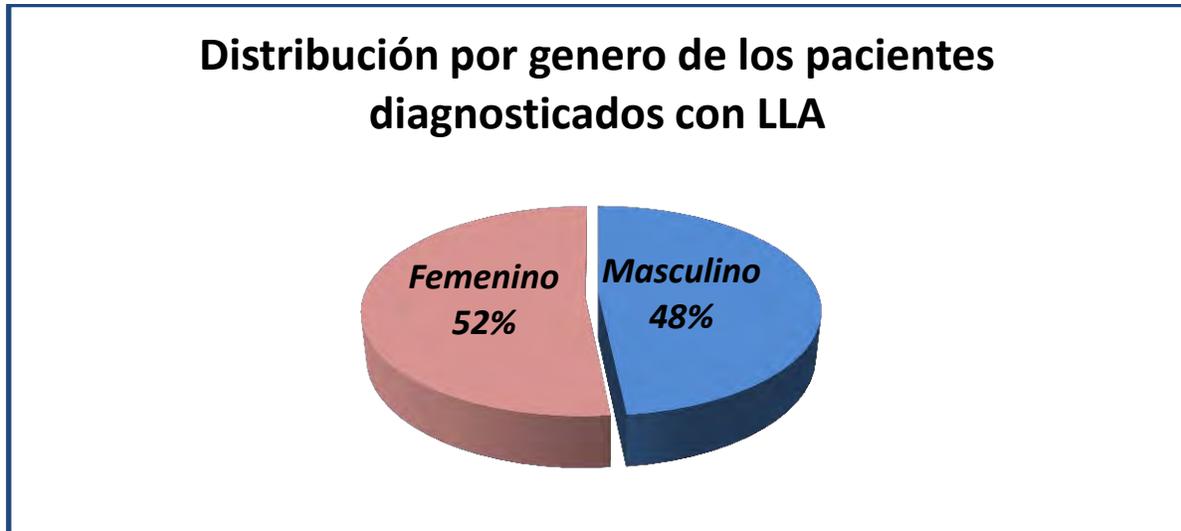
13. Adicionar a los 3 tubos 200µL de Inhibidor de la Tripsina y RNasa A en regulador de citratos. Incubar a TA por 10 min.

14. Adicionar a los 3 tubos 200µL de solución yoduro de propidio y mezclar suavemente en vortex a baja velocidad. Incubar 10 min. Leer en el citómetro posteriormente.

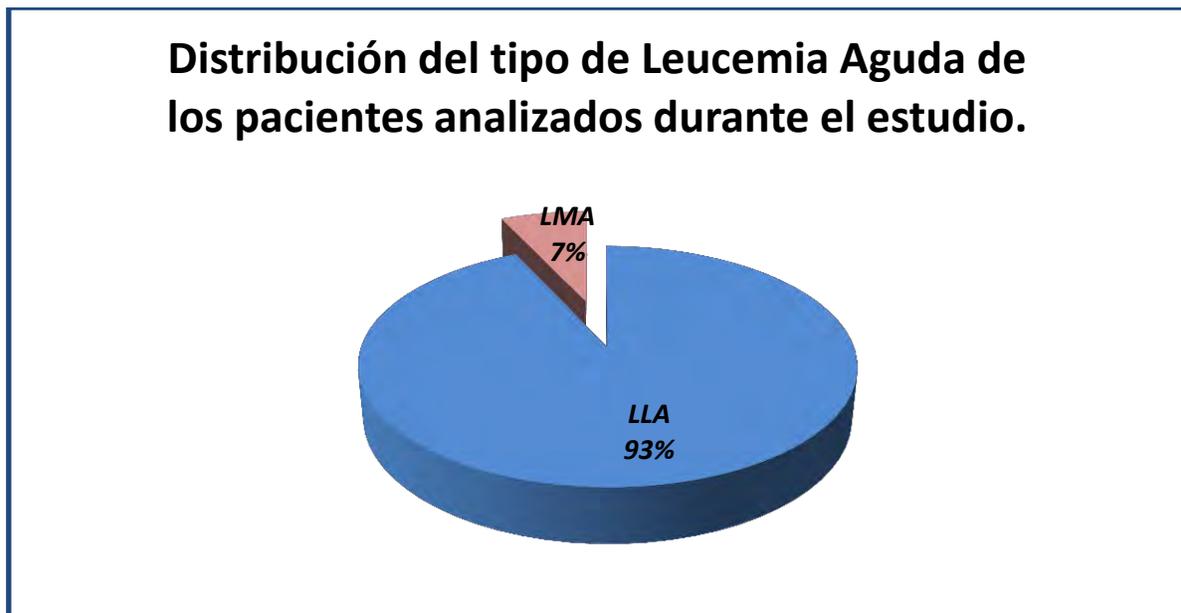
15. A la par del paso 14 se preparan los controles, se marcan 2 tubos Falcon como CEN Y CTN, se les agrega 40µL de suspensión de CEN (núcleos de eritrocitos de pollo) Y CTN (núcleos de timo de carnero) respectivamente y se les agrega 1mL de yoduro de propidio, incubando en oscuridad por 10 minutos.

5 RESULTADOS

Se trabajaron 29 muestras de medula ósea provenientes de pacientes recién diagnosticados con leucemia aguda (15 niñas y 14 niños), de las cuales 27 (93%) corresponden a leucemia linfoblástica de tipo B, y 2 (7%) a leucemia mieloide (M3 y M4) (Gráfica 1 y 2).

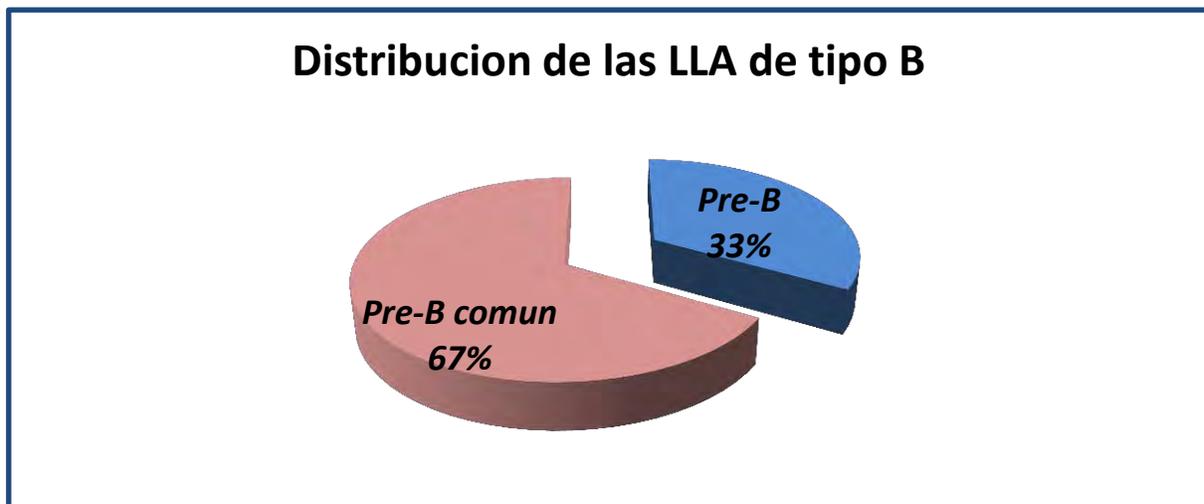


Gráfica 1. Se muestra la distribución del género dentro de los pacientes analizados.



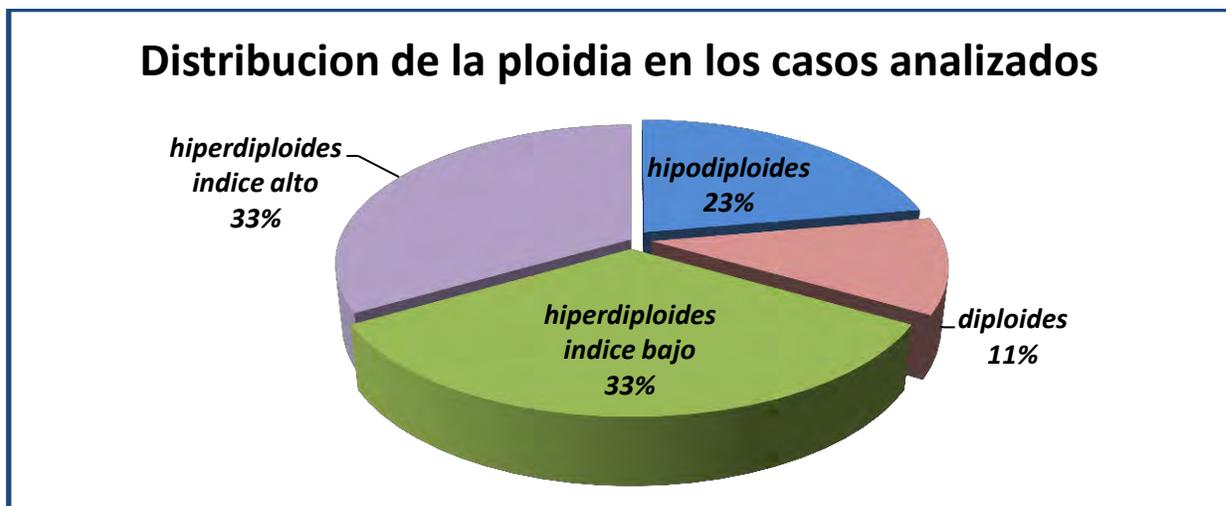
Gráfica 2. Distribución del tipo de leucemia aguda analizada expresada en porcentaje.

De las 27 muestras analizadas de leucemia linfoblástica de tipo B, 9 corresponden a leucemia Pre-B que representa el 33% de los casos, los 18 casos restantes corresponden a leucemia Pre-B común 67% de los casos (Gráfica 3).



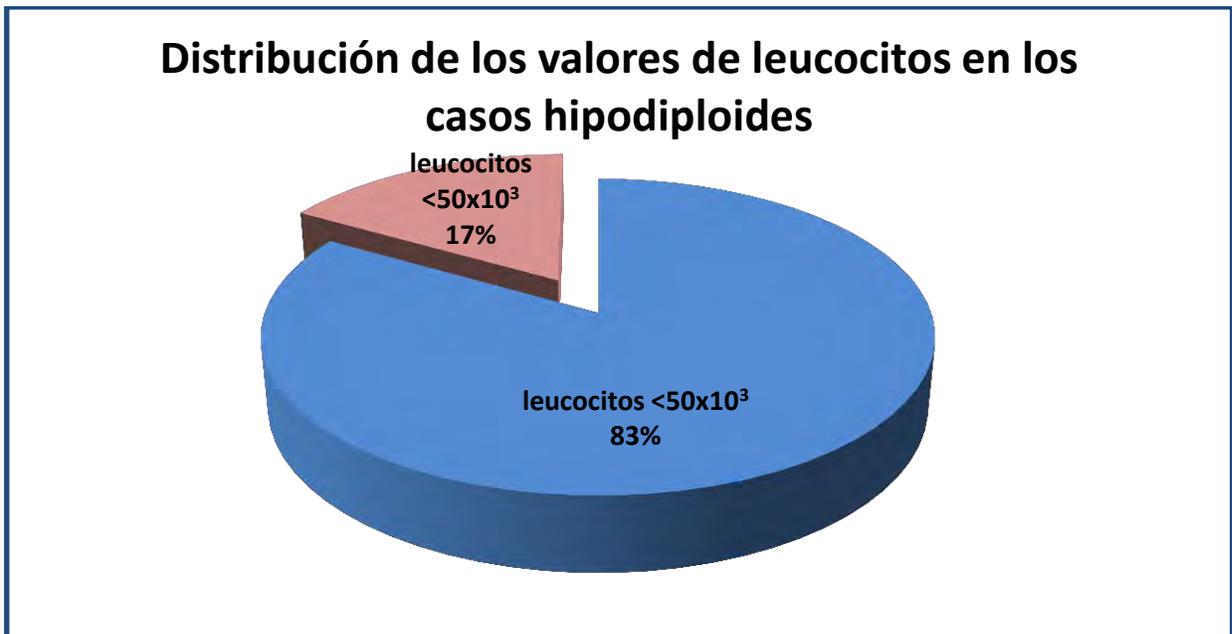
Gráfica 3. Distribución de los tipos de LLA-B en los pacientes analizados

La cuantificación del ADN mostró que 6 (23%) de los casos analizados son hipodiploides (índice de ADN entre 0.66 y 0.99), 3 (11%) corresponden a diploides (índice de ADN igual a 1), 9 (33%) a hiperdiploides de índice bajo (índice de ADN $>1 < 1.16$) y 9 (33%) restante a hiperdiploides de índice alto (índice de ADN > 1.16) (Gráfica 4).



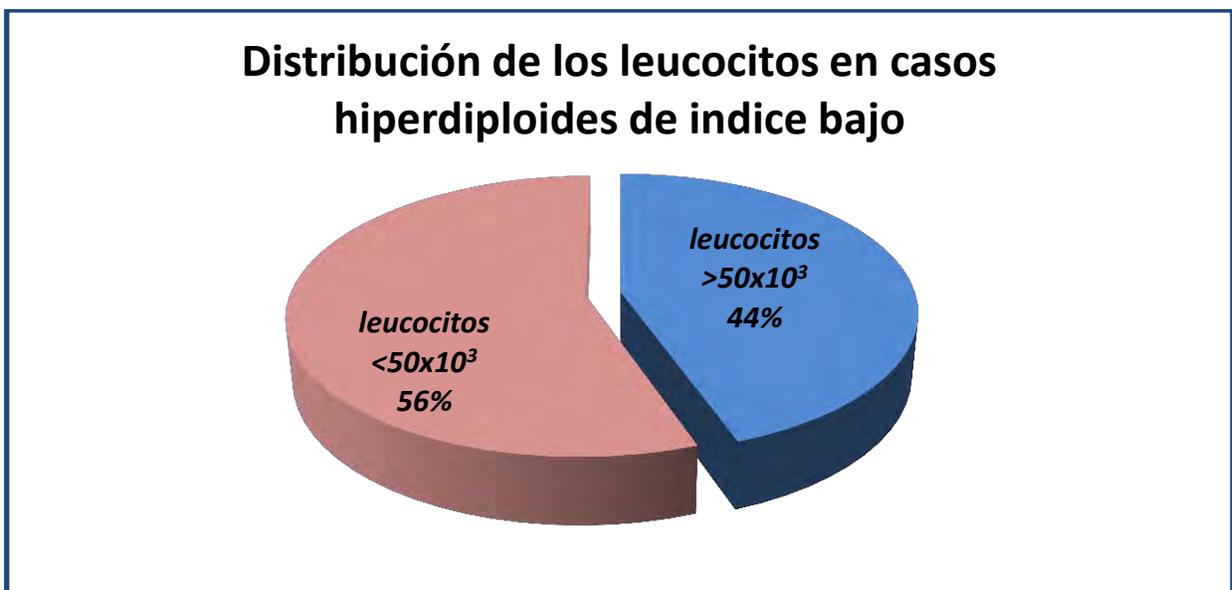
Gráfica 4. . Se muestra la distribución de la ploidía en los 27 pacientes con LLA-B analizados.

De los casos con hipodiploidía se encontró que la gran mayoría 5/6 (83%) correspondían a pacientes con leucocitos por encima de los $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Gráfica 5).



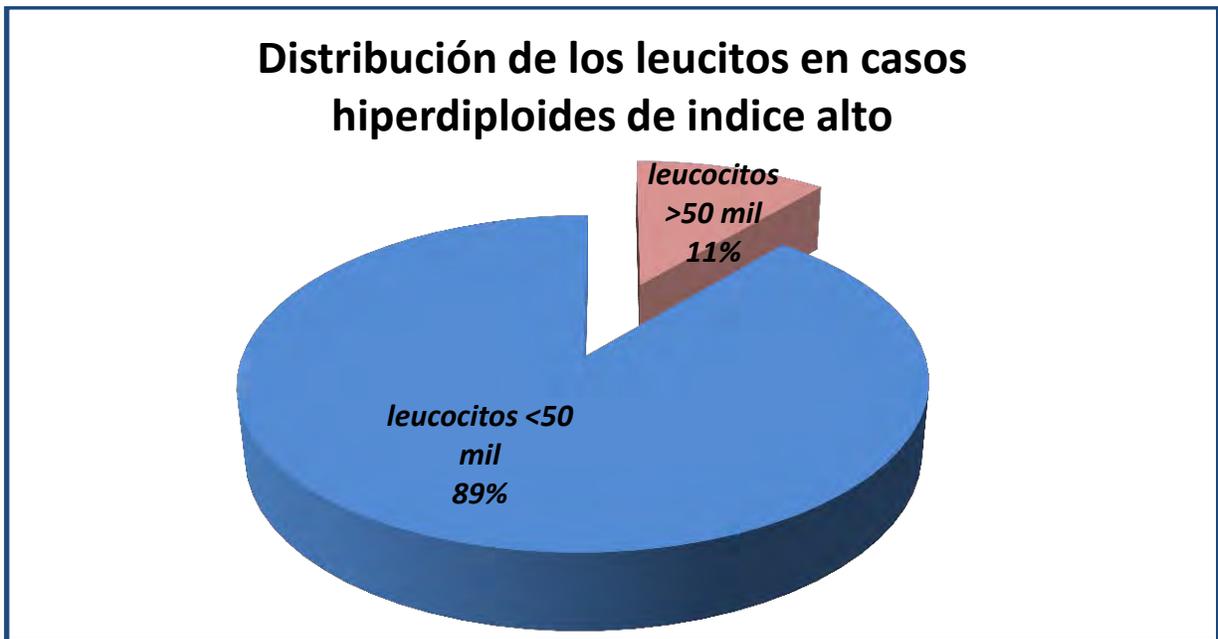
Gráfica 5. Aquí podemos observar que en los casos hipodiploides hay una cantidad mayor de casos con leucocitos con valores mayores a $50 \times 10^3/\mu\text{L}$

De los casos con hiperdiploidía baja se encontró que los leucocitos se comportaban de la manera siguiente (Gráfica 6).



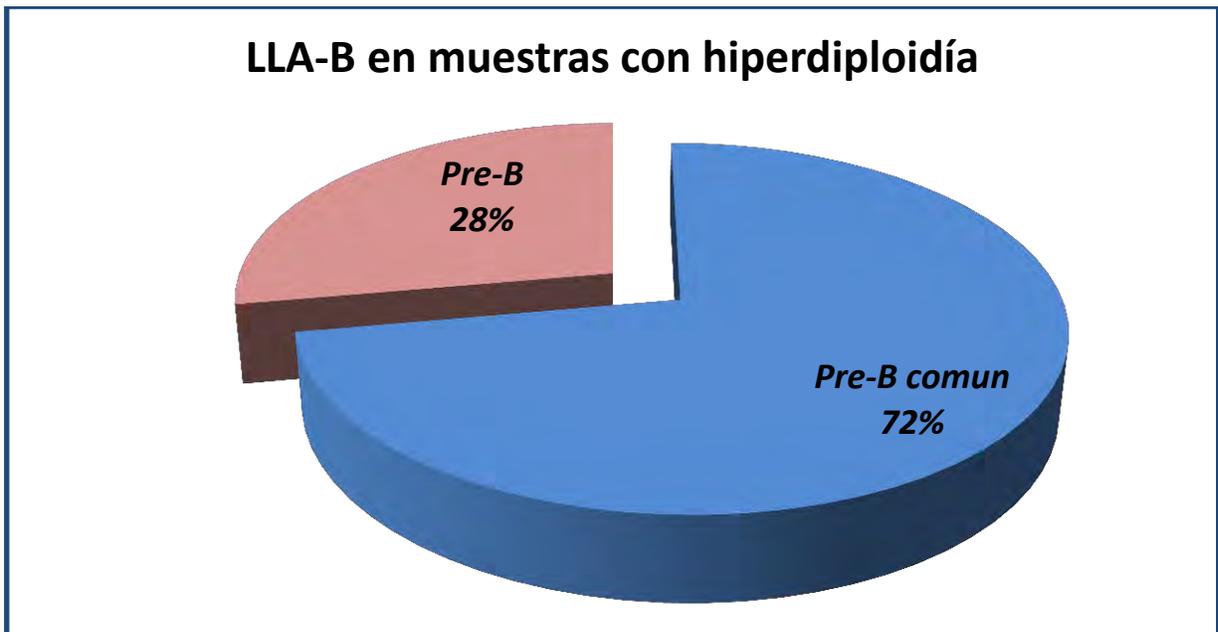
Gráfica 6. Se observa que de los 9 casos aproximadamente la mitad están por encima de 50×10^3 mientras que la otra mitad están por debajo de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$.

En los casos con hiperdiploidía alta se encontró que la gran mayoría tenían cuentas de leucocitos por debajo de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Gráfica 7).



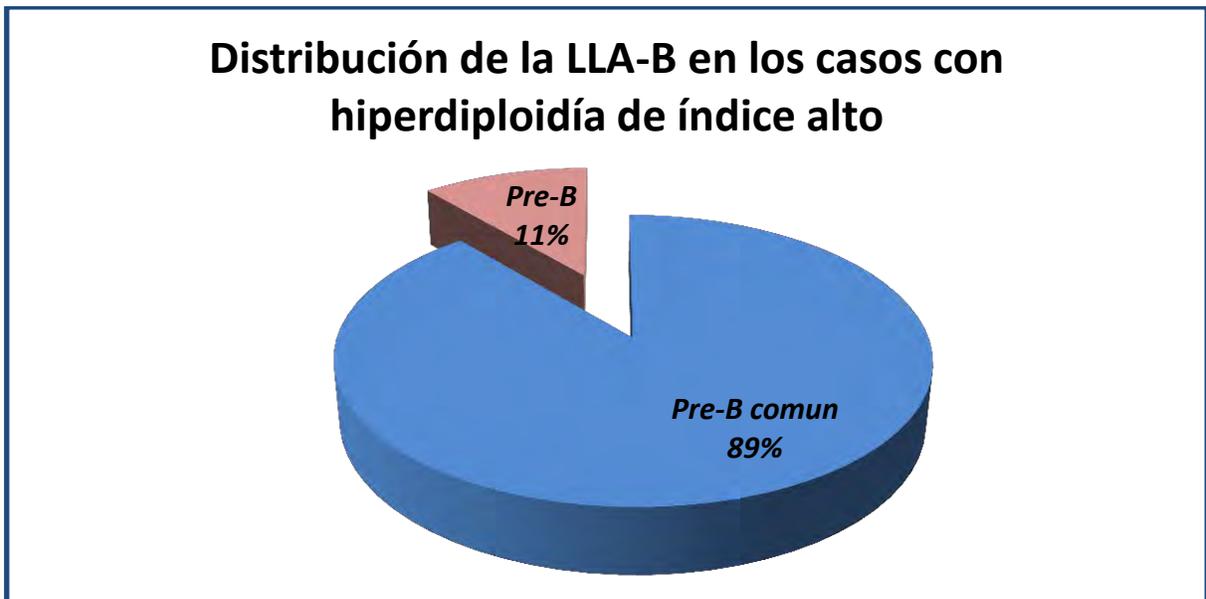
Gráfica 7. Aquí se muestra que hay mayor cantidad de casos con leucocitos $< 50 \times 10^3/\mu\text{L}$

Dentro de los casos con hiperdiploidía la distribución de la LLA-B se comportó de la siguiente manera (Gráfica 8).



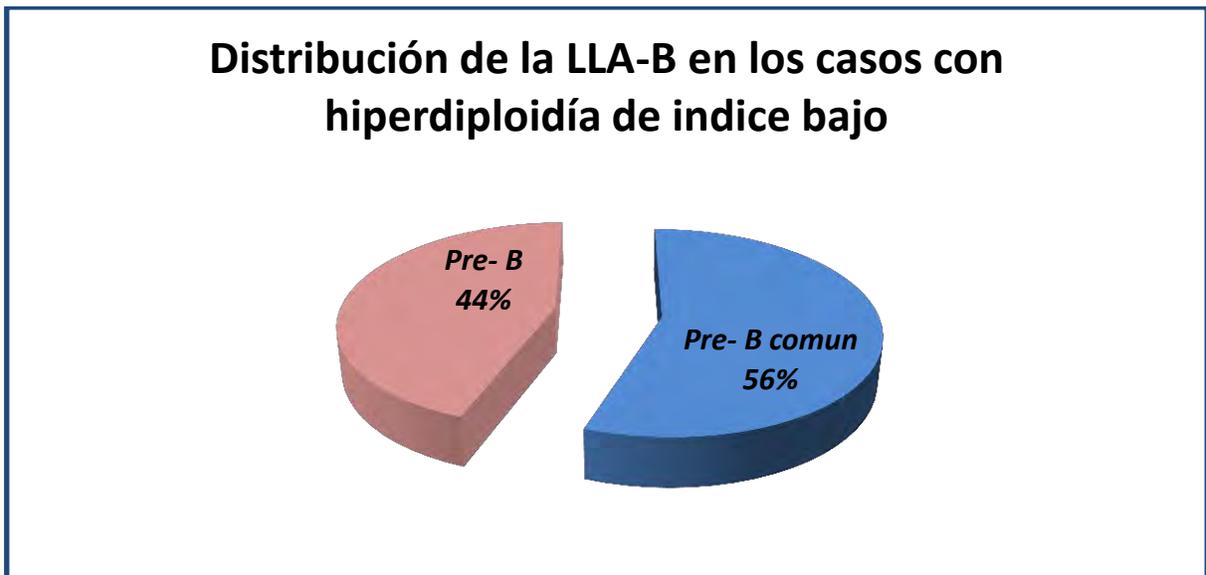
Gráfica 8. EL 28% de las leucemias con hiperdiploidía eran de tipo Pre-B y el 72% restante corresponde a Pre-B común.

La leucemia linfocítica Pre-B común es la que predominó en los casos con hiperdiploidía de índice alto (Gráfica 9).



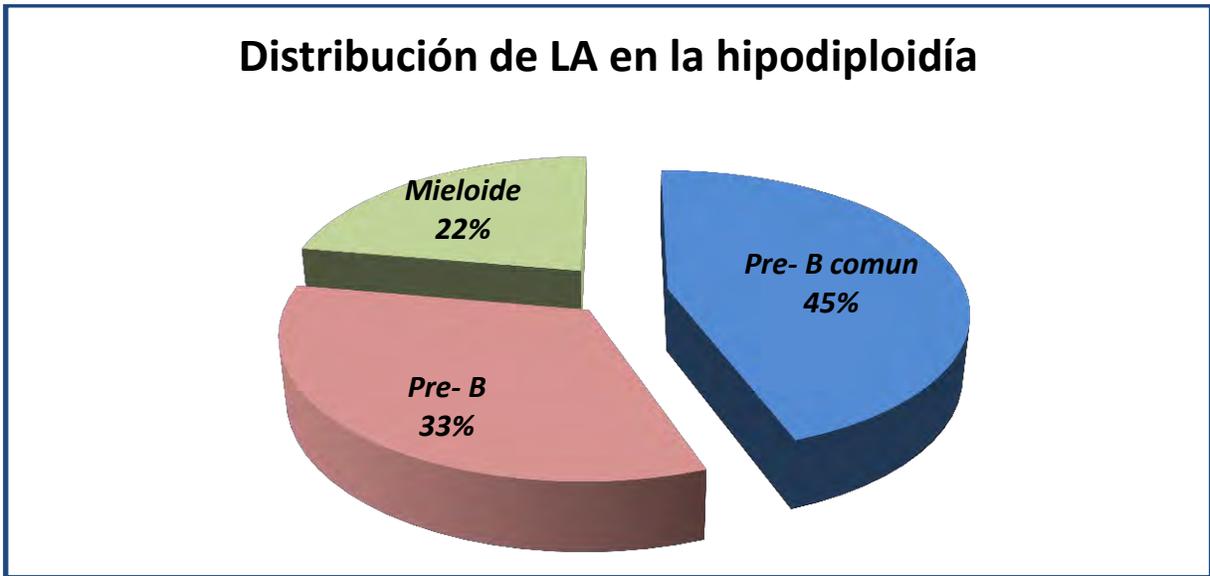
Gráfica 9. EL 89% los casos con hiperdiploidía de índice alto corresponde a LLA-B Pre-B común mientras que el 11% restante corresponden a LLA-B Pre-B.

En los casos con hiperdiploidía de índice bajo se encontraron 5 casos con LLA-B Pre-B común y los 4 casos restantes corresponden a LLA-B Pre-B (Gráfica 10).



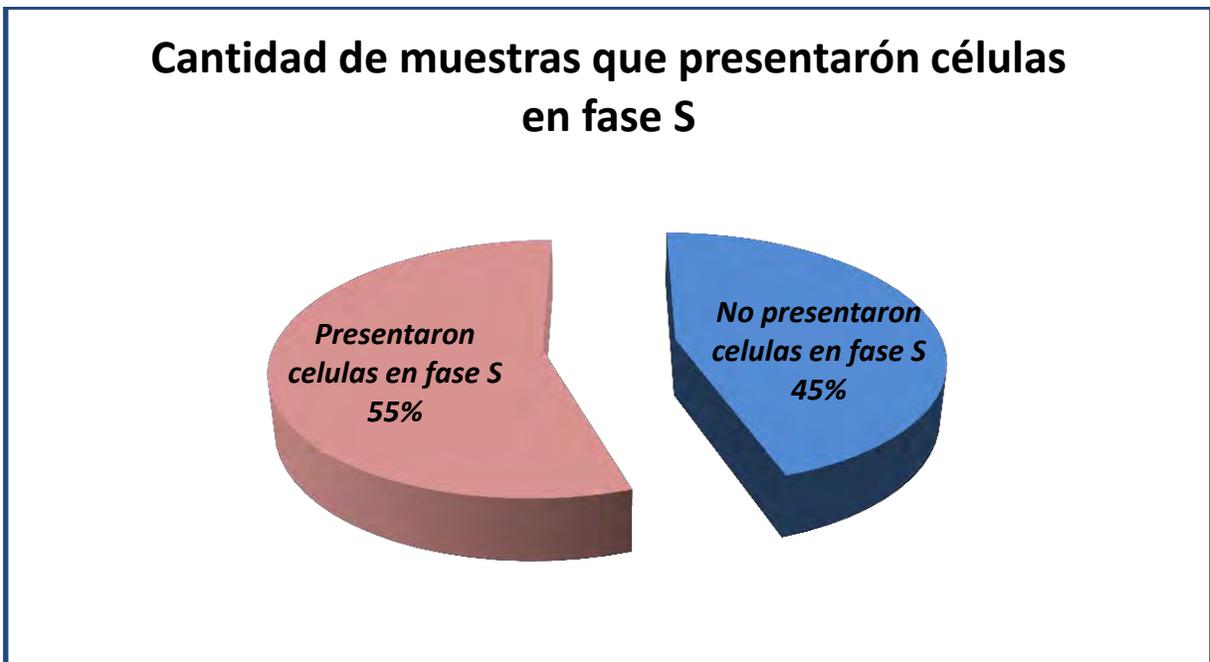
Gráfica 10. Apreciamos que el 44% de los casos con hiperdiploidía de índice bajo corresponden a una leucemia de tipo Pre-B y el 56% corresponde a Pre-B común.

La leucemia dentro de los casos con hipodiploidía se distribuye de la manera siguiente (Gráfica 11).



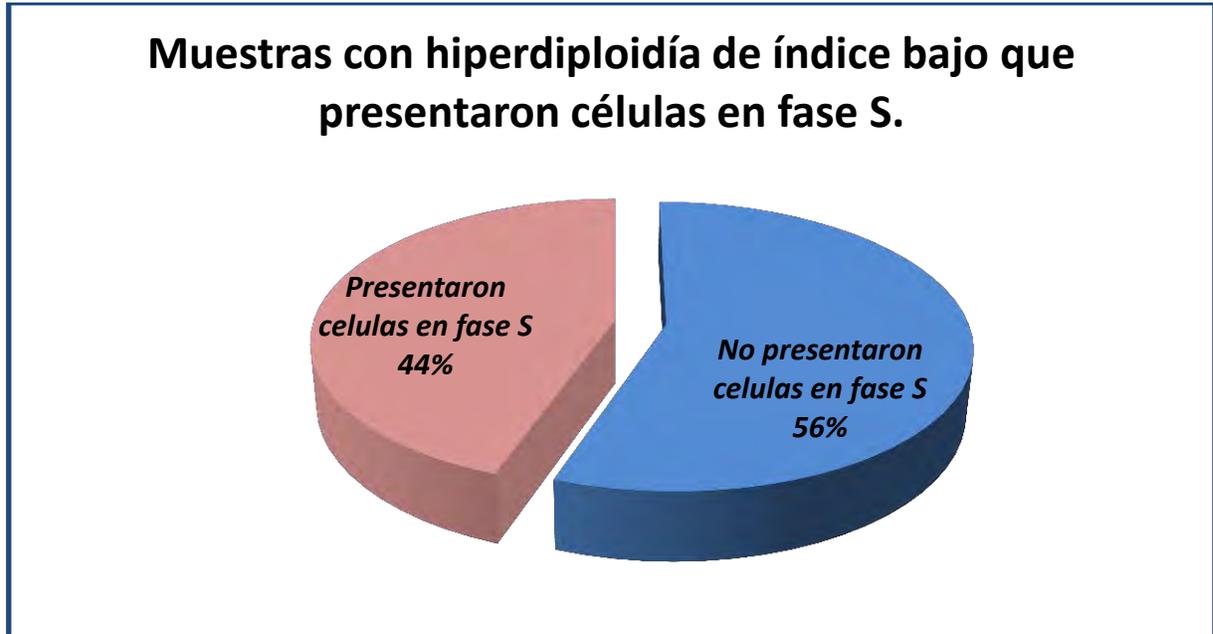
Gráfica 11. El 22% corresponde a los 2 casos de LMA, el 33% es de Pre-B y el 45% es de Pre-B común.

Expresión de la fase S del ciclo celular en las muestras analizadas (Gráfica 12).



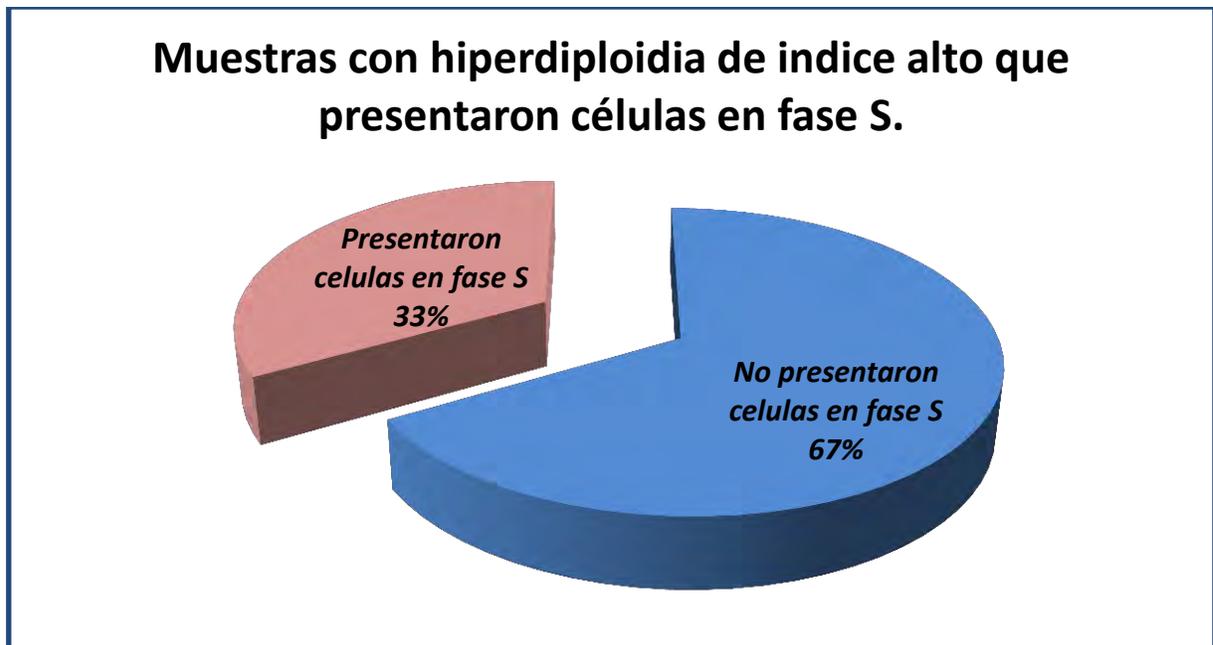
Gráfica 12. Del total de las 29 muestras analizadas el 55% tienen células en fase S.

Fase S en las muestras con hiperdiploidía de índice bajo (Grafica 13).



Grafica 13. De las 9 muestras 44% presentaron células en fase S.

Fase S en las muestras con hiperdiploidía de índice alto (Gráfica 14).



Grafica 14. El 67% de las muestras con hiperdiploidía de índice alto no presentaron células en fase S.

Tabla 7. Cambio en el estado de estratificación cuando solo se toma en cuenta Edad, número de leucocitos por microlitro, inmunofenotipo y translocación, y como puede variar cuando se agrega el parámetro de IADN diploide e hiperdiploide de índice bajo a la estratificación de riesgo.

Genero	Edad	LEUCOCITOS S X 10 ³ Cel/ μ L	IMF	Translocación	FR-C	IDNA	FR-IDNA
Masculino	16 años	42.7	PB	Negativo	AR	1.02	AR
Femenino	3 años	44.7	PB	T (12:21)	RH	1.07	RH
Masculino	5 años	51.1	PB	Negativo	AR	1.14	AR
Femenino	8 años	118.1	PB	Negativo	AR	1.01	AR
Femenino	12 años	59.9	PBC	Negativo	AR	1.03	AR
Femenino	3 años	72.2	PBC	Negativo	AR	1.13	AR
Femenino	5 meses	23.3	PBC	T (9:11)	AR	1.1	AR
Masculino	8 años	214	PB	Negativo	AR	1.03	AR
Masculino	14 años	70.9	PBC	Negativo	AR	1.01	AR
Femenino	2 años	398.9	LLA-T	Negativo	AR	1.03	AR
Masculino	4 años	29	PBC	Negativo	AR	1.06	AR
Femenino	14 años	415.9	PB	Negativo	AR	1.02	AR

Como podemos observar en la tabla no hay cambio notable en la estratificación de riesgo cuando se agrega el parámetro de la hiperdiploidía de índice bajo.

Tabla 8. Cambio en el estado de estratificación cuando solo se toma en cuenta Edad, número de leucocitos por microlitro, inmunofenotipo y translocación, y como puede variar cuando se agrega el parametro de IADN hipodiploide a la estratificación de riesgo.

Genero	Edad	LEUCOCITOS S X 10 ³ Cel/ μ L	IMF	Translocación	FR-C	IDNA	FR-IDNA
Femenino	12 años	37.6	PBC	Negativo	AR	0.98	AR
Femenino	10 años	59.3	PBC	Negativo	AR	0.94	AR
Femenino	16 años	152	PBC	T (16:21)	AR	0.94	AR
Masculino	14 años	142.7	B/M	T (9:22)	MAR	0.97	MAR
Masculino	4 años	21.4	PBC	T (12:21)	RH	0.97	AR
Femenino	4 años	103	PBC	Negativo	AR	0.98	AR

En esta tabla podemos observar, que al introducir la hipodiploidía como factor de riesgo, la estratificación cambia de tal manera que un paciente al estar catalogado como riesgo habitual (RH) cambia a alto riesgo (AR).

6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las muestras estudiadas corresponden a pacientes de edades comprendidas entre 0 y 18 años a los cuales se les tomo muestra de médula ósea para la realización del inmunofenotipo mediante citometria de flujo, las muestras cuyo inmunofenotipo correspondían al de una LA se tomaron en cuenta para una posterior evaluación del índice de ADN. Y las muestras de médula ósea con inmunofenotipo negativo para leucemia aguda no se tomaron en cuenta en este estudio.

Se logró recabar un total de 29 muestras, 15/29 (52%) niñas y 14/29 (48%) (grafica2.), de estas 29 muestras 2/29 (7%) corresponden a leucemia mieloide aguda M3 y M4 respectivamente, las 27/29 (93%) restantes dieron marcadores positivos para leucemia linfoblastica de tipo B (grafica 1). Cabe destacar que durante el tiempo en el cual se realizó el estudio no se encontró inmunofenotipo de tipo T.

Dentro del grupo de muestras con inmunofenotipo B solo se encontró dos subgrupos LLA Pro-B 9/27 (33%) y LLA Pro-B común 18/27 (67%) esto corresponde con los estudios de inmunofenotipo reportados en la literatura (Rivera, R et al. 2000) (gráfica 3).

La cuantificación del ADN de las muestras de LA mediante citometria de flujo mostro que 6/27 (22%) de los casos analizados tenían ADN hipodiploide, se consideró como ADN hipodiploide si la relación entre la media del pico G0/G1 de la muestra con leucemia y la media del pico G0/G1 del control sano sea menor a 1 (rango de entre 0.66 y 0.99). lo cual se aleja un poco de lo reportado en estudios reportados (Quijano M. et al, Chin-hon. Et al y Forestier E. et al) lo cual se podría explicar debido a las condiciones ambientales y socioeconómicas pudieran ser diferentes en cada uno de los estudios analizados.

Se encontraron 3/27 (11%) casos con ADN diploide considerando la diploide estrictamente cuando la media del pico G0/G1 de la muestra con leucemia dividida entre la media del pico G0/G1 del control sano sea igual a 1. Lo cual tampoco concuerda con los estudios anteriormente mencionados, donde se reporta que del 20 al 30% de los pacientes con LLA no presentan anomalías estructurales.

La hiperdiploidía se analizó de la siguiente manera: aquellas muestras con índice de ADN mayor de 1.01 y menor de 1.16 se denominaron como hiperdiploides de índice bajo y as

muestras con índice de ADN MAYOR DE 1.16 se consideraron como hiperdiploides de índice alto (López, Montesdeoca, & Rodríguez, 2003) Se encontró para cada grupo un total de 33% (9/27), esto concuerda con otros estudios reportados como el de Quijano et al Rachieru S et al.

Uno de los factores analizados durante este trabajo fue la cantidad de leucocitos de las muestras con LA ya que en estos casos una cantidad de leucocitos menor a $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ es considerado como factor de buen pronóstico mientras que valores de estas células por encima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ es considerado desfavorable. Por lo cual se analizó esta variable dentro de los grupos aneuploides.

En el caso de la hipodiploidía se encontró que 5/6 (83%) corresponden a pacientes con leucocitos $>50 \times 10^3/\mu\text{L}$ y solo 1/6 con leucocitos por debajo de este valor. Podemos considerar a los 5 pacientes con leucocitos por encima de $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ e índice de ADN menor de 1 (hipodiploide) como un grupo de riesgo ya que los dos factores son desfavorables en estos pacientes. (Grafica 5), esto podría explicarse debido a un descontrol en el ciclo celular que conlleva a la continua actividad del ciclo debido a la deficiencia de los puntos de control para identificar anomalías en el ADN de estas células logrando la aumentada proliferación de células inmaduras tanto en MO como sangre periférica. (Haixia, Jihong, Chunwei, Zhuogang, & Yingchun, 2010)

Dentro de los casos con hiperdiploidía de índice bajo 5/9 (56%) correspondían a muestras donde los leucocitos estaban por debajo de los $50 \times 10^3/\mu\text{L}$ y los 4/9 (44%) restantes a casos de pacientes con leucocitos por encima de este valor. (Gráfica 6)

Dentro de los casos hiperdiploidía de índice alto encontramos que 8/9 (89%) tienen leucocitos $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$ el caso restante tiene leucocitos por encima de cincuenta mil como podemos ver los 8 pacientes con leucocitos por encima de este valor cuentan con dos variables favorables. (Grafica 7). Las leucemias con ADN hiperdiploide de índice alto también muestran una respuesta al tratamiento según la literatura, en estudios invitro (Chikako et al) se ha demostrado que la alta hiperdiploidía tiene requerimientos más específicos para lograr llevar a término el ciclo celular.

Otro factor a analizar dentro de los grupos con aneuploidia es el tipo de leucemia que presentan se ha descrito que las leucemias de progenie B tienen un mejor pronóstico cuando las células presentan poca maduración (Jimenez-Morales et. al 2008)

En el grupo de los hipodiploides (8/29) se encuentran las 2/8 (25%) leucemias de tipo mieloide, 4/8 (50%) Pre-B común y las 2/8 (25%) restantes Pre-B (Gráfica 8).

En el grupo de los hiperdiploides (9/29) de índice bajo se encontraron 5/9 (56%) con LLA Pre-B común mientras que 4/9 (44%) son de LLA Pre-B (Gráfica 9).

Mientras que en el grupo de los hiperdiploides de índice alto se encontró que 8/9 (89%) corresponden a LLA Pre.B común, el caso restante corresponde a una leucemia de tipo Pre-B (Gráfica 10).

En el caso de la diploidia dos son LLA Pre-B y una LLA Pre-B común (Gráfica 11)

Fase S del ciclo celular

El índice de proliferación celular es determinado por el porcentaje de células en fase S del ciclo celular, la mayor actividad proliferativa está relacionada con un mayor crecimiento tumoral agresivo y por tanto se asocia a un mal pronóstico clínico (Astete G. 1998)

La influencia de la actividad proliferativa en el pronóstico de las leucemias se ha estudiado poco, en este caso se encontró lo siguiente:

Del total de 29 muestras con LA 13 (45%) no presentan células en fase S y 16/29 (55%) mostraron actividad de las células en esta fase en un rango de entre 0.62% a 40.83% (Gráfica 12).

Todos los casos con hipodiploidía presentaron células en fase S con un rango de 0.98% a 40.83% de células en esta fase. Mediante el método de chi-cuadrada se encontró que esta relación no es meramente al azar, el estadístico muestra una $\chi^2=6.651$ con $gl=1$ y $P=0.0099$. Por lo cual podemos decir que estas dos variables van ligadas. Lo cual podría explicar que aquellos pacientes con índice de ADN hipodiploide tengan elevados números en las cuentas de leucocitos.

Dentro de las muestras con dipodia se encontró solo 1 muestra con 7.54% de células en fase S.

En el caso con hiperdiploidía de índice bajo se encontró 5/9 (56%) no presentaron células en fase S las 4/9 (44%) restantes si presentan células en esta fase con un % de células entre 0.62% y 5.80% células (Gráfica 13).

Por otra parte en la hiperdiploidía de índice alto 6/9 (67%) no presentaron células en fase S y solo 3/9 (33%) presentaron actividad de células en esta fase. (Gráfica 14).

Translocaciones

Del total de los hipodiploides se encontró que 5 (63%) casos presentaban alguna alteración de tipo estructural, encontrándose las siguientes translocaciones; t(16;21), t(9;22), t(12;21), t(15;17) y t(9;21). Cabe mencionar que las translocaciones t(15;17) y t(9;21) corresponden a los dos casos de leucemia mieloide. Esto concuerda con los estudios realizados por Haixia Tong et. al.

Dentro de los 9 casos con Índice de ADN hiperdiploide bajo se encontró que 2 (22%) tenían alteraciones de tipo estructural encontrándose las siguientes translocaciones; t(12;21) y t(9;11). Mientras que en los casos con índice de ADN hiperdiploide alto se encontraron también 2 casos con alteraciones estructurales pero con las siguientes translocaciones t(1;19) y t (8;21). Todas estas alteraciones estructurales se catalogan como de buen pronóstico (Shirlyn B McKenzie).

Grupos de riesgo

Los pacientes que presentan hiperdiploidía de índice alto también reúnen otros factores favorables como son una cantidad de leucocitos $<50 \times 10^3/\mu\text{L}$, LLA del tipo Pre-B común, No presencia de actividad de las células en fase S y ausencia de translocación. Por lo cual podemos definir a estos pacientes como pacientes de riesgo estándar.

Los pacientes que presentan hipodiploidía reúnen otros factores desfavorables como actividad de las células en fase S y valor de leucocitos $>50 \times 10^3/\mu\text{L}$ y presencia de translocaciones como t(9;22), t(4;11) y t(15;17) por lo que podemos definir a este grupo como de alto riesgo.

7 CONCLUSIONES

Con el objetivo de mejorar las herramientas diagnósticas y pronósticas en pacientes con Leucemia Aguda del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se implementó una técnica eficiente para la determinación de índice de ADN en pacientes con Leucemia Aguda.

Encontrando que el 90% de los pacientes con leucemia aguda de nuevo diagnóstico presentan contenido aneuploide de ADN, siendo la mayoría de tipo hiperdiploide (62%).

La determinación de la ploidía tiene significado pronóstico ya que los casos hipodiploides y $t(9;22)$ y $t(4;11)$ tienen pronóstico desfavorable o de alto riesgo. Se encontró un paciente con estas características. 9 casos hiperdiploides de índice alto >1.16 y solo uno con $t(1;19)$ por lo que se consideró de riesgo estándar.

La hipodiploidía tiene presencia en conjunto de otros factores como elevada cantidad de leucocitos, una alta actividad de la fase S del ciclo celular y presencia de translocaciones como $t(9;22)$.

La hiperdiploidía se presenta en conjunto de otros factores como una baja cantidad de leucocitos, leucemia en estadios de poca maduración, en la gran mayoría no hay presencia de actividad en la fase S.

8 REFERENCIAS

1. Barrera, L., Drago, E., Pérez, J., Celia, A., Gómez, F., Sainz, T., y otros. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, vol. 1 No. 17 pag. 42-55.
2. Belkov VM, K. E. (1999). A mathematical model of in vivo metotrexate accumulation in lymphoblastic leukemia. *Blood* Vol. 80 No 35, 1643-1650.
3. Boticario, C., & Cascales, M. (2012). Innovaciones en Cáncer. Madrid: UNED. Recuperado de <https://books.google.com.mx>
4. Brannvall, M. (s.f.). Medicina molecular. Recuperado el 18 de julio de 2016, de www.molmed.lu.se/HSC_regulation.htm
5. Ching-Hon Pui, A. J. (1990). Near-Triploid and Near-Tetraploid Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. *Blood*. vol 76 No. 3, 590-596.
6. Coronel, R. (2005). Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediátrica de México* vol. 26, No. 3, pag. 129-134.
7. Metodología e instrumentación en análisis celular en el estudio de los cromosomas humanos. (2012). Obtenido de: <http://www.fmed.uba.ar/depto/histo1a/genetica/adm/sq2.pdf>
8. Erik, F., Gösta, H., & Göran, R. (1998). Flow cytometric DNA index and karyotype in childhood lymphoblastic leukemia. *Analytical Cellular Pathology* vol. 17, No 3, pag. 145-156.
9. Frierson, H. F., & Linder, J. (1997). Flow and image cytometry. Principles and practice of surgical pathology and cytopathology. 3rd Ed. Capítulo 7. Pag 95-115.
10. Gray, J., Dolbeare, F., & Pillavincini, M. (1991). Quantitative cell-cycle analysis. En: Flow cytometry and sorting. Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L., Wiley-Liss.
11. Haixia, T., Jihong, Z., Chunwei, L., Zhuogang, L., & Yingchun, Z. (2010). Immunophenotypic, Cytogenetic and clinical features of 113 acute lymphoblastic. *Ann Acad Med Singapore*, Vol. 39, No 1, 49-53.
12. INEGI. (2015). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer.
13. Ito C, K. M.-S. (1999). Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with marked propensity to undergo apoptosis. *Blood*, Vol. 93, No. 1, 315-320.
14. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. Pubmed.
15. Jimenez-Morales, Miranda-Peralta, Saldaña-Alvarez, Perez-Vera, Paredes-Aguilera, Rivera-Luna, y otros. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: Prevalence of the most common acute

- lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leukemia Research*, Vol. 32, No. 10, 1518-1522.
16. Kaspers GJ, S. L. (1995). Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs. *Blood*, Vol. 85, No. 3 751-756.
 17. López, A., Montes de Oca, M., & Rodríguez, L. (2003). Papel de la genética molecular en el cáncer infantil. *Anales de Pediatría* Vol. 59, No. 4, 334-344.
 18. López, F. (2002). El ciclo celular bien merece un galardón. *Ciencia*, 74-77.
 19. McKenzie, S. B. (2000). Hematología Clínica. México: El manual moderno 2ª edición.
 20. Merino, A. (2010). Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *El servier*, 139-147.
 21. Messing E.M. (2002) urothelial tumors of the urinary tract. *Cambell's urology*. E.U. capítulo 76, pag. 2732-2784
 22. Nuñez R., & Escalona J. (2005). Ciclo celular. Facultad de Medicina, 1-8.
 23. Orfao, A., (2003) Ciudad, J., López, A., Lopez, M., Vidriales, M., Macedo, A., y otros. (s.f.). Citometría de flujo en el diagnóstico Clínico. servicio general de la Universidad de Salamanca, 115-130.
 24. Panetta JC. Et al. (2002). A Mathematical model of in vivo methotrexate accumulation in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, Vol. 50, No. 5, 419-428.
 25. Quezada M. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS* 65, pag. 5-12.
 26. Quijano, M., Torres, M., Vazquez, L., Cuellar, G., Romero, M., Martín, E., y otros. (2013). Correlación de la t(9;22), t(12;21) e hiperdiploidía de ADN con el inmunofenotipo y la tasa de proliferación de células B neoplásicas en niños con leucemia linfoblástica aguda de precursores B. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*, Vol. 33, No. 3, 468-486.
 27. Rachieru-Sourisseau, L, B., N, D., & Robert, A. (2010). DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *International Journal of Laboratory Hematology*, Vol. 32, No. 3, 288-298.
 28. Ramos, M., Fernández, M., & Miranda, B. (2001). Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *Anales Españoles de Pediatría*. Vol. 55, N.o 1, 45-52.
 29. Rivera, R. (2000). La importancia de los factores pronósticos en leucemia aguda linfoblástica (LAL) de la población pediátrica en un país

- en vías de desarrollo. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Vol. 46, No. 4, 260-266.
30. Rivera, L. (s.f.). Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia.
 31. Romero A; Jiménez RM. (2002). Leucemias Agudas. *Medicina de Familia* Vol. 3, 40-48.
 32. Rooney, D., & Czepulkowski, B. (1978). *Human Cytogenetics: a practical approach*. Oxford: IRL PRES.
 33. Rovegno, A. R. (2004). Ploidia en el pronóstico de cáncer de vejiga. *rev. Arg. de Urol.* Vol. 69, 202+209.
 34. Sans-Sabafren, J., Beses, C., & Vivers, J. (2001). *Hematología Clínica*. España: Elsevier.
 35. SINAVE/DGE/SALUD/. (2011). Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México.
 36. Swerdlow, S., Elias, C., Nancy, L., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., y otros. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC.
 37. Tamar, C., Contreras, N., & Fonseca, J. (2008). Utilidad de la citogenética en la medicina actual. *Educación y Práctica de la Medicina*, Vol. 36, No. 4, 309-316.
 38. TsiehSun. (1993). *Cytometric Analysis of Hematologic Neoplasms*. *Shoin Medical Publishers*, New York, 3-8.
 39. Villasis, M. A., Arias, J., Escamilla, A., & Bonilla, J. (2012). Metaanálisis sobre los factores pronóstico relacionados con la mortalidad en niños con leucemia linfoblástica aguda. *Bol Med Hosp Infant Mex*, Vol. 69, No. 3, 175-189.
 40. Whitehead VM, V. M. (1998). Accumulation of methotrexate polyglutamates, ploidy and trisomies of both chromosomes 4 and 10 in lymphoblasts from children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Oncology Group Study Leuk Lymphoma*, Vol. 80, No. 5, 507-509.

9 ANEXOS

Anexo 1

	AGRUPACIÓN MEXICANA PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOLOGÍA	Mesa Directiva 2015-2017	
	† Dr. Luis Sánchez Medel Fundador	Dr. J. Ramón Rivas Llamas Presidente	Dra. Adolфина Bergés García Vicepresidente
	Dra. Nidia P Zapata Canto Secretaria	Dr. Ignacio J. Aguirre Aguirre Tesoroero	Dr. Jorge Duque Rodríguez Vocal de Membresía
	Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado Vocal de Act. Académicas		

Tiene el honor de entregar la presente

CONSTANCIA

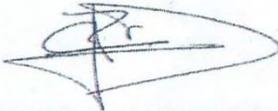
a:

Nájera-Martínez N, Vega-Cardelas JM, Miguel, Vilchis-Ordoñez A, López-Martínez B, Hernández-Echáurregui, Parra-Ortega I, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México DF.

Por su participación con el trabajo en presentación Oral:

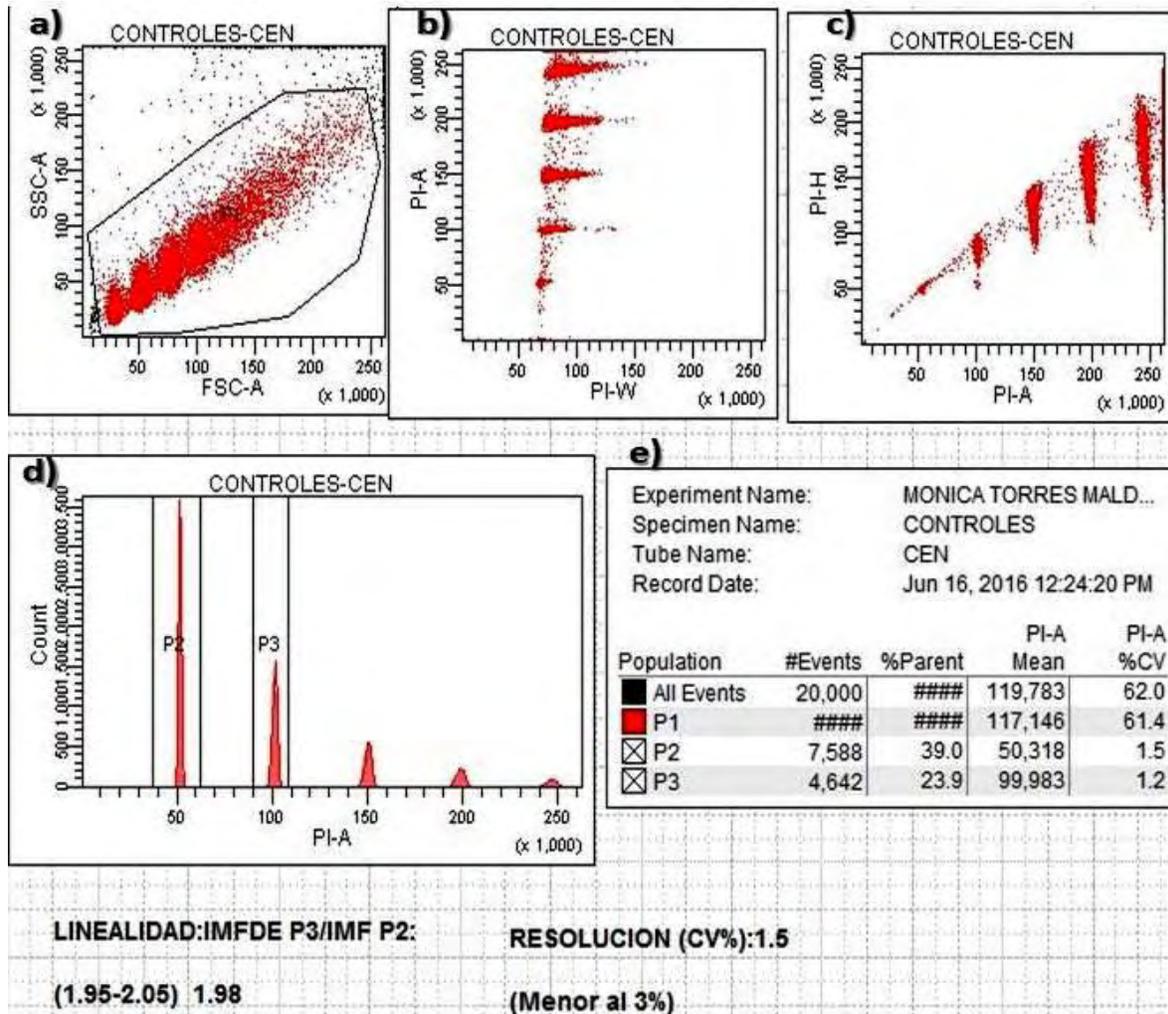
EVALUACIÓN DEL ÍNDICE DE ADN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA (CYCLETES PLUS DNA REAGENT KIT).

Presentado en el "LVII" Congreso Anual de la **Agrupación**, evento realizado del 27 de abril al 1 de mayo de 2016, en la Ciudad de Mérida, Yucatán.

 Ramón Rivas Llamas Presidente	 Dra. Nidia P.- Zapata Canto Secretaria
 Dr. Guillermo J. Ruiz Delgado Vocal de Act. Científicas	

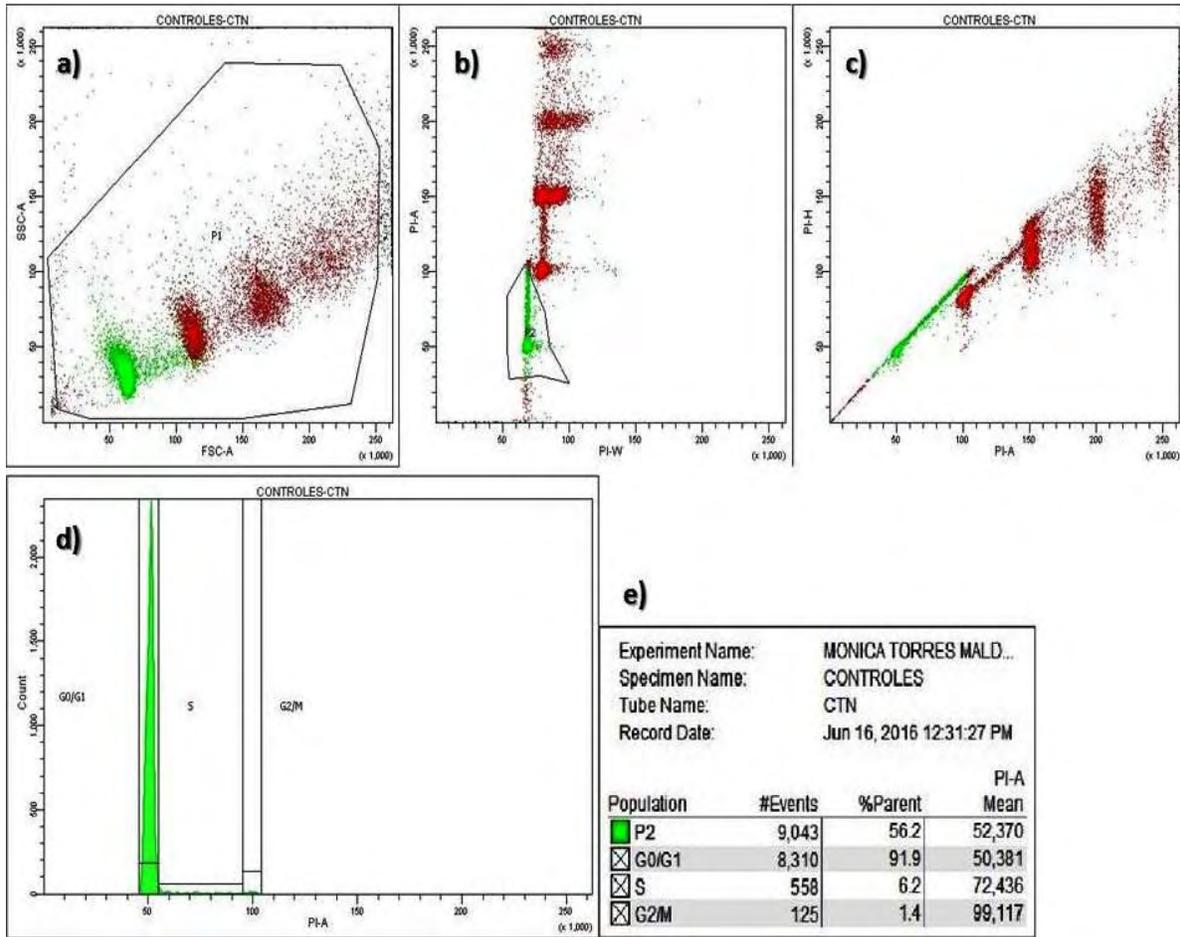
San Francisco 1626 406, Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, C.P. 03100, México, D.F. Tel. +52 (55) 5624 1112 Tel/Fax +52 (55) 5534 1866
contacto@amehac.org www.amehac.org

Anexo 2. PLANTILLA DE CONTROLES CEN (NUCLEOS DE ERITROCITOS DE POLLO).



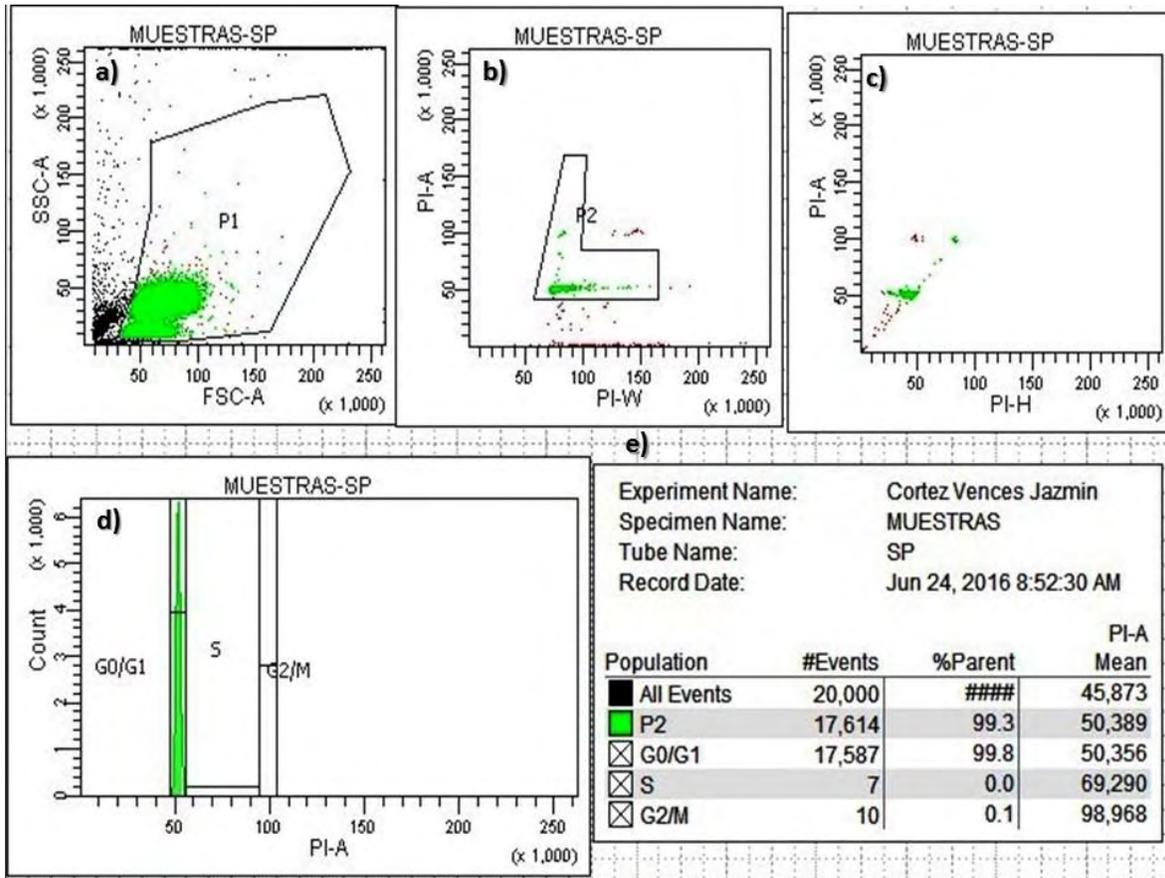
Con los núcleos CEN se obtiene la linealidad y resolución del instrumento, ya que estos núcleos tienen la propiedad de adherirse entre sí generando dobletes y tripletes, los cuales el equipo es capaz de distinguir gracias al ajuste de voltaje de los PMT (tubos fotomultiplicadores) y a la forma de medición de pulsos. En la imagen a). Podemos observar la totalidad de la población (singuletes, dobletes y tripletes) dispersos en cuanto a tamaño y complejidad (FSC vs SSC). b) en este histograma podemos observar la forma de dispersión de los núcleos en cuanto a ancho vs área y así podemos observar los singuletes con menor ancho y altura al final del histograma y van en aumento conforme estas dos características aumentan logrando así la correcta separación de los singuletes, dobletes y demás agregados. c) esta imagen nos muestra un histograma similar al anterior solo que ahora en parámetros de área vs altura, la imagen d) nos muestra un histograma en el cual se ajusta el voltaje del yoduro de propidio para dar una intensidad media de fluorescencia (IMF) 50,000, parámetro que se asigna a los singuletes (P2) debido a que estos cuentan con la cantidad normal de ADN (2n), de esta manera los dobletes (P3) deberán encontrarse en una IMF de 100,000, los tripletes en 150,000 y así sucesivamente. Este histograma nos ayuda a separar de manera correcta los histogramas b y c. d) este recuadro nos da los datos de interés de las poblaciones de cada uno de los histogramas, siendo así que el total de eventos captados por el citómetro son 20,000 que se encuentran englobados en P1, de los cuales 7588 son singuletes (P2) los cuales se encuentran a una IMF de 50,318, 4642 son dobletes (P3) los cuales se encuentran a una IMF de 99,983. De esta plantilla se obtiene la linealidad del equipo dividiendo la IMF de P3 entre la IMF de P2 la cual debe oscilar entre 1.95 y 2.05. El último factor a resaltar aquí es CV% el cual nos da la variación entre la cantidad de ADN medido en los núcleos de P2, y cuyo valor no debe ser mayor a 3% pues de lo contrario estaríamos de una población diferente a los singuletes que el equipo no es capaz de distinguir, o que los controles están vencidos.

Anexo 3. PLANTILLA DE CONTROLES CTN (NUCLEOS DE TIMO DE CARNERO)



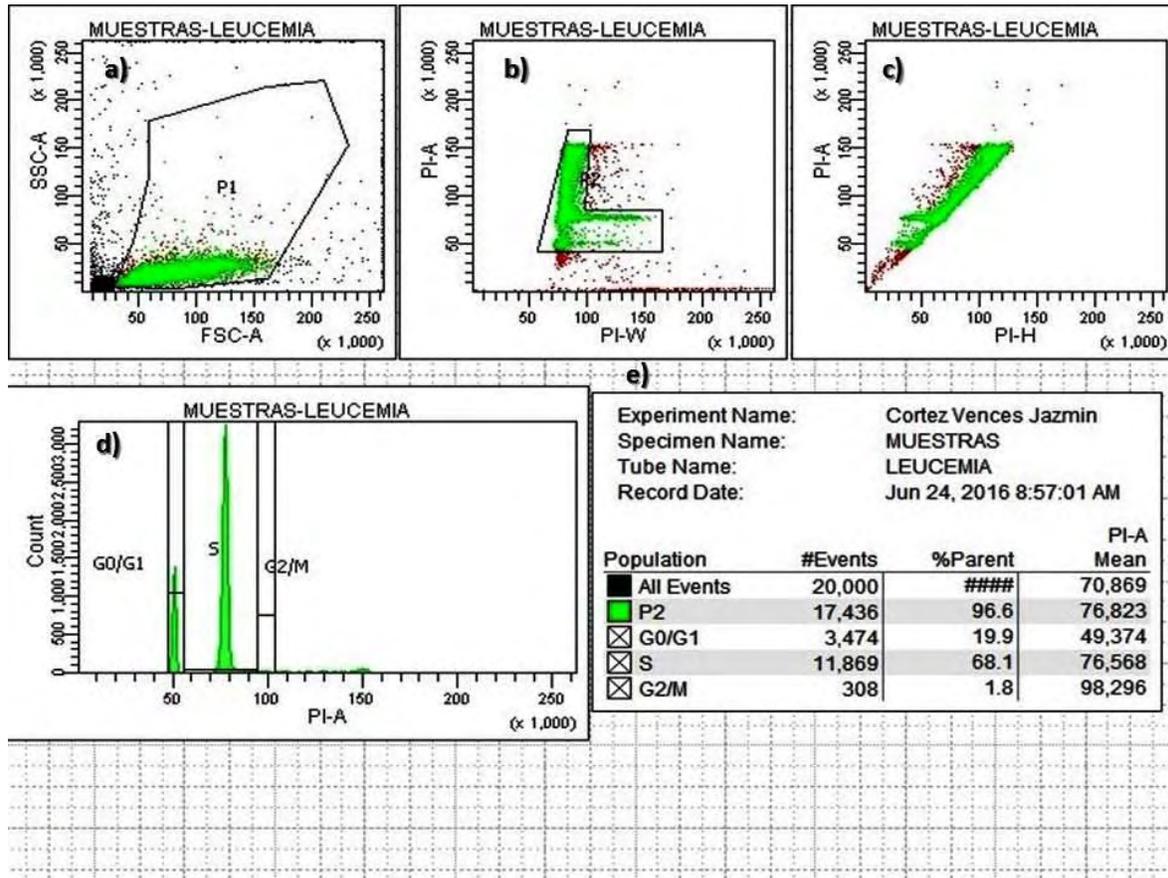
Los núcleos de timo de carnero contienen singuletes en todas las fases del ciclo celular y cantidades pequeñas de dobletes y triplete en todas las fases del ciclo celular, la mayoría de los núcleos están en la fase G0/G1 (2n DNA) y una pequeña proporción están en la fase S y G2+M (4n DNA) de núcleos en singulete. Los núcleos en doblete de la fase G0/G1 (4n DNA) también están presentes y pueden ser discriminados de las fases G2+M de singuletes (4n DNA), al usar estos núcleos y mediante la medición de pulsos, lo que permite estimar los porcentajes de células que se encuentran en cada una de las fases que es lo que se requiere determinar. El histograma a) nos muestra el total de la población de acuerdo al tamaño y complejidad FSC vs SSC, el histograma b) nos muestra la dispersión de los núcleos en cuanto a ancho vs área, podemos observar las población de los singuletes en verde y la de los demás agregados en rojo, también podemos distinguir dentro cada población la cantidad de núcleos que se encuentran en fase G0, la cantidad de núcleos que se encuentran en fase S y la cantidad de núcleos que están en G2/M, c) este histograma nos muestra los mismos parámetros que el b) pero en esta ocasión en términos de área vs altura. El histograma d) nos muestra la IMF de la población seleccionada P2 (singuletes) y las acomoda en cantidades de ADN, los núcleos en fase G0/G1 se ajustan a una IMF de 50,000, los núcleos en fase S se mantienen en un rango de 55,00 a 95,000 y los núcleos en fase G2/M a una IMF de 100,000. De esta manera la cantidad de ADN que contiene cada núcleo el cual es medido a través de la IMF del yoduro de propidio, nos es de utilidad para distinguir las fases del ciclo celular de la población P2 (singuletes) de los nucleos de timo de carnero. La imagen e) nos muestra una tabla con las características de la población seleccionada en este caso la población 2 (singuletes). Podemos apreciar un total de 9043 núcleos en la población 2 un 50% del total de la población 1 la cual vemos en el histograma a, de estos 9043 núcleos 8310 corresponden a la fase G0/G1, los cuales representan un 91.9% del total de la población 2 y que están a una IMF de 50,381. 558 núcleos están en fase S que representan 6.2% del total de la población p2 y que están a una IMF de 72,436. Y un total de 125 núcleos que están en fase G2/M siendo un 1.4% de la población 2 y que están a una IMF DE 99,117.

Anexo 4. PLANTILLA DE SANGRE PERIFERICA (CONTROL NORMAL)



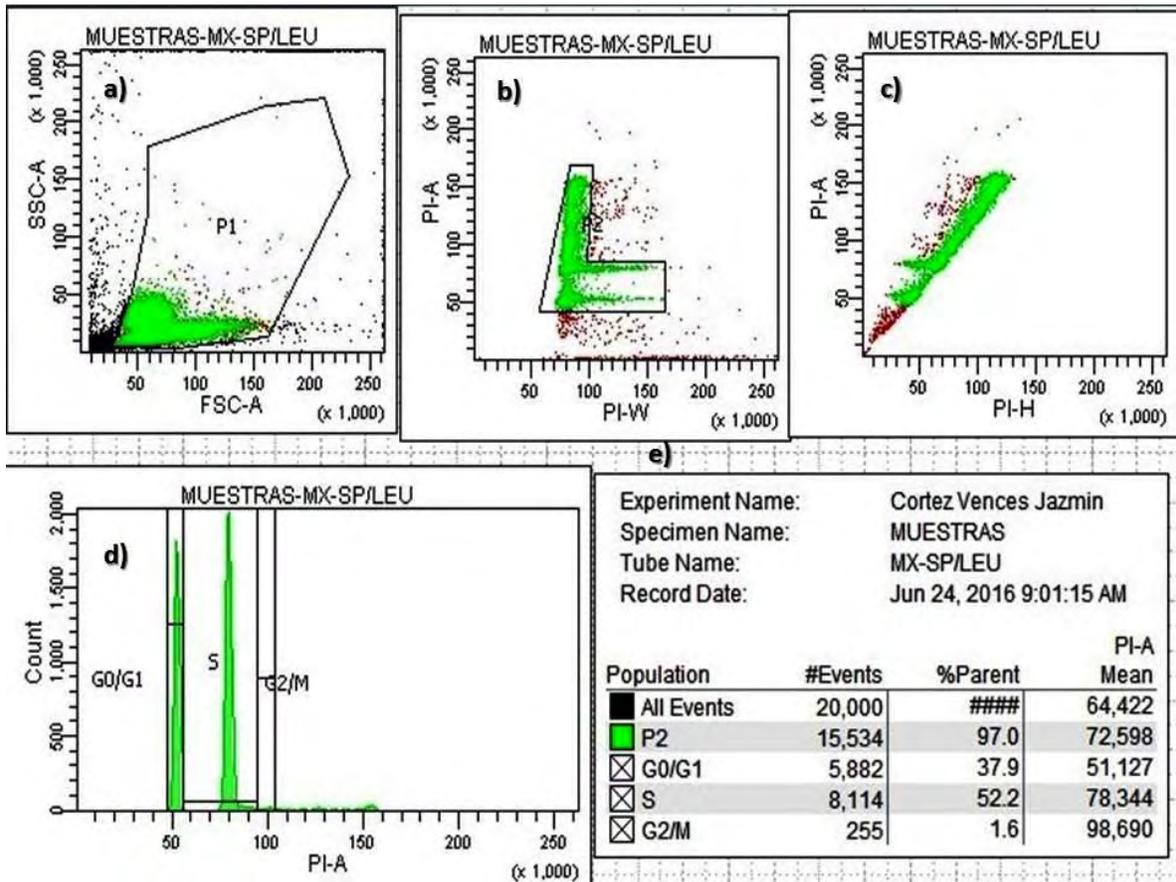
Para determinar el ajuste del instrumento para llevar a cabo el análisis de ADN es necesario contar con un control normal, esto se hace usando sangre periférica de una persona clínicamente sana, se realiza con la finalidad de llevar a cabo una comparación de poblaciones, entre la cantidad de ADN de una muestra normal y una muestra con Leucemia Aguda. En el histograma a) podemos observar el acomodo de los núcleos en cuanto a tamaño y complejidad, (FSC vs SSC), en el histograma b) el acomodo de lo núcleos de acuerdo a ancho vs área y a la fase en la que se encuentran, como podemos ver solo se cuenta con singuletes, en el histograma c) observamos los mismos parámetros que en el b pero esta vez en altura vs área. El histograma d) nos sirve para ajustar por última vez estos núcleos (cantidad de ADN normal) en una IMF de 50,000 cabe señalar que es la última vez que se ajusta a voltaje de 50,000 la población P2 en las siguientes plantillas solo se hace la adquisición de eventos. EL cuadro de la imagen e) nos muestra las características de este control normal (núcleos de sangre periférica).

Anexo 5. PLANTILLA DE UNA MUESTRA DE MEDULA OSEA DE PACIENTE CON LEUCEMIA AGUDA PRE B COMUN.



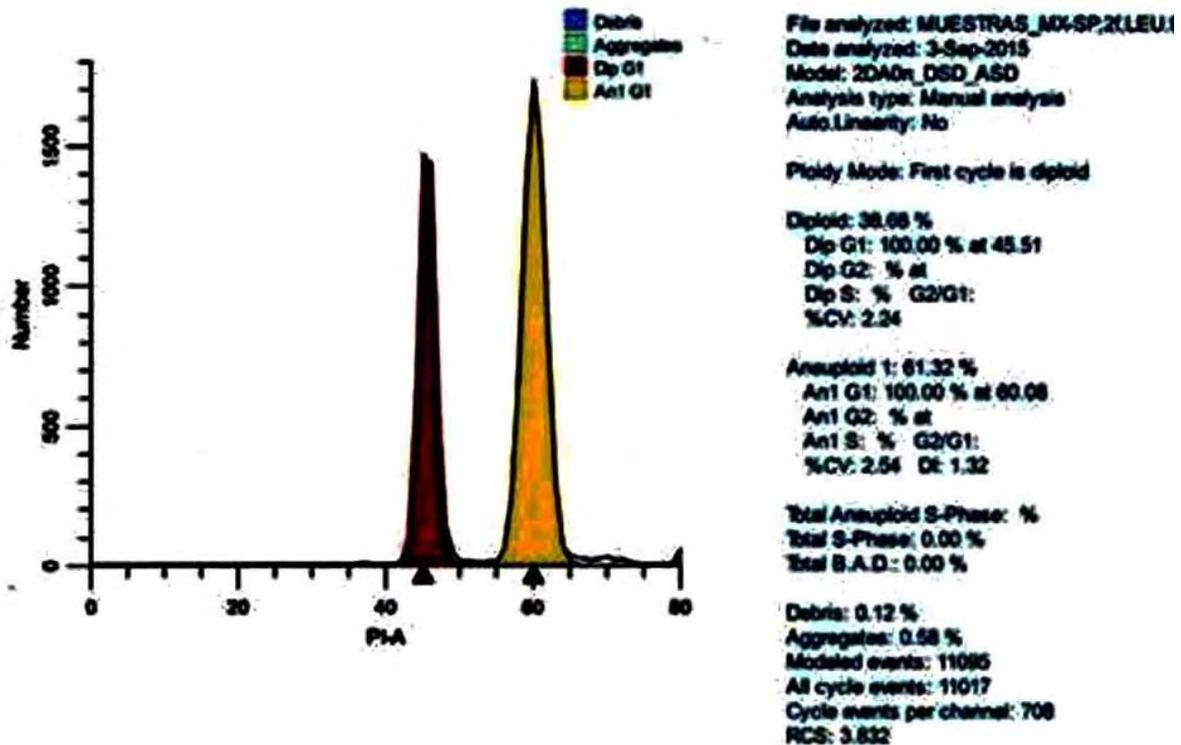
En el histograma a) observamos la dispersión de la población de acuerdo a FSC vs SSC, en el histograma b) observamos el acomodo de los núcleos de acuerdo a ancho y área de los núcleos, podemos observar desde este punto dos poblaciones definidas, en el histograma c) observamos el acomodo de los núcleos de acuerdo a altura vs área, también es posible distinguir las dos poblaciones, en el histograma d) observamos la IMF de las poblaciones antes señaladas, esta IMF se traduce en cantidad de ADN por lo cual podemos decir que dentro de los núcleos de MO contamos con dos poblaciones que difieren en cuanto a la cantidad de ADN, En la imagen e) podemos observar las características de estas poblaciones.

Anexo 6. PLANTILLA DE LA MEZCLA MEDULA OSEA Y SANGRE PERIFERICA EN RELACION 2:1, DOS PARTES DE MEDULA OSEA POR CADA PARTE DE SANGRE PERIFERICA



. En el histograma a) podemos ver a las poblaciones en cuanto a tamaño y complejidad (FSC vs SSC). En el histograma b) observamos el acomodo de las poblaciones en cuanto a ancho vs área, observamos claramente la población correspondiente a sangre periférica y encima de ella a los núcleos correspondientes a la medula ósea, en el histograma C) observamos las mismas características de las poblaciones esta vez en un acomodo de altura vs área, en el histograma D) observamos las dos poblaciones definidas, a una IMF de 50, 000 encontramos a nuestro control normal, y a una IMF de 78, 344 a nuestra muestra de MO con LLA, como se mencionó anteriormente la IMF se traduce en cantidad de ADN viendo así que la muestra de MO contiene una mayor cantidad de ADN que nuestro control normal (Núcleos deSP). En la tabla de la imagen e) podemos observar las características de estas dos poblaciones. Cabe destacar que esta tabla me arroja estos datos como si se tratara de una sola población.

Anexo 7. Análisis en el software modfit 4.1



Donde observamos en color rojo los núcleos con ADN de $2n$ (diploide) y en amarillo los núcleos con ADN mayor a $2n$ (aneuploide en este caso específicamente hiperdiploide, cabe señalar que si el ADN de los núcleos de MO fuera hipodiploide este se situaría en una IMF menor a 50,000 es decir del lado izquierdo del ADN de los núcleos con ADN normal). Este software nos proporciona varios datos, la relación en núcleos de SP y núcleos de MO la cual debe ser 35% y 65% respectivamente, las características de la población diploide (control normal) cantidad de núcleos en fase GO/G1, fase S y G2/M y las características de la población aneuploide (MO en color amarillo) núcleos en fase GO/G1, fase S y G2/M, la cantidad de debris que interviene en el estudio, cantidad de eventos, la resolución (capacidad del software para distinguir entre dos picos de muestras diferentes, el coeficiente de variación entre cada núcleo tanto de SP como MO. Y el dato más relevante índice de ADN (ID) que en este caso corresponde a 1.32.