



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Importancia del diagnóstico citogenético y molecular de  
las leucemias, relacionadas al pronóstico y tratamiento de  
las mismas: Revisión Bibliográfica**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**GALLEGOS HUERTAS VALERIA**

**ASESOR:**

**M. en C. Maritere Domínguez Rojas**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**



DEPARTAMENTO DE  
EXÁMENES PROFESIONALES

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR 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.**

**Importancia del diagnóstico citogenético y molecular de las leucemias, relacionadas a pronóstico y tratamiento de las mismas. Revisión Bibliográfica.**

Que presenta la pasante: **Valeria Gallegos Huertas**

Con número de cuenta: **413024813** 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 24 de Octubre de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	
<b>2do. SUPLENTE</b>	L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

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

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a mis papás principalmente, quienes han sido mi más grande apoyo durante todo este camino y que me han acompañado en cada paso y decisión que he tomado. Sin ustedes nada sería posible, todo lo que hago es por y para ustedes. Gracias por creer en mí, por ser mi más grande felicidad y por nunca, nunca soltarme. ¡LO LOGRAMOS!

Una dedicatoria especial para mi Abuela Amparo, que ya no está con nosotros físicamente pero que está presente en mis pensamientos y mi corazón. Nos vemos en el río, abuela.

## Agradecimientos

A Dios por siempre sostenerme, a mí y a mi familia, por ser el pilar fundamental de mi vida y por permitirme llegar hasta aquí, ¡a Él sea toda la gloria!

A mi papá por suplir TODAS mis necesidades, tanto económicas como emocionales, por ser un ejemplo de trabajo y porque siempre ha sido un hombre excepcional, responsable conmigo y mi hermana, siempre al pendiente de ambas, gracias por apoyarme en todo lo que hago, por siempre acompañarme, por ser el sostén de nuestra familia, gracias porque sin ti nada, nada sería posible. Gracias por ser un papá siempre presente y 100% involucrado. Gracias pá, por fiiiin. Te amo.

A mi mamá por siempre estar al pendiente de mi formación académica, porque gracias a ti soy la mujer que soy, gracias por los esfuerzos incansables que siempre haces por Pau y por mí, gracias por guiarme para ser mejor. Gracias porque siempre tenías un plato de comida caliente para cuando yo llegara de la escuela, gracias por ser una mamá de tiempo completo, gracias por tu compañía, gracias por siempre estar para mí y por ser la mujer tan entregada a su casa y su familia que eres. Te amo mamá, esto es para ustedes.

A mi hermana, por ser un ejemplo para mí, por siempre enseñarme con su ejemplo a ser una mujer responsable y trabajadora. Gracias por tener la altura que una hermana mayor debe de tener. Gracias por quedarte conmigo hasta muuuuuy altas horas de la madrugada hasta que terminara mi tarea (jajajaja →). Gracias Lina por ser una inspiración y orgullo para mí.

A mis abuelitos, mi papi Oswaldo y mi mami Eva. Gracias papi por ser una inspiración diaria para mí, por ser un recordatorio a mi corazón de que Dios existe, tú sabes el lugar tan especial que tienes en mi vida y que siempre guardo tus palabras en mi corazón, quiero llegar a ser un día todo lo que tú ves en mí. Gracias por verme con ojos de amor y por creer en mí, gracias porque cuando creo que no puedo hacer las cosas tú siempre me recuerdas lo valiosa que soy. Le agradezco a Dios porque me permitió llegar hasta este día contigo a mi lado. Gracias mami Eva por ser un ejemplo de paciencia, de fortaleza y de amor, estoy agradecida con Dios por dejarme tener cerca a una mujer como tú. Ustedes dos son una de mis más grandes inspiraciones en la vida y el motor para que quiera hacer cosas grandes en mi vida.

Jonathan, gracias por ser parte de todo mi proceso para llegar hasta aquí, porque a tu lado siempre quiero ser la mejor versión de mi misma. Tú me haces ser una mejor persona, gracias por siempre animarme a hacer las cosas, por verme con esos ojos de amor y por creer taaanto en mí. Gracias por ver en mí, cosas que ni yo misma veo, por confiar siempre en mí y en todo lo hago. Le doy gracias a Dios porque te permitió estar cuando todo esto inicio y hoy estas aquí para verme cerrar algo tan importante para mí. Te amo.

En general a toda mi familia Gallegos Huertas por acompañarme en todo mi camino, porque la familia es una caricia al corazón y todos siempre han estado presentes en mis

mejores y peores momentos (ustedes saben quiénes son). Gracias por su amor y compañía. Los amo.

A “las divinas” por ser las mejores amigas que alguien puede tener, gracias por tantos años de amistad y porque siguen siendo parte de mi vida y mis logros, que siempreeee sea así. Las amo.

Mike y Ale por ser incondicionales, por siempre, siempre estar para mí, por vivir conmigo días tristes y días de muchísima felicidad. Porque sé que siempre puedo contar con ustedes y agradezco infinitamente que llegaron a mi vida para nunca irse.

A mis amigos de la universidad, a mi banda, gracias: Michelle, tú sabes lo especial que eres para mí y el lugar que tienes en mi corazón; Rafa, gracias por ser siempre un ejemplo de responsabilidad y de mucha entrega, si todos fuéramos como tú este mundo sería un mejor lugar, gracias por hacer mis días mucho más divertidos con tu ocurrencias. Alan, gracias por siempre escuchar mis historias y por tener una palabra para cada una, gracias por ser la parte ecuaníme de la banda. Alexis, gracias por tu ejemplo para todos nosotros del trabajo y constancia, gracias por ser parte de mis primeros semestres en la carrera. Cecy, gracias por tu sencillez, por ser siempre oídos para todos, por siempre estar dispuesta a ayudar de cualquier forma, por el corazón tan grande que tienes. Andy, gracias por todos los días que hemos pasado juntas porque siempre has estado ahí para mí. Roger, me encanto conocerte, gracias por cuidarme y por estar al pie del cañón siempre con todos. Gracias a todos por ser mi segunda familia durante 4 años de mi vida y por hacer mis días tan divertidos.

A los profesores que fueron parte de mi educación durante estos 4 años: al Dr. Enrique Ángeles Anguiano, Araceli Gaspar Medina, M. en C. Idalia Ávila Miyazawa quién me hizo amar la hematología, Dr. Julio Cesar Botello Pozos y M. en C. Maritere Domínguez Rojas, por ser por mucho los mejores profesores que tuve durante la carrera, porque todos aportaron cosas importantes en mi formación académica y personal de diferentes maneras y les agradezco infinitamente que existan profesores como ustedes, responsables con su trabajo de enseñar y con sus alumnos, gracias por inspirarme.

## Índice

<b>Índice de Figuras</b>	8
<b>Índice de Gráficos y Tablas</b>	9
<b>Índice de Diagramas</b>	10
<b>Abreviaturas</b>	11
<hr/>	
Resumen	13
1. Justificación	15
2. Introducción	16
3. Objetivo	19
4. Generalidades	20
4.1 Ciclo celular y su regulación	20
4.1.1 Interfase	22
4.1.2 Mitosis	23
4.2 Cáncer	29
4.2.1 Definición de Cáncer	30
4.2.2 Características del Cáncer	32
4.2.3 Protooncogenes, oncogenes y genes de supresión tumoral	42
4.3 Hematopoyesis	48
4.4 Leucemia	55
4.4.1 Etiología de las Leucemias	55
4.4.2 Cuadro Clínico de las Leucemias	58
4.4.3 Clasificación de Leucemias	62
4.4.3.1 Agudas	63
4.4.3.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LAL)	64
4.4.3.1.2 Leucemia Mieloblástica Aguda (LAM)	66
4.4.3.2 Crónicas	72
4.4.3.2.1 Leucemia Granulocítica Crónica (LGC)	73
4.4.3.2.2 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	73
4.4.4 Epidemiología de las Leucemias	74
5. Diagnóstico y Tratamiento de las Leucemias	80
5.1 Diagnóstico Hematológico de las Leucemias	83
5.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LAL)	83
5.1.2 Leucemia Mieloblástica Aguda (LAM)	83
5.1.3 Leucemia Granulocítica Crónica (LGC)	85
5.1.4 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	85
5.2 Diagnóstico Citogenético Clásico de las Leucemias	87
5.2.1 Cariotipo	91
5.3 Alteraciones Citogenéticas en pacientes con Leucemia	101
5.3.1 Cromosoma Filadelfia	102
5.4 Diagnóstico Citogenético Molecular de las Leucemias	109
5.4.1 FISH	111
5.4.2 CISH	121

---

5.5 Diagnóstico Molecular de las Leucemias	122
5.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	122
6. Conclusiones	137
7. Referencias	138



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Fases del ciclo celular de una célula somática eucariota	22
<b>Figura 2.</b> Fase M (mitosis) del ciclo celular	24
<b>Figura 3.</b> Mitosis de una célula eucariota por etapas, vista con microscopia de contraste	26
<b>Figura 4.</b> Progresión del ciclo celular y su regulación	24
<b>Figura 5.</b> Comparación de características morfológicas de células normales y cancerosas	31
<b>Figura 6.</b> Características distintivas en la célula cancerosa	33
<b>Figura 7.</b> Ilustración de una célula normal a través del proceso de apoptosis	36
<b>Figura 8.</b> Expansión tumoral inducida por la angiogénesis	37
<b>Figura 9.</b> Ilustración gráfica de la organización de la médula ósea	49
<b>Figura 10.</b> Tinción con eosina y hematoxilina del tejido de médula ósea	49
<b>Figura 11.</b> Secuencia de maduración de las líneas celulares en la médula ósea	52
<b>Figura 12.</b> Diferenciación mieloide y linfoide de las células sanguíneas	62
<b>Figura 13.</b> Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero	88
<b>Figura 14.</b> Protocolo para la preparación de una muestra del paciente con Leucemia	94
<b>Figura 15.</b> Cariograma por la técnica de bandeo G	97
<b>Figura 16.</b> Cariograma de la técnica de bandeo cromosómico R	98
<b>Figura 17.</b> Cariograma por la técnica de bandeo C	99
<b>Figura 18.</b> Formación del cromosoma Filadelfia por translocación de los cromosomas 9 y 22	104
<b>Figura 19.</b> Protocolo para realizar FISH	111
<b>Figura 20.</b> FISH patrones atípicos de fusión BCR-ABL en interfase, en el paciente con LMC	113
<b>Figura 21.</b> Ilustración esquemática de la sonda de doble fusión BCR-ABL1	114
<b>Figura 22.</b> Ideogramas de hibridación in situ por fluorescencia (FISH)	116
<b>Figura 23.</b> Ilustración de los principales pasos en PCR	125
<b>Figura 24.</b> Ilustración de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa, PCR	127
<b>Figura 25.</b> Conversión de mRNA a cDNA por acción de la transcriptasa reversa	128
<b>Figura 26.</b> Representación esquemática de un ensayo de RT-PCR usando el método de Taqman	134

## Índice de gráficos y tablas

<b>Tabla 1.</b> Oncogenes, funciones y tumores asociados	46
<b>Tabla 2.</b> Protooncogenes y su función biológica	46
<b>Tabla 3.</b> Cuadro clínico de pacientes con leucemias agudas	60
<b>Tabla 4.</b> Cuadro clínico de pacientes con leucemias crónicas	61
<b>Tabla 5.</b> Clasificación morfológica de las leucemias agudas linfoblasticas	65
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de la leucemia linfoblastica aguda de acuerdo con las anomalías genéticas recurrentes	66
<b>Tabla 7.</b> Tasa de morbilidad Hospitalaria por principales tumores malignos de la población de 20 años y más, estadísticas establecidas por el INEGI.	75
<b>Tabla 8.</b> Tasa de morbilidad Hospitalaria por principales tumores malignos de la población menos de 20 años, estadísticas establecidas por el INEGI	77
<b>Tabla 9.</b> Tasa de morbilidad por principales tumores malignos de la población de 20 años y más según sexo, estadísticas establecida por el INEGI	79
<b>Tabla 10.</b> Valores de analitos en una BH para las Leucemias Agudas	84
<b>Tabla 11.</b> Valores de analitos en una BH para las Leucemias Crónicas	86
<b>Tabla 12.</b> Clasificación por grupo de los cromosomas	89
<b>Tabla 13.</b> Pruebas genéticas de diagnóstico a pacientes con leucemia en función del tiempo	101
<b>Tabla 14.</b> Alteraciones citogenéticas y moleculares más comunes en las Leucemias	105
<b>Tabla 15.</b> Clasificación actualizada de LAM con anomalías genéticas recurrente	107
<b>Tabla 16.</b> Lista de paneles y sondas usados en FISH para los tumores hematopoyéticos y linfoides	120
<b>Grafico 1.</b> Rango de edad entre los diferentes subtipos de Leucemia	78
<b>Gráfico 2.</b> Frecuencia en porcentaje de los principales subtipos morfológicos de Leucemia	78

## Índice de diagramas

<b>Diagrama 1.</b> Maduración de las células hematopoyéticas tanto de la serie mieloide como linfoide	50
<b>Diagrama 2.</b> Clasificación general de las leucemias	63
<b>Diagrama 3.</b> Clasificación general de las leucemias agudas mieloblásticas	68
<b>Diagrama 4.</b> Clasificación morfológica de las Leucemias Agudas (FAB)	72

## Abreviaturas

<b>MO</b>	Médula ósea
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de Ciclina
<b>M</b>	Mitosis
<b>ATM</b>	Gen Ataxia Telangiectasia Mutado
<b>ATR</b>	Serina/Treonina gen, Ataxia Telangiectasia
<b>ChK</b>	Serina/treonina quinasa
<b>pRb</b>	Proteína de Retinoblastoma
<b>CTH</b>	Célula Totipotencial Hematopoyética
<b>MAPK</b>	Proteína Mitógena Activada Cinasa
<b>CLL o LLC</b>	Leucemia Linfoblástica Crónica
<b>LAM o LMA</b>	Leucemia Mieloblástica Aguda
<b>LLA o LAL</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LA</b>	Leucemias Agudas
<b>LGC</b>	Leucemia Granulocítica Crónica
<b>FAB</b>	Franco Americana Británica
<b>N/C</b>	Núcleo/Citoplasma
<b>BH</b>	Biometría Hemática
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquídeo
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>PML</b>	Gen de leucemia Promielocítica
<b>CrPh</b>	Cromosoma Filadelfia
<b>MLL</b>	Histona metiltransferasa
<b>uL</b>	Microlitro
<b>TGFb</b>	Factor de crecimiento tumoral beta
<b>TKI</b>	Inhibidor Tirosincinasa
<b>CCA</b>	Alteraciones cromosómicas clonales
<b>BAC</b>	Clones artificiales bacterianos
<b>RCgC</b>	Respuesta Citogenética Completa
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>SP</b>	Sangre Periférica
<b>FdU</b>	Fluorodesoxiuridina
<b>ATRA</b>	Ácido transretinoico
<b>CBA</b>	Bandeo de Cromosomas
<b>MLPA</b>	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples
<b>CMPD</b>	Trastornos Mieloproliferativos Crónicos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>qRT PCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>RCC</b>	Remisión completa del dolor

<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotidos
<b>FISH</b>	Hibridación fluorescente in situ
<b>TPO</b>	Trombopoyetina
<b>PTH</b>	Hormona Paratiroidea
<b>IGF</b>	Factores de crecimiento similares a insulina
<b>CSF</b>	Factor estimulante de colonias
<b>del</b>	Delección
<b>t</b>	Translocación recíproca
<b>q</b>	Brazo largo
<b>p</b>	Brazo corto
<b>inv</b>	Inversión

## RESUMEN

Este trabajo recopila información reciente sobre las técnicas de diagnóstico citogenético y molecular en las Leucemias; mediante el análisis de bibliografía científica para demostrar la importancia de un diagnóstico integral en pacientes con Leucemia y la relación de este en la elección del tratamiento adecuado, además presenta información sobre las alteraciones cromosómicas halladas recientemente en este tipo de pacientes que permitan la actualización de estos temas.

Las leucemias son un grupo de neoplasias hematooncológicas que se caracteriza por un crecimiento autónomo y desmedido de formas inmaduras de leucocitos (blastos) provenientes de una clona maligna, que terminan por volverse la estirpe predominante en la médula ósea, con la consecuente disminución del resto de series hematopoyéticas. La etiología de las leucemias esta principalmente relacionada a las mutaciones genéticas que originan fallas en el ciclo celular y es posible conocerlas de manera puntual a través de las técnicas de diagnóstico citogenético y molecular, mismo que tienen relevancia en el pronóstico y la elección del tratamiento adecuado para los pacientes. El protocolo general para el diagnóstico de la Leucemia incluye biometría hemática, aspirado de medula ósea, tinciones citoquímicas, citogenética clásica, citogenética molecular y biología molecular, en conjunto estas técnicas fortalecen el diagnóstico inicial y el seguimiento del paciente.

La citogenética clásica utiliza técnicas de bandeo cromosómico para el diagnóstico, siendo la técnica de bandeo G la más utilizada en pacientes con Leucemia. La técnica de bandeo G permite teñir ciertas regiones de los cromosomas en metafase, es decir, cuando están condensados. El resultado de la tinción es una coloración oscura en determinadas zonas de cada cromosoma, lo que da un patrón de bandas característico y repetible para cada cromosoma y cada brazo dentro de cada cromosoma. Las bandas surgen de la tinción desigual de las proteínas acompañantes del ácido desoxirribonucleico. De esta forma se hacen evidentes las alteraciones cromosómicas de los pacientes, que pueden ser inversiones, deleciones, translocaciones o duplicaciones.

Por otra parte la hibridación fluorescente in situ (FISH), permite la detección y localización de secuencias específicas de DNA sobre cromosomas y suele ser la más efectiva ya que genera menos falsos positivos y negativos y no requiere células en división. La técnica se

basa en hibridar los cromosomas a una pequeña secuencia de DNA llamado sonda que tiene una molécula fluorescente pegada a ella. La secuencia de la sonda se une a su secuencia correspondiente en el cromosoma, para luego visualizarse a través de un microscopio de fluorescencia. Esta técnica utiliza paneles de sondas específicas de genes para pérdida, ganancia y translocaciones somáticas recurrentes. Lo cual la hace una técnica efectiva para el diagnóstico de Leucemia pues son conocidas algunas sondas específicas para esta patología.

Por último la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han permitido identificar más de 50 translocaciones cromosómicas, muchas de las cuales han demostrado ser específicas para distintos subtipos de leucemias. Una de las técnicas más usadas, es la PCR con transcripción reversa (RT-PCR), mediante la cual a partir de secuencias del RNA mensajero es posible detectar transcritos de fusión, por ejemplo, del gen BCR-ABL e identificar diferentes reordenamientos según el punto de ruptura dentro del gen BCR con una mayor sensibilidad y especificidad que con el estudio citogenético. De este modo, el uso de la técnica de RT-PCR entrega mayor información para el diagnóstico y pronóstico de las leucemias, como también es de gran utilidad en la detección de la enfermedad residual mínima (ERM) durante la remisión clínica.

## 1. Justificación

Se eligió el tema del diagnóstico citogenético y molecular de las leucemias, ya que integra 3 áreas importantes de estudio de la carrera de Bioquímica Diagnóstica y genera un enfoque completo en el diagnóstico de las leucemias, además proporciona datos y bibliografía actualizada que sirven como referencia para futuros estudios hematológicos, citogenéticos y moleculares en el diagnóstico de esta patología, así como información de los hallazgos más recientes de alteraciones cromosómicas encontradas en pacientes con leucemia.

Este trabajo propone que los estudios hematológicos, citogenéticos y moleculares deben formar parte de un diagnóstico integral (no excluyente uno del otro), que genere datos precisos para la clasificación de la leucemia del paciente, su pronóstico y elección del tratamiento adecuado. Esto sólo es posible conociendo y profundizando en las técnicas de diagnóstico citogenético clásico, citogenético molecular y de biología molecular para las leucemias, mismos que se abordan en este trabajo.



## 2. Introducción

La investigación en el área de la genética orientada al estudio de las neoplasias ha permitido importantes avances en el entendimiento del fenómeno de la transformación maligna al descubrir alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y pronóstico de las entidades neoplásicas, y con el conocimiento acerca de los oncogenes, los genes supresores de tumor, y su funcionamiento, ha abierto alentadoras perspectivas para la prevención y el tratamiento del cáncer.<sup>7</sup>

Las leucemias son neoplasias de las células hematopoyéticas que proliferan en la médula ósea y se diseminan a la sangre periférica e incluso a otros tejidos. Estas células muestran defectos de maduración y su acumulación en la médula ósea determina un frenado de la hematopoyesis natural, la que acaban sustituyendo, llegando a ser inmaduros la mayor parte de los elementos sanguíneos.<sup>1</sup>

Las leucemias conforman un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de células endógenas de la médula ósea. La leucemia puede involucrar cualquiera de las células formadoras de la sangre o sus precursores y encontrarse en lesiones metastásicas en todo el organismo, como el cerebro, hígado, bazo y ganglios linfáticos. Si bien cada tipo de leucemia progresa de manera diferente, las células que proliferan de manera no regulada; por lo general reemplazan la médula normal, interfieren por último con la función de la médula normal, pueden invadir otros órganos y si no se tratan terminan por causar la muerte.<sup>9</sup>

Las leucemias se observaron por primera vez en 1845. Las leucemias crónicas fueron las primeras en detallarse, se notaron un aumento del tamaño de los bazo y “sangre blanca” en la autopsia de pacientes que habían fallecido por una enfermedad crónica no descrita de 1 a 2 años de duración. La descripción “sangre blanca” se tradujo con posteridad a la palabra griega *leucemia*. La leucemia aguda se describió cerca de 25 años después, cuando se notó que los pacientes con “sangre blanca” fallecían con rapidez, después de una enfermedad debilitante prolongada. Fue recién en 1877 cuando se desarrolló una técnica de coloración que permitió la evaluación microscópica de los leucocitos y estableció que la “sangre blanca” era consecuencia de cantidades aumentadas de corpúsculos blancos. Después en 1900 se estableció que las leucemias agudas y crónicas involucraban

diferentes tipos de leucocitos. En las leucemias crónicas, la “sangre blanca” está formada por células maduras; las leucemias agudas involucran células inmaduras o blastos.<sup>9</sup>

Desde la década de 1900 las leucemias se estudiaron por microscopía, coloraciones citoquímicas, microscopía electrónica, marcadores inmunes nucleares y de superficie y técnicas citogenéticas. Mediante la subclasificación de reordenamientos y mutaciones génicas específicas y tratamientos específicos para estos cambios, es de esperar que se desarrollen tratamientos más eficaces y curativos para las leucemias agudas y crónicas.<sup>7</sup>

Con relación a las leucemias, las alteraciones citogenéticas pueden corresponder a cambios en el número o estructura cromosómica. Para el estudio de estos cambios es útil tener en cuenta que una clona es una población celular que se deriva de una simple célula progenitora. Se infiere este origen clonal cuando las células tienen la misma o muy similar anormalidad cromosómica. En general, se acepta que exista una clona cuando dos o más células tienen la misma aberración estructural o presentan el mismo cromosoma supernumerario. Cuando la aberración implica pérdida de un cromosoma, este cambio debe estar presente por lo menos en tres metafases.<sup>7</sup>

Es característico encontrar en las células de las leucemias: aumento (hiperploidia) o disminución (hipoploidia) en el número de los cromosomas; células pseudodiploides, que son aquellas que contienen un número cromosómico aparentemente normal pero tienen aberraciones estructurales; rompimiento con fracturas, fragmentos acéntricos, cromosomas diminutos, dicéntricos o en anillo. Uno de los aportes más significativos de la citogenética, lo constituye el haber demostrado alteraciones cromosómicas específicas en las leucemias.<sup>7</sup>

Los avances moleculares y citogenéticos de las leucemias han tenido un papel muy importante en el pronóstico, seguimiento y caracterización de la enfermedad, sin embargo en México el diagnóstico de las Leucemias, así como su clasificación, elección del tratamiento y el seguimiento del padecimiento se fundamentan principalmente en hallazgos clínico-patológicos y pruebas básicas de laboratorio como biometría hemática, inmunofenotipo y aspirado de medula ósea, que son fundamentales en el estudio de estas patologías, sin embargo deben ser complementados con las técnicas citogenéticas y de biología molecular que proporcionan información adicional para la caracterización completa y pronóstico de las Leucemias; es por eso que en este trabajo se profundiza sobre dichas

técnicas y se proporciona información actualizada de ellas, además se propone generar siempre un diagnóstico integral y completo para los pacientes con leucemia.<sup>18, 88</sup>

En este trabajo, además se podrán observar las alteraciones cromosómicas encontradas recientemente. La caracterización molecular y citogenética de las aberraciones cromosómicas que ocurren con frecuencia en pacientes con leucemias presentan análisis moleculares nuevos que permiten el diagnóstico preciso de los subtipos de leucemias, la medición de la respuesta terapéutica y la determinación de la enfermedad residual mínima.<sup>11, 24</sup>

### **3. Objetivo**

Recopilar información reciente sobre las técnicas de diagnóstico citogenético y molecular en las Leucemias; mediante el análisis de bibliografía científica para demostrar la importancia de un diagnóstico integral en pacientes con Leucemia y la relación de este en la elección del tratamiento adecuado, así como presentar información sobre las alteraciones cromosómicas halladas recientemente en este tipo de pacientes que permitan la actualización de estos temas.

## 4. Generalidades

### 4.1 Ciclo celular y su regulación

El control adecuado de la división celular es vital para todos los organismos, en los organismos multicelulares en desarrollo, la replicación de cada célula debe de estar controlada y cronometrada de forma precisa para completar de manera fiel y reproducible el programa de desarrollo de cada individuo. Cada tipo de célula en todos los tejidos debe controlar su replicación precisamente para el desarrollo normal de órganos complejos, como el cerebro o los riñones, por ejemplo. En un adulto normal, las células se dividen solo cuando y donde son necesarias, sin embargo, la pérdida de los controles normales de la replicación celular es el defecto fundamental del cáncer.<sup>61</sup>

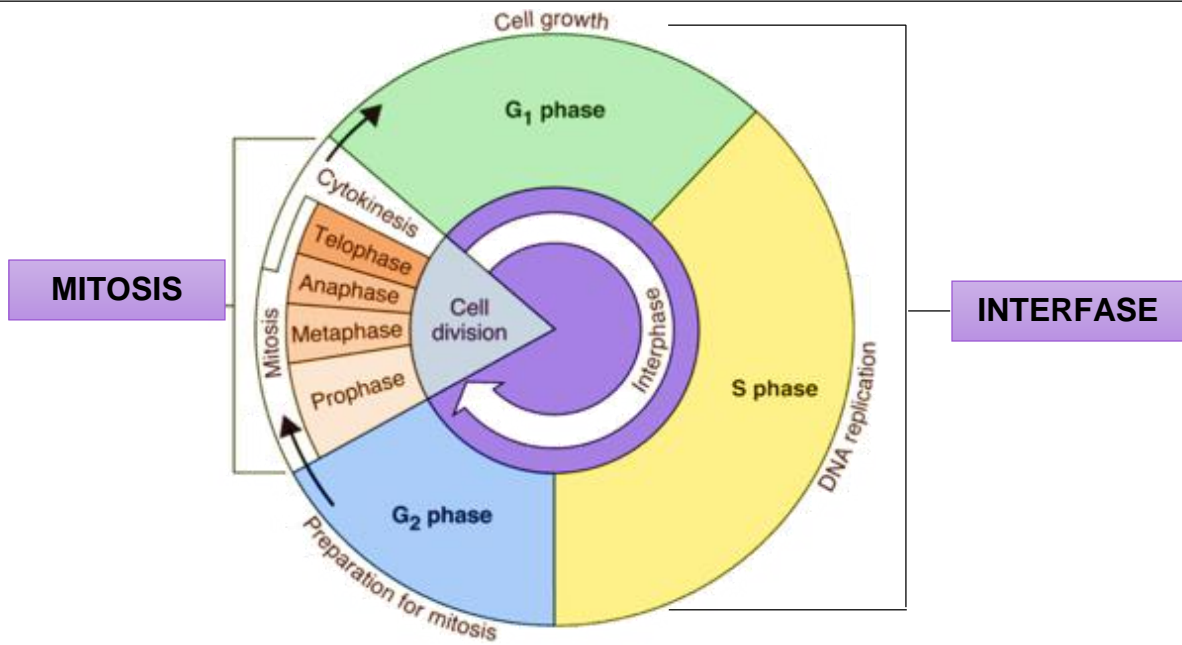
El término del ciclo celular hace referencia a la serie de eventos ordenados que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos de la célula parental. Durante el ciclo celular, ocurren dos procesos moleculares importantes, con intervalos de reposo entre uno y otro: durante la fase S del ciclo cada cromosoma parental se duplica para formar dos cromátidas hermanas idénticas; en la mitosis (fase M), las cromátidas resultantes se distribuyen en cada célula hija. La replicación y segregación de los cromosomas en las células hijas debe ocurrir en el orden adecuado en cada división celular. Se requiere mucha precisión y fidelidad para asegurarse de que la replicación del DNA se lleva a cabo de manera correcta y de que cada célula hija hereda la cantidad correcta de cromosomas. Para lograr esto la división celular está controlada por mecanismos de vigilancia, que previenen el inicio de cada paso de la división celular hasta que se hayan completado los pasos previos de los que depende y se hayan corregido los errores que ocurrieron durante el proceso. Las mutaciones que inactivan o alteran la operación normal de estas vías del punto de control contribuyen a la generación de células cancerosas dado que resultan en reordenamientos cromosómicos y en cantidades de cromosomas anormales, que llevan más mutaciones y cambios en el nivel de expresión genética que causan el crecimiento celular descontrolado.<sup>61</sup>

Los grandes controladores del ciclo celular son un pequeño número de proteincinasas heterodiméricas que contienen una subunidad reguladora (ciclina) y una subunidad catalítica (cinasa dependiente de ciclina o CDK). Regulan las actividades de múltiples

proteínas involucradas en la entrada del ciclo celular, la replicación del DNA y la mitosis al fosforilarlas en sitios de regulación específicos, activando algunas e inhibiendo otras para coordinar sus actividades. La degradación regulada de proteínas también juega un papel esencial en las transiciones importantes del ciclo celular. Dado que la degradación de las proteínas es irreversible, esto asegura que los procesos solo se mueven en una dirección a través del ciclo celular. Además la división celular también es necesaria en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular programada.<sup>61, 69</sup>

Debido a todo lo anterior se dice que el ciclo celular se puede definir como un conjunto de eventos ordenados y regulados que aseguran el crecimiento de una célula y su división en dos células hijas idénticas.

El ciclo celular se divide en cuatro etapas principales, y/o en dos fases generales: interfase y mitosis (figura 1). Las células somáticas de mamífero en el ciclo celular (replicación) crecen en tamaño y sintetizan RNA y proteínas requeridas para la síntesis de DNA durante la **fase G1**. Cuando las células han alcanzado el tamaño apropiado y han sintetizado las proteínas requeridas, entran en el ciclo atravesando un punto en G1, que se conoce como start. Una vez que se ha cruzado este punto, la célula se dedica a la división celular. El primer paso hacia la división celular exitosa es la entrada en la **fase S** (replicación del material genético), el periodo en el cual las células replican activamente sus cromosomas. Después de progresar a una segunda fase de intervalo, la **fase G2**, las células comienzan el complicado procesos de la mitosis, también llamada **fase M** (mitótica), que a su vez está dividida en varias etapas. Entonces se puede decir que la Fase G1 y G2 implican una actividad metabólica para el crecimiento en masa de la célula. Cada cromosoma está compuesto por dos moléculas de DNA idénticas que resultan de la replicación del DNA, más las histonas y otras proteínas asociadas a los cromosomas. Las dos moléculas de DNA idénticas y proteínas asociadas a los cromosomas que forman un cromosoma se llaman cromatidas hermanas, las cuales están unidas unas a otras por entrecruzamiento de proteínas a lo largo de su longitud.<sup>61, 71</sup>



**Figura 1.** Fases del ciclo celular de una célula somática eucariota. Interfase es la etapa previa a la mitosis donde la célula se prepara para dividirse. Mitosis es la fase del ciclo celular que da lugar a la división del núcleo, en la que se conserva intacta la información genética contenida en los cromosomas.<sup>108</sup>

#### 4.1.1 Interfase

En la interfase, la célula se encuentra en estado basal de funcionamiento. Es cuando se lleva a cabo la replicación del ADN y la duplicación de los orgánulos para tener un duplicado de todo antes de dividirse. Es la etapa previa a la mitosis donde la célula se prepara para dividirse, en ésta, los centriolos y la cromatina se duplican, se hacen visibles los cromosomas los cuales se observan dobles. La interfase, también se define como aquel momento de la vida celular en que ésta no se está dividiendo. Tras la replicación tendremos dos juegos de cadenas de ADN, por lo que la mitosis consistirá en separar esas cadenas y llevarlas a las células hijas.<sup>61</sup>

**Fase G<sub>1</sub>.** La fase G<sub>1</sub> es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de RNA. Comprende el periodo que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de DNA. Durante esta fase la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Este es un punto importante de revisión, ya que si las células presentan DNA dañado deben

ser arrestadas en esta fase para que no se sintetice DNA dañado. La carga genética en humanos es diploide.<sup>61, 70</sup>

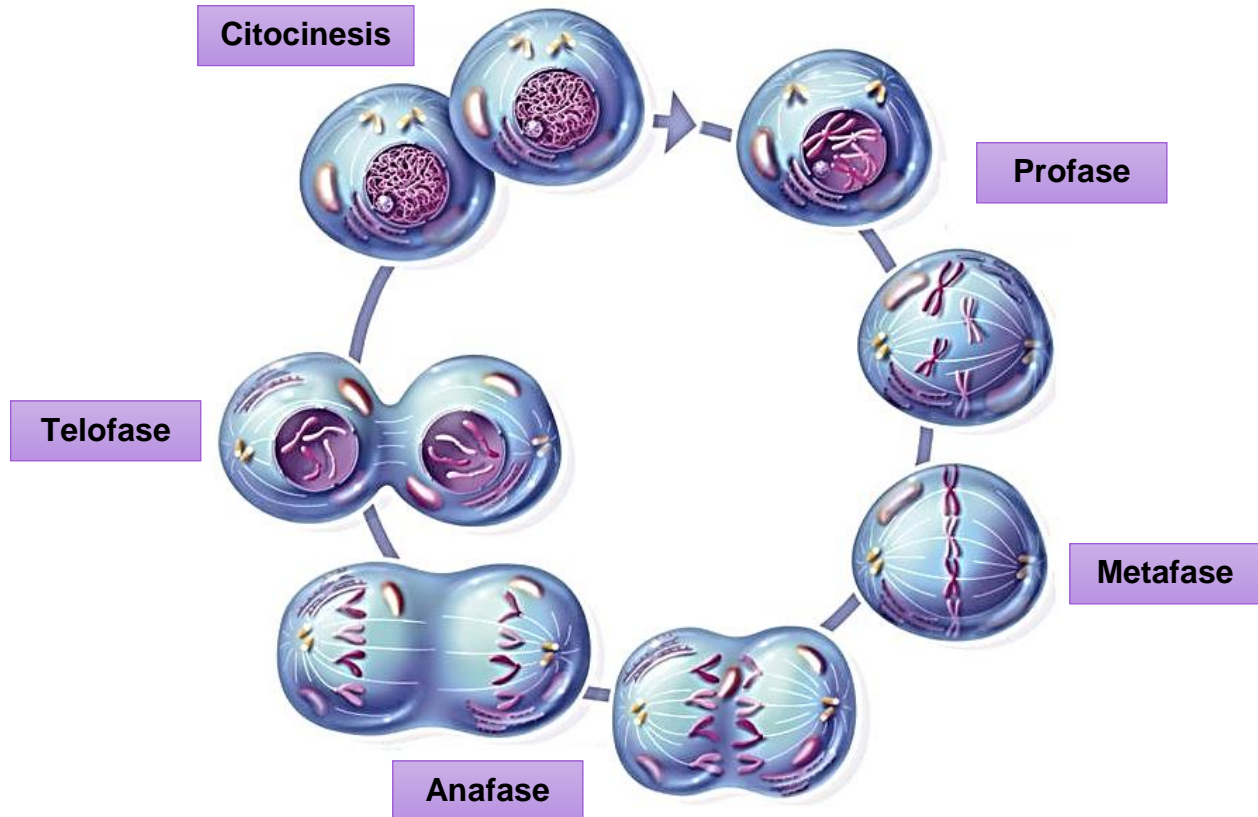
**Fase S.** La fase S (síntesis) es la segunda fase del ciclo celular; en esta se produce la replicación o síntesis del DNA, permitiendo la formación de las cromátidas hermanas. Con la duplicación del DNA, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de DNA que al principio. Esta fase ocupa alrededor de la mitad del tiempo que dura el ciclo celular en una célula de mamífero. La célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas y energía (ATP), se generan dos copias de DNA idénticos, en esta fase la cromatina se encuentra desenrollada en hebras, es decir, dos cadenas de DNA (cromatinas hermanas).<sup>69, 70</sup>

**Fase G2.** Durante la fase G2 ocurre la preparación para la mitosis en la cual se producirá repartición equitativa del material genético; todos los organelos y la maquinaria necesaria esencial para la división de la célula progenitora en dos células hijas idénticas en contenido, aunque de menor tamaño, se adquieren en esta etapa. La cromatina recién duplicada, que está dispersa en el núcleo en forma de cordones filamentosos, comienza a enroscarse lentamente y a condensarse en una forma compacta llamada cromosoma; además, la célula realiza una confirmación completa del DNA duplicado anteriormente. Durante este periodo la célula empieza a ensamblar las estructuras especiales requeridas para asignar un conjunto completo y equitativo de cromosomas a cada célula hija lo cual se desarrollará durante la mitosis.<sup>69</sup>

#### 4.1.2 Mitosis

**La fase M.** Es la división celular en la que una célula progenitora se divide en dos células idénticas. Esta fase se subdivide **en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (figura 2)**. El punto conocido como G2/M ocurre antes de la división celular. En este punto se debe evitar el inicio de la mitosis, cuando el DNA ha sufrido algún daño previo durante G1, S o en G2.<sup>70</sup>

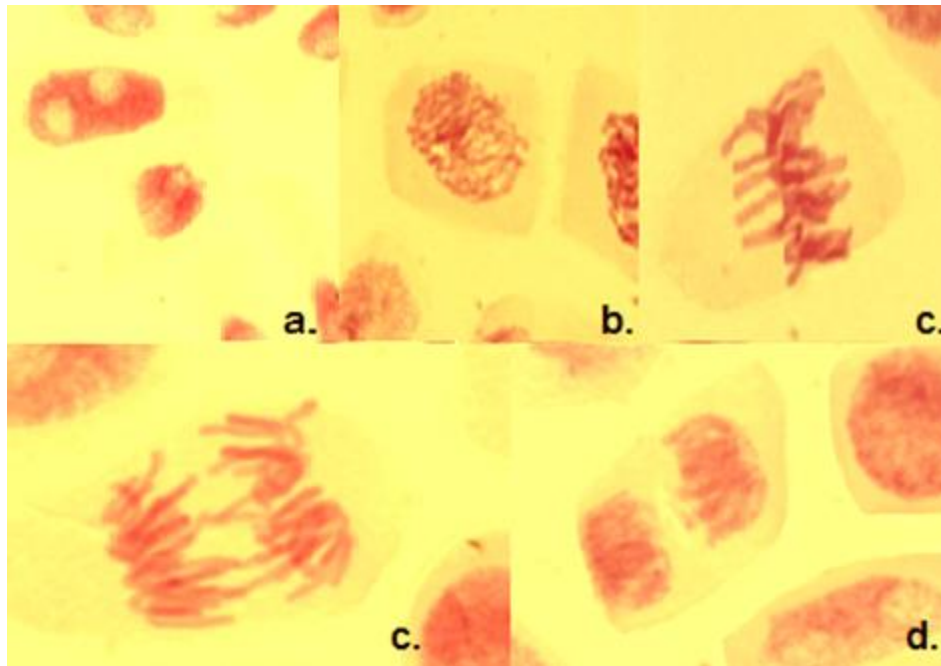




**Figura 2.** Fase M (mitosis) del ciclo celular. División del núcleo en dos núcleos hijos (cariocinesis) y división del citoplasma (citocinesis). Este tipo de división ocurre en las células somáticas.<sup>61</sup>

- Profase.** Al final del período G<sub>2</sub>, empieza la mitosis, y la cromatina sufre una progresiva condensación debido al superempaquetamiento y superenrollamiento de los cromosomas. Esto es el principio de la profase mitótica. Según avanza la profase, los cromosomas van individualizándose y van apareciendo como estructuras perfectamente diferenciadas dentro del núcleo celular. El proceso es más sencillo si todo está condensado, individualizado, y las dos partes a separar (en este caso las cromátidas) perfectamente diferenciadas. Mientras los cromosomas continúan condensándose y haciéndose visible su estructura de dos cromátidas, en el citoplasma y más concretamente en dos polos opuestos del mismo, se van organizando unos centros emisores de microtúbulos. El nucleolo desaparece y la membrana nuclear se rompe y disgrega. De esta forma esos microtúbulos pueden entrar en contacto con las regiones centroméricas de los cromosomas y unirse a los cinetocoros. Este haz de microtúbulos es lo que se denomina huso mitótico.<sup>72</sup>

- **Metafase.** Cada uno de los cinetocoros de cada cromatide empieza a captar estos microtúbulos, como consecuencia de ello el cromosoma se mueve por el citoplasma en movimientos de polarización u orientación (cada cromatidio se orienta hacia un polo celular) y de congresión: cada cinetocoro capta micrtúbulos de un polo, su hermano del polo contrario, por fuerzas de tensión el cromosoma se mueve hacia uno u otro polo, cuando el número de microtúbulos captado por cada cinetocoro hermano es aproximadamente igual, las fuerzas de tensión se equilibran y el cromosoma tiende a quedarse en el centro de la célula, al ocurrir este fenómeno en todos los cromosomas, decimos que se produce una congresión de los cromosomas en el centro de la célula, en la zona del ecuador de la misma. Esta agrupación de todos los cromosmas en la placa ecuatorial de la célula es lo que denominamos metafase, los cromosomas además de estar en el centro, están orientados anfitéricamente, esto es, las dos cromatides orientados hacia polos opuestos de la célula.<sup>72</sup>
- **Anafase.** Cuando todos los cromosomas están dispuestos en la placa ecuatorial, se produce una nueva señal en la célula, que produce que cada cinetocoro hermano sea arrastrado hacia un polo distinto de la célula. Esta separación de cinetocoros conlleva la separación de las cromatides hermanos, con lo cual el cromosoma se escinde en sus dos cromatides y cada uno de ellos migra hacia un polo celular distinto. Como cada cromatide es genéticamente igual a su hermano a cada polo celular se dirige una idéntica información genética.<sup>72</sup>
- **Telofase.** Se tienen dos núcleos opuestos e idénticos. La cromatina empieza a descondensarse, el nucleolo y la membrana nuclear vuelven a reconstruirse, se forman dos núcleos hijos.<sup>72</sup>



**Figura 3.** Mitosis de una célula eucariota por etapas, vista con microscopía de contraste. a.) Célula eucariota en Interfase. b.) Célula en Profase los cromosomas van individualizándose y van apareciendo como estructuras perfectamente diferenciadas dentro del núcleo celular., c.) Célula en Metafase cuando todos los cromosomas están dispuestos en la placa ecuatorial, d.) Célula en Anafase separación de cinetocoros que conlleva la separación de los cromatides hermanos, e.) Célula en Telofase se forman dos núcleos hijos.<sup>72</sup>

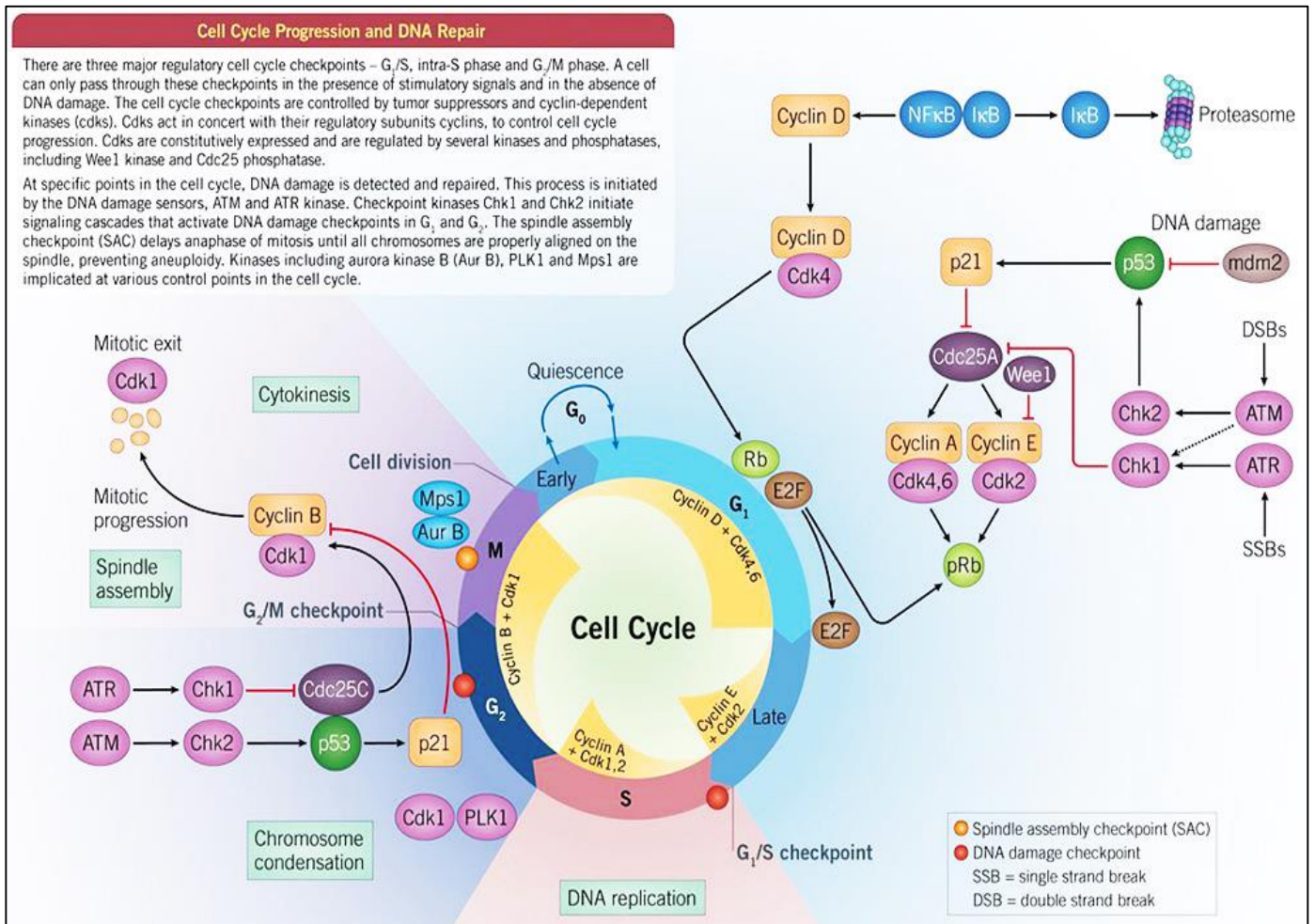
Como ocurre en muchos otros procesos celulares para que el ciclo celular se ponga en marcha es necesaria la presencia de un estímulo que la célula sea capaz de interpretar a través de sus receptores para así poder encender la maquinaria molecular del ciclo. A este proceso se le conoce como transducción de señales y es mediado por complejos proteicos de funciones específicas denominados transducisomas. Aquellas proteínas que constituyen el estímulo o señal extracelular que le indica a una célula que entre en proliferación, se conocen como factores de crecimiento. Estos factores (llamados también citocinas) son producidos naturalmente por el organismo y en ocasiones su actividad no solo se limita a inducir la proliferación sino también la diferenciación celular. Una vez que el ligando (factor de crecimiento) se une a su receptor de membrana le produce a este un cambio conformacional que se traduce comúnmente en una actividad enzimática sobre otras proteínas que forman parte de la vía de señalización en la célula (acopladores, amplificadores, etc.). En las vías de señalización para factores de crecimiento se ha encontrado que las reacciones predominantes son las fosforilaciones.<sup>71</sup>

La progresión del ciclo celular es activada directamente por una serie de heterodímeros formados por las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina (CDKs). La decisión de una célula para entrar en fase S, por ejemplo, está estrechamente controlada por el complejo ciclina D/CDK4/6 y los complejos ciclina E/CDK2, seguido del complejo ciclina A/CDK2 a lo largo de la fase S.<sup>70</sup>

Las concentraciones de las subunidades catalíticas, la cinasas dependientes de ciclina (CDK), son constantes a través de todo el ciclo celular. Sin embargo, no tienen actividad cinasa a menos que estén asociadas con una subunidad reguladora de ciclina. Cada CDK puede asociarse con un pequeño número de diferentes ciclinas que determinan la especificidad del sustrato del complejo, es decir, que proteínas fosforila. Cada ciclina solo está presente y activa durante la etapa del ciclo celular que promueve y, por lo tanto, restringe la actividad cinasa de la CDK que une a esa etapa únicamente. Los complejos ciclina-CDK activan o inhiben cientos de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular al fosforilarlas a sitios reguladores específicos. Así, la progresión adecuada a lo largo del ciclo celular esa gobernada por la activación de los complejos de ciclina-CDK apropiados en el momento adecuado. El objetivo de cada división celular es generar dos células hijas de composición genética idéntica. Para lograr esto, los eventos del ciclo celular deben ocurrir en el orden adecuado. La replicación del DNA siempre debe ocurrir antes de la segregación de los cromosomas. La actividad de las proteínas clave que promueven la progresión del ciclo celular, las CDK cambian durante el ciclo celular. Por ejemplo, la CDK que promueven la Fase S están activas durante la Fase S, pero inactivas durante la Mitosis. La CDK que promueven la mitosis solo están activas durante la mitosis. Estos cambios en la actividad de las CDK son un aspecto fundamental del control del ciclo celular en los eucariontes. Los cambios se generan por mecanismos de retroalimentación positivos, en los que CDK específicas promueven su propia activación. Estos bucles de retroalimentación positivos están acoplados con mecanismos de retroalimentación negativos subsiguientes en los que, indirectamente o con un retraso programado, las CDK promueven su propia inactivación.<sup>61</sup>

En resumen el ciclo celular es la secuencia de eventos que se producen cuando se estimula una célula para crecer y dividirse. Inicia con células en reposo (fase G0), las cuales tienen que ser estimuladas por factores de crecimiento con el fin de entrar en el ciclo celular, lo que comienza con el primer período de crecimiento (fase G1) en el que se prepara para un período de síntesis de DNA (fase S). Hacia el final de G1, hay un punto de restricción (R),

en que se repara el DNA en caso de estar dañado. De no ser así, sigue adelante el ciclo. Una vez que se han duplicado sus cromosomas, la célula entra a un segundo período de crecimiento (fase G<sub>2</sub>), cuando se prepara para dividirse en dos células hijas durante el período de la mitosis (fase M). Esta fase M se divide en una serie de pasos discretos que comienzan con la profase y luego pasan a través de la metafase, anafase, telofase y, finalmente, el proceso de la citocinesis, que divide la célula en dos iguales.<sup>70</sup>



**Figura 4.** Progresión del ciclo celular y su regulación. En puntos específicos en el ciclo celular, el daño del DNA se detecta y repara. El proceso es iniciado por los sensores de daño de DNA, ATM y ATR kinasa. Las quinasas de punto de control Chk1 y Chk2 inician cascadas de señalización que activan los puntos de control de daño al DNA en G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. El punto de control del ensamblaje del eje (SAC) retrasa la anafase de la mitosis hasta que todos los cromosomas estén correctamente alineados en el eje, evitando la aneuploidía. Las quinasas incluyendo aurora quinasa B (Aur B), PLK1 y Mps1 están implicadas en varios puntos de control en el ciclo celular.<sup>114</sup>

## 4.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad conocida desde la antigüedad, pero que ha comenzado a tener importancia a partir del siglo XX debido a la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona. El cáncer es la única enfermedad crónica curable en el 50% de los casos, si es diagnosticado a tiempo.<sup>32</sup>

El diagnóstico de cáncer es determinado por el estudio que el patólogo realiza de las muestras del tumor provenientes de la cirugía o de una biopsia. El grado y otros factores pronósticos celulares permanecen desconocidos hasta el diagnóstico anatomopatológico, clínico y molecular. La clasificación del cáncer está determinado por el órgano donde se origina, el tipo de célula del que deriva, así como del aspecto de las células tumorales. La metástasis es del mismo estirpe celular que el del tumor primario.<sup>33</sup>

Atendiendo al origen de las células cancerosas existen 5 tipos principales de cáncer:

- a. Carcinomas: derivados de las células que recubren la superficie interna o externa de los órganos (tejido epitelial). Se incluyen en los carcinomas: adenocarcinomas los derivados de células de origen glandular.<sup>33</sup>
- b. Sarcomas: derivados del tejido conectivo: huesos, tendones, cartílago, vasos, grasa y músculo.<sup>33</sup>
- c. Linfomas: originados en los ganglios linfáticos, lugar de maduración del sistema inmune.<sup>33</sup>
- d. Leucemias: originadas en las células de la médula ósea que producen las células sanguíneas.<sup>33</sup>
- e. Mieloma: Se presenta en las células plasmáticas de la médula ósea.<sup>33</sup>

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular. El cáncer se debe a fallas de los mecanismos que por lo general controlan el crecimiento y la proliferación de las células. Durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, sistemas de control genético regulan el equilibrio entre el nacimiento y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento. El cáncer ocurre cuando los mecanismos que mantienen estas tasas de crecimiento normal funcionan mal y causan división celular en exceso.<sup>54, 61</sup>

Las principal diferencia entre el cáncer en niños y adolescentes y el que se presenta en la edad adulta, es que se estima que aproximadamente 80% de los casos en adultos son prevenibles (OPS, 2015) y, aproximadamente 30% de las defunciones por esta enfermedad se deben a cinco factores de riesgo relacionados con estilos de vida y de alimentación: elevado índice de masa corporal, falta de actividad física, bajo consumo de frutas y verduras, tabaquismo y alcoholismo. Infecciones como el virus del papiloma humano, hepatitis B y C, también son precursoras de lesiones celulares que pueden desencadenar la formación de tumores malignos (WHO, 2017). Existen otros factores que no están relacionados al estilo de vida y que son capaces de generar un daño en el DNA y que contribuyen al desarrollo del cáncer, como: algunos químicos (exposición a benceno, por ejemplo), radiaciones ionizantes, fármacos, susceptibilidad genética (como pacientes con Síndrome de Down) o simplemente una mutación somática. Además con la edad es más factible que se presenten alteraciones en los mecanismos celulares que, en combinación con otros factores, den lugar al desarrollo de la enfermedad.<sup>35, 59</sup>






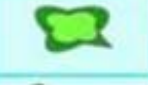







Un factor de riesgo es cualquier factor que aumenta la posibilidad de que una persona desarrolle cáncer. Si bien los factores de riesgo pueden influir en el desarrollo del cáncer, la mayoría no son una causa directa de esta enfermedad. Algunas personas que tienen varios factores de riesgo nunca desarrollan cáncer, mientras que sí lo hacen otras personas sin factores de riesgo conocidos. Sin embargo, el hecho de conocer los factores de riesgo puede ayudar a tomar decisiones fundamentadas sobre el estilo de vida y el cuidado de la salud.<sup>59</sup>

Las pérdidas en la regulación celular que originan la mayoría o todos los casos de cáncer se deben a daño genético, a menudo acompañado por influencias de los factores de riesgo antes mencionados. Todavía se estudian cómo es que estos diferentes factores pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos.<sup>59, 60</sup>

#### **4.2.1 Definición de Cáncer**

La palabra cáncer se utiliza para nombrar a un grupo de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas y división más allá de los límites normales; con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado. La célula cancerosa “olvida” la capacidad para morir y se divide casi sin límite, estas células llegan a formar unas masas, que en su expansión destruyen y sustituyen a los tejidos normales,

dando lugar a tumores sólidos o enfermedades hematológicas y/o linfáticas en función de los tejidos afectados.<sup>29</sup>

Normal	Cáncer	
		Grandes cantidades de células de forma irregular dividiéndose
		Núcleos grandes de forma variable
		Volumen citoplasmático pequeño en relación a los núcleos
		Variación en el tamaño y forma de las células
		Pérdida de las características de células especializadas normales
		Arreglo desorganizado de células
		Límites del tumor deficientemente definidos

**Figura 5.** Comparación de características morfológicas de células normales y cancerosas en las primeras etapas de la enfermedad.<sup>107</sup>

El cáncer puede considerarse como una enfermedad genética porque puede rastrearse hasta alteraciones dentro de genes específicos, pero en la mayor parte de los casos no es hereditario. En una enfermedad hereditaria, el defecto genético se halla en los cromosomas de uno de los padres y se transmite al cigoto. En cambio, las alteraciones genéticas que conducen a la mayoría de los cánceres surgen en el DNA de una célula somática durante la vida del individuo afectado. A causa de estos cambios genéticos, en las células cancerosas se liberan muchas de las restricciones a las que se encuentran sujetas las células sanas. Las células sanas no se dividen a menos que sean estimuladas para hacerlo a través de la maquinaria homeostática del cuerpo; tampoco sobreviven cuando incurren en un daño irreparable; ni se separan de un tejido para empezar colonias nuevas en otro sitio del cuerpo. Por el contrario, en la mayor parte de las células cancerosas se descomponen estas influencias reguladoras que protegen al cuerpo del caos y la autodestrucción. Lo que es más importante, proliferan de manera incontrolable y producen tumores malignos que invaden el tejido sano circundante. Mientras el crecimiento del tumor

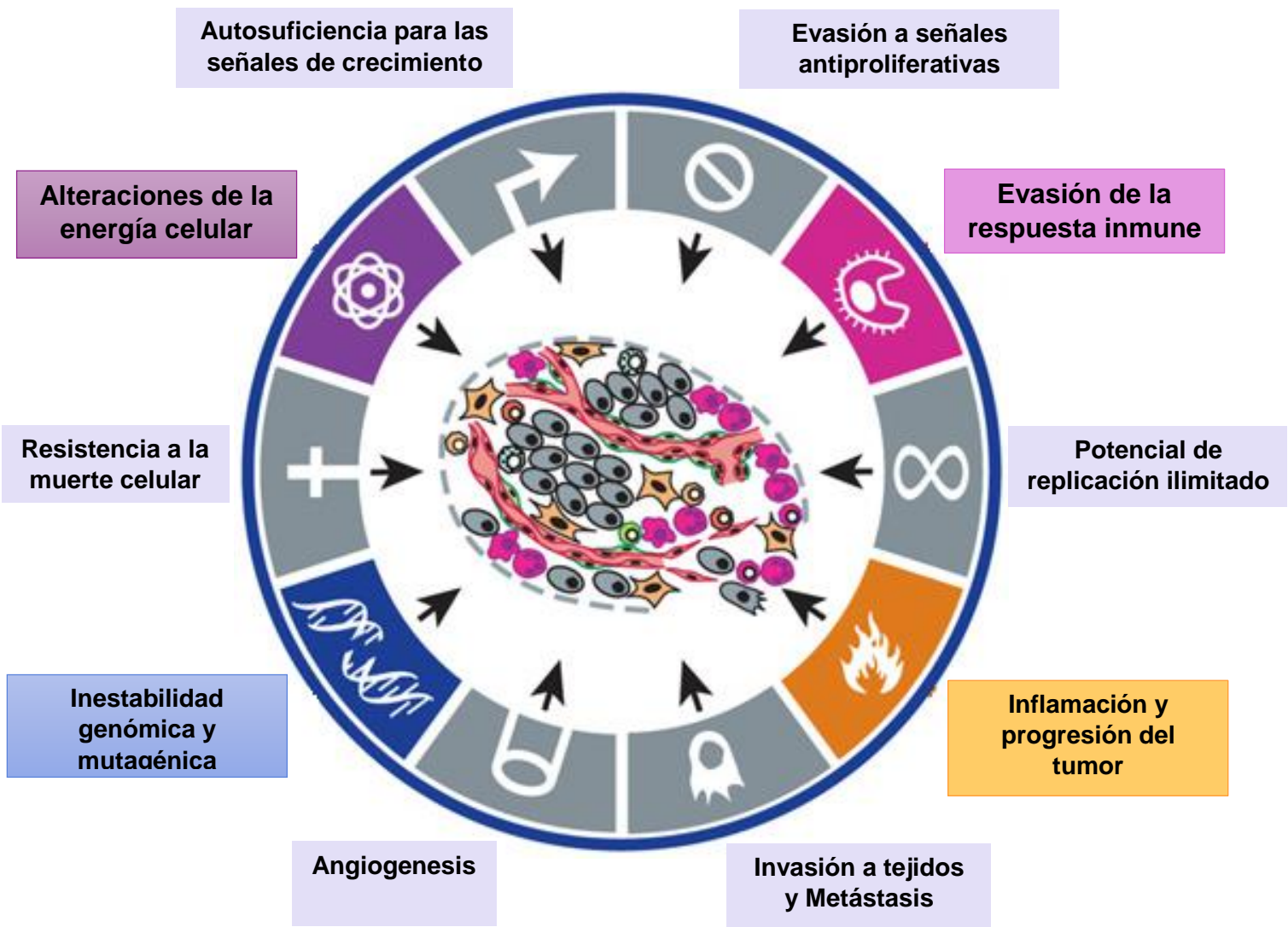


permanezca localizado, la enfermedad casi siempre puede tratarse y curarse mediante la extirpación quirúrgica de la neoplasia. Sin embargo, los tumores malignos son propensos a metástasis, es decir, a diseminar células apóstatas que se separan de la masa original, ingresan a la circulación linfática o sanguínea y se extienden a sitios distantes del cuerpo, donde establecen tumores secundarios letales (metástasis) que ya no son susceptibles a extirpación quirúrgica.<sup>28</sup>

Los tumores o 'neoplasias' son proliferaciones anormales de los 'tejidos' que se inician de manera aparentemente espontánea, de crecimiento progresivo, sin capacidad de llegar a un límite definido. Las tres características principales de los tumores son: Forman una masa anormal de células; poseen crecimiento independiente, excesivo y sin control y tienen la capacidad de sobrevivir incluso después de desaparecer la causa que lo provocó. En las neoplasias es muy importante tener en cuenta que se pierden las capacidades de respuesta a los controles normales del crecimiento, ya que las células tumorales continúan proliferando de forma indiferente e independiente de ellos. Los tumores cancerígenos son un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen.<sup>60</sup>

#### **4.2.2 Características del Cáncer**

Hanahan y Weinberg en 2011 definieron las características distintivas del cáncer como capacidades funcionales que permiten a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse a otros tejidos; estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumor a través de distintos mecanismos y en diversas etapas de la tumorigénesis. La adquisición de ellas por parte de una célula es posible gracias a dos características principalmente. La más destacada es el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células cancerosas, la cual genera mutaciones aleatorias incluyendo reordenamientos cromosómicos; entre estos, son los extraños cambios genéticos que pueden generar estas características especiales. Una segunda característica involucra el estado inflamatorio de la enfermedad premaligna y algunas lesiones que son impulsadas por las células del sistema inmunológico, algunos de los cuales sirven para promover la progresión tumoral a través de diversos medios.<sup>110</sup>



**Figura 6.** Características distintivas en la célula cancerosa.<sup>110</sup>

Hanahan y Weinberg han propuesto una lista de 10 marcas distintivas del cáncer, como ellos lo describen en sus artículos, estas son: proliferación descontrolada, evasión a las señales de crecimiento, un potencial de replicación limitado, resistencia a la muerte celular, angiogénesis, invasión a tejidos y metástasis y las descritas más recientemente; alteraciones de la energía celular, evasión de la respuesta inmune, inflamación y progresión del tumor e inestabilidad genómica y mutagénica (Imagen 5). Muchas evidencias indican que la tumorigénesis en humanos es un proceso que se debe a varios procesos y que estos

reflejan inestabilidad genética que conducen a la transformación progresiva de las células normales en potencialmente malignas.<sup>110, 109</sup>

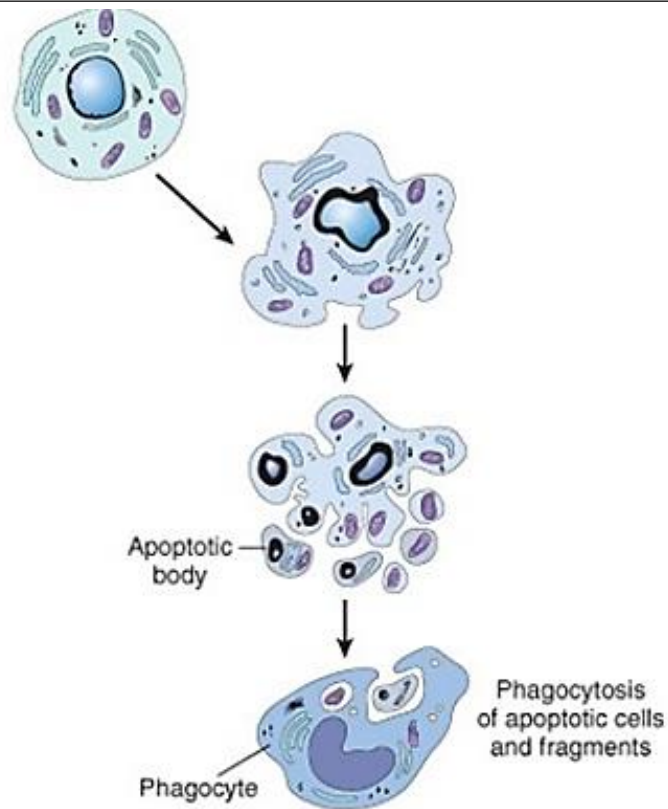
A continuación se describirán brevemente cada una de las características especiales de las células cancerosas propuestas por Hanahan y Weinberg:

**Autosuficiencia para las señales de crecimiento:** La célula normal necesita señales de crecimiento antes de pasar a su estado proliferativo, estas señales son transmitidas por receptores transmembranales de la célula y una célula normal no puede proliferar sin estas señales sin embargo muchos de los oncogenes actúan imitando estas señales de crecimiento, es decir, la células tumorales producen sus propias señales de crecimiento reduciendo su dependencia al microambiente en el tejido. Esta liberación de la dependencia de las señales derivadas exogenamente interrumpe un mecanismo homeostático de importancia crítica que normalmente opera para asegurar un comportamiento adecuado de los diversos tipos de células dentro de un tejido. Los mecanismos más complejos de autonomía adquirida derivan de alteraciones en componentes del circuito citoplasmático que recibe y procesa las señales emitidas por receptores e integrinas ligandos-activados.<sup>109</sup>

**Evasión a señales antiproliferativas:** Las células cancerosas incipientes deben evadir señales antiproliferativas si quieren prosperar. Gran parte de los circuitos que permiten que las células normales respondan a las señales de crecimiento se asocia con el reloj del ciclo celular, específicamente los componentes que gobiernan el tránsito de la célula a través de la fase G1 de su ciclo de crecimiento. Las células monitorean su ambiente externo durante este período y, sobre la base de señales detectadas, deciden si proliferan, permanecen inactivos o entran en un estado postmitótico. A nivel molecular, muchas y quizás todas las señales antiproliferativas se canalizan a través de la proteína retinoblastoma (pRb) y sus dos familias, p107 y p130. Cuando en un estado hipofosforilado, pRb bloquea la proliferación secuestrando y alterando la función de los factores de transcripción E2F que controlan la expresión de los bancos de genes esenciales para la progresión de G1 en fase S. La interrupción de la vía pRb libera E2Fs y permite así la proliferación celular, haciendo que las células sean insensibles a los factores de crecimiento que normalmente operan a lo largo de esta vía para bloquear el avance a través de la fase G1 del ciclo celular. El circuito de señalización de pRb, se rige por TGF $\beta$  y otros factores extrínsecos, y puede ser interrumpido de una variedad de maneras en diferentes tipos de tumores humanos.<sup>109</sup>

**Resistencia a la muerte celular:** El concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer ha sido establecida por estudios funcionales convincentes. La maquinaria apoptótica está compuesta por reguladores que a su vez, se dividen en dos grandes circuitos, uno que recibe y procesa la muerte extracelular que induce señales (la vía extrínseca, que implica, por ejemplo, el ligando Fas / receptor Fas), y la otra detección e integración de variedad de señales de origen intracelular (vía intrínseca). Cada uno culmina en la activación de una fase latente de proteasa (caspasas 8 y 9, respectivamente), que procede a iniciar una cascada de proteólisis que implica caspasas efectoras responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, en la que la célula se desmonta progresivamente y luego se consume y también por células fagocíticas profesionales. Actualmente, el programa apoptótico intrínseco está más ampliamente implicado como una barrera para la patogénesis del cáncer.<sup>110</sup>

Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o eludir apoptosis. Más común es la pérdida de TP53 supresor de tumores, que elimina este sensor crítico de daños de la vía de apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares al aumentar la expresión de los reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia, mediante la regulación negativa factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma), o por cortocircuitos la vía de muerte inducida por el ligando extrínseco. La célula cancerosa encuentra diversas formas de evadir la apoptosis durante su evolución al estado maligno.<sup>110</sup>

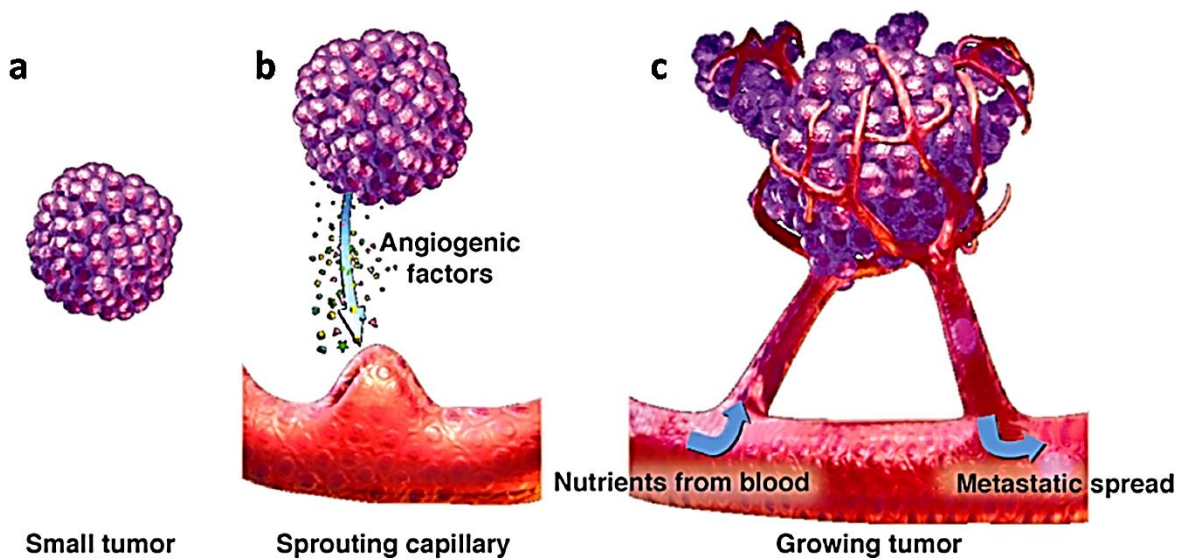


**Figura 7.** Ilustración de una célula normal a través del proceso de apoptosis.<sup>127</sup>

**Potencial de replicación ilimitado:** Los primeros trabajos de Hayflick demostraron que las células en cultivo tienen un potencial replicativo finito. Una vez que estas poblaciones de células han progresado a través de un cierto número de duplicaciones, dejan de crecer, un proceso denominado senescencia. La senescencia de fibroblastos humanos cultivados puede ser eludida por la desactivación de sus proteínas supresoras de tumores pRb y p53, permitiendo que estas células sigan multiplicándose por generaciones adicionales hasta que entran en un segundo estado denominado crisis. El estado de crisis se caracteriza por la muerte celular, el desorden cariotípico asociado con la fusión de extremo a extremo de los cromosomas y la aparición ocasional de una célula variante que ha adquirido la capacidad de multiplicarse sin límite, es el rasgo denominado inmortalización.<sup>109</sup>

**Angiogénesis:** Una vez que se forma un tejido, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos -el proceso de angiogénesis- es transitorio y cuidadosamente regulado. Debido a esta dependencia de los capilares cercanos, parece plausible que las células proliferantes dentro de un tejido tendrían una capacidad intrínseca de estimular el crecimiento de los vasos

sanguíneos. Pero la evidencia es otra. Las células dentro de lesiones proliferativas aberrantes inicialmente carecen de capacidad angiogénica, restringiendo su capacidad de expansión. Para progresar a un tamaño mayor, las neoplasias incipientes deben desarrollar capacidad angiogénica. La capacidad de inducir y sostener la angiogénesis parece ser adquirida en un paso discreto (o etapas) durante el tumor, el desarrollo a través de un "interruptor angiogénico" de la quiescencia vascular. Cuando se analizaron tres modelos de ratones transgénicos a lo largo de la tumorigénesis en múltiples etapas, en cada caso se encontró que la angiogénesis se activaba en lesiones de etapa media, antes de la aparición de tumores avanzados. De manera similar, la angiogénesis puede discernirse en lesiones premalignas del cuello uterino humano, mama y piel.<sup>109</sup>



**Figura 8.** Expansión tumoral inducida por la angiogénesis. A. Tumor pequeño. B. Brotes capilares. C. Tumor creciente.<sup>128</sup>

**Invasión a otros tejidos y metástasis:** El proceso de múltiples etapas de invasión y metástasis ha sido esquematizado como una secuencia de pasos discretos, a menudo denominados cascada de invasión-metástasis. Esta descripción prevé una sucesión de cambios biológicos en las células, comenzando con la invasión local, luego la células cancerosas en vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfático y hemáticos, seguido por el escape de las células cancerosas de la luz de los vasos en tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y finalmente el crecimiento de

las lesiones micrometastásicas tumores macroscópicos, este último paso se denomina "colonización".<sup>110</sup>

**Inestabilidad genómica:** La extraordinaria capacidad de los sistemas de mantenimiento de detección y resolución de defectos en el DNA asegura que las tasas de la mutación espontánea suele ser muy baja en cada célula. Esta mutabilidad se logra mediante una mayor sensibilidad a agentes mutagénicos, a través de una avería en uno o varios componentes de la maquinaria de mantenimiento genómico, o ambos. Además, la acumulación de mutaciones puede acelerarse comprometiendo los sistemas de vigilancia que normalmente aseguran la integridad genómica y obligan a las células genéticamente dañadas a senescencia o apoptosis. El papel de TP53 es central aquí, llevándolo a ser llamado el "guardián del genoma" (Lane, 1992). Una diversidad de defectos que afectan a varios componentes de la Maquinaria de mantenimiento del DNA a menudo denominados los "cuidadores" del genoma, han sido documentadas. El catálogo de defectos en estos "genes cuidadores" incluye aquellos cuyos productos están involucrados en (1) detectar daño del DNA y activación de la maquinaria de reparación, (2) reparar directamente el DNA dañado, y (3) inactivar o interceptar moléculas mutágenas antes de que hayan dañado el DNA. Desde una perspectiva genética, estos genes cuidadores se comportan mucho como los genes supresores de tumores, que sus funciones pueden perderse durante el curso de la progresión tumoral, las pérdidas se logran ya sea mediante la inactivación de mutaciones o a través de la represión epigenética.<sup>110</sup>

**Alteraciones energéticas:** La proliferación celular crónica y a menudo incontrolada, que representa la esencia de las enfermedades neoplásicas no sólo incluye el control irregular de la proliferación celular, pero también los ajustes del metabolismo energético con el fin de impulsar el crecimiento celular y su división. Bajo condiciones aerobias, las células normales procesan glucosa, primero a piruvato a través de la glicólisis en el citosol y posteriormente a dióxido de carbono en las mitocondrias; bajo condiciones anaerobiaa, la glucólisis es favorecida y relativamente poco piruvato es enviado a las mitocondrias que consumen oxígeno. Otón Warburg observó por primera vez una característica anómala del metabolismo energético de la célula cancerígena. Incluso en la presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa y, por lo tanto, su producción, limitando en gran parte su metabolismo energético a la glucólisis, un estado que se ha denominado "glicolisis aeróbica". Tal reprogramación del metabolismo energético es aparentemente contraintuitiva, ya que las células del cáncer deben compensar la

eficiencia 18 veces menor de producción de ATP producida por la glicólisis relativa a la producción mitocondrial fosforilación oxidativa. Lo hacen en parte mediante la transportadores de glucosa, especialmente GLUT1, que aumenta la importación de glucosa en el citoplasma. De hecho, el aumento marcado de la captación y utilización de glucosa han sido documentados en muchos tipos de tumores humanos fácilmente, mediante la visualización no invasiva de la captación de glucosa utilizando tomografía por emisión positrones (PET) con un radiomarcado análogo de glucosa (18F-fluorodesoxiglucosa, FDG) como reportero.<sup>110</sup>

Curiosamente, se ha encontrado que algunos tumores contienen dos subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus vías de generación de energía. Una subpoblación glucosa-dependiente consiste en ("Efecto Warburg") que secretan lactato, mientras que las células de la segunda subpoblación importan y utilizan preferentemente el lactato producido por sus vecinos como su principal fuente de energía, empleando parte del ciclo del ácido cítrico para hacerlo. Estas dos poblaciones evidentemente funcionan simbióticamente: las células cancerosas hipóxicas dependen de la glucosa para su combustible y secretar el lactato como residuo, que es importado y preferentemente utilizado como combustible por sus vecinos mejor oxigenados. Aunque este modo provocativo de simbiosis intratumoral aún no se ha generalizado, la cooperación entre las células que utilizan lactato para alimentar el crecimiento del tumor es de hecho no una invención de tumores sino que refleja de nuevo la coadaptación de un mecanismo fisiológico normal, en este caso uno que opera en el músculo. Además, se hace evidente que la oxigenación, desde la normoxia hasta la hipoxia, no es necesariamente estática en tumores, sino que fluctúa temporal y regionalmente, probablemente como resultado de la inestabilidad y la organización caótica de la neovasculatura asociada al tumor. El metabolismo alterado de la energía ha sido demostrando ser común en las células cancerosas como muchos de los otros rasgos asociados al cáncer que han sido aceptados como signos distintivos del cáncer.<sup>110</sup>

**Evasión de la respuesta inmune:** Los tumores sólidos que de alguna manera han logrado evitar la detección por los diversos mecanismos del sistema inmune o han sido capaces de limitar el alcance de la matanza inmunológica, ha evadido la erradicación. El papel deficiente de la monitorización inmunológica de los tumores parece ser validada por los sorprendentes incrementos de cáncer en individuos inmunocomprometidos. Sin embargo, en la gran mayoría de estos los cánceres son inducidos por virus, sugiriendo que gran parte del esta clase de cánceres normalmente depende de la reducción de la carga viral en



personas infectadas, en parte mediante la eliminación de las células infectadas por virus. Estas observaciones, por lo tanto, parecen arrojar poca luz sobre el posible papel del sistema inmunitario en la limitación de la formación del > 80% de los tumores de etiología no viral. En años recientes, sin embargo, un creciente conjunto de pruebas, tanto genéticas y de la epidemiología clínica, sugiere que el sistema inmune funciona como una barrera significativa para formación y progresión del tumor, al menos en algunas formas de cáncer.<sup>110, 122</sup>

**Inflamación y progresión del tumor:** Algunos tumores están densamente infiltrados por las células del sistema inmunológico innato y adaptativo y por lo tanto reflejan condiciones inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. Con el advenimiento de mejores marcadores para identificar con precisión los distintos tipos de células del sistema inmunológico, ahora está claro que prácticamente toda lesión neoplásica contiene células inmunes presentes en densidades que van desde sutiles infiltraciones detectables sólo con anticuerpos específicas contra las células hasta inflamaciones graves que son evidentes incluso mediante técnicas estándar de tinción histoquímica. Históricamente, se pensaba que estas respuestas inmunes reflejaban un intento por el sistema inmunitario de erradicar tumores. Para el año 2000, ya existían indicios de que el tumor asociado a una respuesta inflamatoria tuvo el efecto inesperado y paradójico de aumento de la tumorigénesis y la progresión, ayudando a neoplasias incipientes para adquirir capacidades importantes. En la década siguiente, la investigación sobre las intersecciones entre la inflamación y la patogénesis del cáncer ha avanzado, haciendo demostraciones abundantes y convincentes del importante efecto promotor para el tumor que tiene las células del sistema inmune innato en la progresión neoplásica. La inflamación puede contribuir a múltiples capacidades por el suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo los factores de crecimiento para sostener la señalización proliferativa, factores de supervivencia, factores proangiogénicos, modificación de la matriz extracelular, enzimas que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, y señales inductivas que conducen a la activación de EMT, entre otros.<sup>110, 122</sup>

Algunos autores en 2011 propusieron que la inflamación como marca distintiva del cáncer podía ser contrarrestada. La inflamación crónica puede ser amortiguada con antiinflamatorios drogas que, en algunos casos, reducen el riesgo de cáncer (sulindac, aspirina). Sin embargo, una estrategia es reorientar la inflamación de la promoción del tumor a una prevención de la reacción. Los anticuerpos y vacunas activas protegen

eficazmente el huésped de inicio del tumor. Sin embargo, un conjunto mucho mayor de pruebas favorece la inmunización activa. La alta eficacia de las vacunas en la prevención, de infección por virus carcinógenos y otras infecciones, de los agentes causantes del cáncer está recibiendo actualmente impacto social. La evidencia muestra que las maniobras inmunológicas pueden controlar el cáncer. Esta evidencia aún está dispersa, pero una serie de informes recientes sugieren que la inmunoterapia se está convirtiendo en una opción de tratamiento para pacientes con cáncer. Vacunas de diversos tipos, han proporcionado resultados iguales o mejores que los tratamientos convencionales en un rango de neoplasias tales como linfomas, melanoma, próstata, y el cáncer de pulmón.<sup>122</sup>

Como se mencionó antes, la pérdida de los controles normales en la replicación celular es el defecto fundamental del cáncer. En la mayoría de las células eucariontes, la decisión clave de si una célula se dividirá o no se hace en el punto en el cual esta entra o no a la fase S. En la mayoría de los casos, una vez que la célula está comprometida para ingresar al ciclo celular debe de completarlo.<sup>61</sup>

Los procesos básicos tales como la replicación del DNA, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular. Éste es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas y dependientes entre sí que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos (aquellos procesos que ocupan una posición inferior en la jerarquía del control del ciclo celular) que duplican y dividen los contenidos de la célula. Durante un ciclo celular típico, el sistema de control está regulado por unos factores de retraso que pueden parar el ciclo en unos puntos de control determinados. En ellos existen señales de retroalimentación que pueden retrasar el propio sistema de control, evitando que se desencadene el proceso siguiente sin que el anterior haya terminado adecuadamente.<sup>69</sup>

Los puntos de control evitan la progresión del ciclo celular en presencia del DNA dañado, dando tiempo para que la reparación se produzca al mismo tiempo y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores. Los puntos de control proporcionan una barrera para el desarrollo del cáncer.<sup>70</sup>

### 4.2.3 Protooncogenes, oncogenes y genes supresión tumoral

Los protooncogenes y los genes supresores de tumores codifican las proteínas implicadas en la regulación de los receptores de superficie como citocinas, factores de crecimiento, moléculas de transducción de señales, factores transcripción, así como reguladores epigenéticos, del ciclo celular y la apoptosis. Típicamente, la mayoría de estos genes están involucrados en el desarrollo normal de las células mieloides, cualquier alteración en su expresión o pérdida de su función normal conduce a la leucemogénesis.<sup>137</sup>

La identificación de oncogenes y genes supresores de tumores tales como los que codifican la proteína retinoblastoma (RB) involucra una combinación de clonación funcional, clonación posicional o análisis mutacional de individuos genéticamente predispuestos. La hibridación genómica comparativa reveló varios genes que pueden ser amplificados o eliminados en el cáncer. Los análisis del genoma en el caso del cáncer de mama indican que hay pocos genes que son frecuentemente mutado pero muchos que son infrecuentemente mutados, proporcionando una explicación de la heterogeneidad del cáncer. La comparación de las secuencias del genoma de cáncer de mama primario y la metástasis del cáncer muestran mutaciones de novo limitadas en metástasis y además mutaciones significativas compartidas con el tumor primario. En un caso de metástasis de evolución a lo largo de 9 años, se encuentran un gran número de mutaciones nuevas cuando se comparan al tumor primario. Los oncogenes son frecuentes desregulado en el cáncer. Mutaciones en la pérdida de función de RB en líneas celulares de cáncer de mama y tumores primarios han sido reportados desde 1988.<sup>135</sup>

La familia Retinoblastoma consta de tres genes, RB, p107 y Rb2/p130, todos fundamentales en el control de importantes fenómenos celulares, como el ciclo celular, la diferenciación, y apoptosis. El "fundador" y el gen más investigado de la familia es RB, que se considera el prototipo de los genes supresores de tumores. La caracterización de estas proteínas identificó p105 como el producto del gen RB. Una característica biológica común compartida por los tres miembros de esta familia es la capacidad de controlar el ciclo celular. De hecho, modulan negativamente la transición entre las fases G1 y S, utilizando mecanismos principalmente relacionados con la inactivación de factores de transcripción, como los de la familia E2F, que promueven la entrada de la célula en la fase S. El papel crucial de la "vía RB" y de las tres proteínas RB en la regulación del ciclo celular está profundamente unida a la transformación y / o progresión del cáncer. Por varias décadas, el desarrollo del cáncer se ha relacionado idealmente con la pérdida de control en el proceso

celular que regulan el ciclo celular. RB cumple con todos los requisitos para ser considerado un gen supresor de tumores. De hecho, sus mutaciones o deleciones son compartidas por varias neoplasias malignas. Citogenéticamente, Rb2/p130 mapea a la región 16q12.2-13, un área repetidamente alterada en cánceres humanos, mientras que p107 se correlaciona con la región del cromosoma humano 20q11.2, un locus que no se encuentra frecuentemente involucrado en neoplasias humanas.<sup>124, 135</sup>

Por otro lado p53 es una proteína supresora de tumores que ejerce su función uniéndose al DNA y regulando la expresión de distintos genes. Es un factor de transcripción que regula la transcripción de un conjunto de genes que son clave en la generación de tumores. Ante determinadas situaciones oncogénicas y genotóxicas, p53 responde produciendo detención del ciclo celular o apoptosis. Por lo tanto mutaciones en p53 que bloquean su función hacen que los portadores desarrollen tumores con más facilidad. El sistema de vigilancia de la proteína p53, está constantemente comprobando el rendimiento de todos los procesos del ciclo celular y, en particular, los relacionados con la síntesis de DNA. El sistema de p53 también es sensible al estrés celular de fuentes externas tales como la radiación, que a menudo resulta en daño al DNA. Si el daño no es demasiado grave, la detención del ciclo celular inducida por p53 se produce, mientras que se repara el daño. Sin embargo, si el daño es grave, la célula es impulsada hacia la senescencia o la apoptosis inducida por p53, ya que interacciona directamente con la endonucleasa AP y la DNA polimerasa que están implicados en la reparación por escisión. Si el daño se repara correctamente, p53 estimula la síntesis de Mdm2, activando su autodestrucción y la progresión en el ciclo celular. Si el daño no puede ser reparado, la célula puede entrar en apoptosis o en senescencia, ambos inducidos por p53.<sup>70, 71</sup>

Los protooncogenes desempeñan funciones fisiológicas que son necesarios para la homeostasis. En particular, los protooncogenes gobiernan los procesos de crecimiento, proliferación, y supervivencia que una célula cancerosa puede explotar como ventajas competitivas sobre las no neoplásicas. Las células tumorales pueden usar las propiedades beneficiosas de un oncogén (por ejemplo, proliferación) sin los efectos negativos.<sup>137</sup>

Hay oncoproteínas que realizan múltiples transducciones de señales (por ejemplo, BCR-ABL) que pueden activar la proliferación celular y la supervivencia celular. Los oncogenes son identificables por su capacidad transformar una célula en el contexto de la desregulación de la expresión o función. Los mecanismos de activación del oncogén son diversas e incluyen la sobre regulación de la expresión de un producto génico normal,

expresión de la proteína mutante con estabilidad o alteración de la funcionalidad o reclutamiento alterado o localización subcelular de un producto genético normal expresado aberrantemente o mutante.<sup>137</sup>

Los protooncogenes primeros estimulan normalmente la división celular, como hecho fundamental para mantener la vida. De ellos depende el desarrollo embrionario, la cicatrización de las heridas y la reposición de las células, que normalmente envejecen y mueren luego de cumplida su diferenciación. Pero esos mismos protooncogenes pueden sufrir alteraciones en su estructura, por cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos (mutaciones), por pérdida de algunos segmentos del cromosoma (deleciones) o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones).<sup>60</sup>

El paso de protooncogén a oncogén se puede producir por diferentes mecanismos: a) translocación: cuando una parte de un cromosoma se liga a otro. El resultado es un híbrido de cromosoma, detectable en el cariotipo. Esto da lugar a una alteración en la transcripción del DNA; b) mutaciones puntuales: sustitución de un par de bases por otro par en una secuencia de DNA, por ejemplo G:C por A:T; c) amplificación: las células eucariotas están formadas por un genoma diploide, es decir, tienen dos copias de cada gen. En determinadas circunstancias una de las copias puede multiplicarse miles de veces, aumentando su tasa de expresión, dando lugar a la amplificación del gen. Es uno de los mecanismos más habitualmente implicados en la carcinogénesis; d) Mutagénesis por inserción: producida por la inserción del DNA del virus en el genoma del huésped.<sup>60</sup>

Los genes que codifican para proteínas que alteran el control de la proliferación de la célula misma son llamados oncogenes. Estos genes causantes de cáncer son formas mutantes de genes normales celulares conocidos como protooncogenes, los cuales constituyen sólo una pequeña proporción del genoma completo de la célula, y son requeridos para la función normal de la misma.<sup>74</sup>

La génesis y el desarrollo tumoral, son el resultado de numerosas alteraciones moleculares que se producen en el DNA y donde están implicados los oncogenes y los genes supresores tumorales. Los oncogenes son genes dominantes que codifican para proteínas (oncoproteínas) que regulan el crecimiento y la diferenciación celular pero que a través de variaciones en su secuencia de nucleótidos por mutación, amplificación o reordenamiento cromosómico adquieren capacidades tumorigénicas. La transformación de uno de los dos alelos de las células sirve para provocar una transformación neoplásica. Los genes

supresores tumorales, por su parte son genes "recesivos" que sirven para regular la proliferación celular. Es necesario la alteración en ambos alelos. Mientras que los genes que no han sufrido transformación y realizan una actividad fisiológica normal se les denomina protooncogenes. Existen dos procesos de activación de los protooncogenes: por la acción de virus oncogénicos (oncogenes virales) o en tumores no producidos por virus (oncogenes celulares). Los oncogenes se dividen en grupos en función de las propiedades bioquímicas que presentan sus productos protéicos: <sup>55</sup>

1. Factores de crecimiento
2. Receptores
3. Transductores de señales
4. Activadores de la transcripción
5. Relacionados con la regulación del ciclo celular
6. Reguladores de la apoptosis

Los protooncogenes promueven el crecimiento celular, pues bien, los genes supresores tienen una función antagónica a ésta: inhibir el crecimiento y división celular. Una alteración monoalélica les vale para convertirse en oncogenes y mostrar su fenotipo transformante, sin embargo, los genes supresores deben perder o variar su capacidad funcional y esto generalmente ocurre mediante la mutación en un alelo, asociada a la pérdida del alelo restante. Su función es prevenir o suprimir la tumorigénesis, parando la proliferación celular si hay alguna mutación, ayudando a la reparación del DNA o conduciendo a la célula a la muerte celular programada o apoptosis. Por tanto, cuando estos genes quedan inactivados, la célula prolifera sin detenerse ante mutaciones. <sup>55, 74</sup>

**Tabla 1.** Oncogenes, funciones y tumores asociados (Modificada de Rubín y Williams, 2003)

Oncogén	Función	Cáncer asociado
<b>MET</b>	Receptor de factor de crecimiento hepático	Renal papilar
<b>HER2/NEU/ERBB2</b>	Receptor de hergulina	Mama, ovario, vejiga
<b>RET</b>	Receptor del factor neurotrófico	Medular de tiroides
<b>RAS (H, K, N)</b>	GTPasa	Pulmón, páncreas, colorrectal
<b>BCR-ABL</b>	Tirocinsinasa citoplasmática	Leucemia Mieloide Crónica
<b>MYC (c, L, N)</b>	Factor de transcripción	Pulmón, Linfoma, neuroblastoma
<b>BCL 6</b>	Factor de transcripción	Linfoma de células grandes
<b>BCL2</b>	Antiapoptosis	Prostata, linfoma

**Tabla 2.** Protooncogenes y su función biológica (Modificada de Branda, 2014)

Protooncogen	Función Biológica
<b>ABL</b>	Tirosinquinasa de control de la dinámica del citoesqueleto
<b>BCL2</b>	Senescencia y muerte celular
<b>C-erbB2</b>	Receptor de membrana para EGF
<b>Sos y grb</b>	Moléculas adaptadoras (cascada de señal)
<b>Raf-serin</b>	Treoninquinasa (cascada de señal mitogénica)
<b>Ras (h y k)</b>	GTP- asas (cascada de señal mitogénica)
<b>RAR</b>	Receptor Nuclear para el ácido retinoico
<b>Src</b>	Tirosinquinasa de moléculas transductoras de señal
<b>Trk</b>	Tirosinquinasa de receptores de membrana
<b>Sis</b>	Receptor de PDGF

Las lesiones genéticas pueden afectar a cuatro tipos de genes: protooncogenes promotores del crecimiento, genes supresores del tumor que inhiben su crecimiento, genes que regulan la apoptosis y genes que regulan la reparación del DNA. La carcinogénesis es un proceso que consta de varias etapas y recibe el nombre de progresión tumoral. La progresión a nivel genético es la acumulación de mutaciones sucesivas, ya que una única mutación somática no es suficiente para que se desarrolle un cáncer. Para que aparezca un tumor es necesario que se pierdan los controles múltiples ejercidos por las tres categorías de genes:

oncogenes, genes supresores del cáncer y genes reguladores de la apoptosis. La acumulación de estas mutaciones es una consecuencia de la inestabilidad genética de las células anormales.<sup>55, 74</sup>

Para que una célula normal cambie y se convierta en una célula neoplásica, se requieren varias mutaciones en varios genes, y eso ocurre a través de mucho tiempo, a veces de años, de estar expuesto a un agente carcinogénico. El cáncer comienza en una célula, es decir que es de origen monoclonal. Esa célula alterada escapa a los controles celulares y se vuelve “anárquica”, iniciando una generación de más “células anárquicas”, que, a su vez, pueden inducir a cambios similares en las células vecinas. Pero no sólo afectan a la célula las mutaciones inducidas por los carcinógenos sino que, a lo largo de cada división celular, se producen errores espontáneos en cada duplicación y los mismos se van acumulando constituyendo un factor intrínseco de riesgo; aquí vale la pena señalar que los radicales libres son productos normales del metabolismo celular, pero un exceso de los mismos puede acarrear efectos genotóxicos.<sup>60</sup>

Por ejemplo los estudios demuestran que aproximadamente el 35% de los pacientes con LMA tienen varias translocaciones que causan proteínas de oncofusión. La transcripción de estas proteínas podría dirigirse a mecanismos tales como como transcripción, epigenética, estructura celular y receptores nucleares así como causar proliferación incontrolada de células progenitoras. Hay cuatro translocaciones importantes en AML con una frecuencia de 3-10%, incluyendo PML-RARa, AML1-ETO, CBFb - MYH11, y fusiones MLL, así como otros proteínas de oncofusión con una menor incidencia. Entonces, tomando como referencia la t(15; 17) junto con la fusión de RARa (receptor de ácido retinoico alpha) con un gen previamente desconocido designado como PML (leucemia promielocítica) codifica una proteína de oncofusión eficaz en la regulación de la apoptosis y la prevención de diferenciación celular. Otra translocación común en AML es t(8; 21) (q22; q22), lo que da lugar a gen 1 (AML1) y ETO (ocho veintiuno). El gen AML1 codifica un factor de transcripción crítico que regula una variedad de genes implicados en la proliferación y diferenciación de muchos tipos de células, incluidas las que están dentro del grupo hematopoyético. Por otro lado, ETO es una proteína que alberga actividades represoras transcripcionales. En consecuencia, AML1-ETO funciona como un represor transcripcional.

137

Las mutaciones en protooncogenes conducen a la proliferación excesiva de las células mieloides en la leucemia. Algunos oncogenes codifican factores de crecimiento

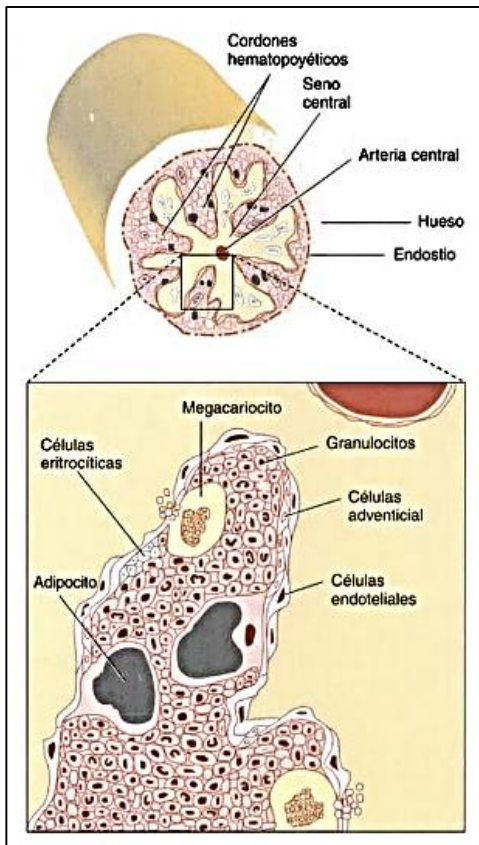


hematopoyéticos o receptores del factor de crecimiento FLT3, y algunos otros regulan la proliferación o diferenciación celular (por ejemplo, RAS). Mutación, translocación y amplificación en estos importantes procesos celulares contribuyen a la leucemogénesis.<sup>137</sup>

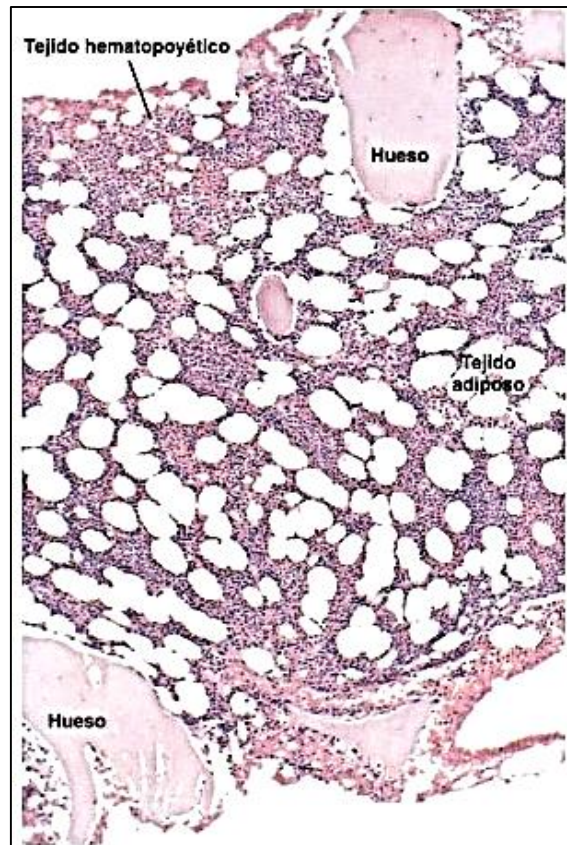
Por su parte la lesión iniciadora de la CML surge por la translocación recíproca de c-ABL1 en el cromosoma 9 con el gen BCR en el cromosoma 22 para generar la proteína de fusión BCR-ABL con cABL-1 quinasa. La adquisición de este gen fusión BCR-ABL es suficiente para transformar células madre hematopoyéticas. Los efectos de la actividad BCR-ABL es pleiotrópica e incluye proliferación celular mejorada, evasión de apoptosis, y aumento de la capacidad de auto-renovación celular. Al mismo tiempo, BCRABL establece la escena para la adquisición de nuevos productos oncogénicos mediante la inestabilidad genómica y la regulación negativa de los supresores de tumores. Por lo tanto la expresión desregulada BCR-ABL proporciona un "suelo fértil" para la devolución oncogénica adicional.<sup>136</sup>

### 4.3 Hematopoyesis

La hematopoyesis se puede definir como la serie de eventos concatenados que comienzan a nivel de la célula troncal hematopoyética (CTH) con la autorrenovación, seguidos de la diferenciación y maduración, culminando con la producción de elementos formes sanguíneos funcionales. La médula ósea (BM) es el principal sitio de hematopoyesis en humanos y, en condiciones normales, sólo un pequeño número de células madre y células progenitoras hematopoyéticas se pueden encontrar en sangre periférica. Se considera diferenciación como la secuencia de hechos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, los cuales le confieren potencialidad para determinada función. La maduración es la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula. En el caso de las leucemias, estas suponen la proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar como normalmente lo hace. Las células maligna individuales maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular es a menudo prolongado y la mayoría de dichas células incompetentes sobreviven más que las normales.<sup>4</sup>



**Figura 9.** Ilustración gráfica de la organización de la médula ósea.<sup>9</sup>

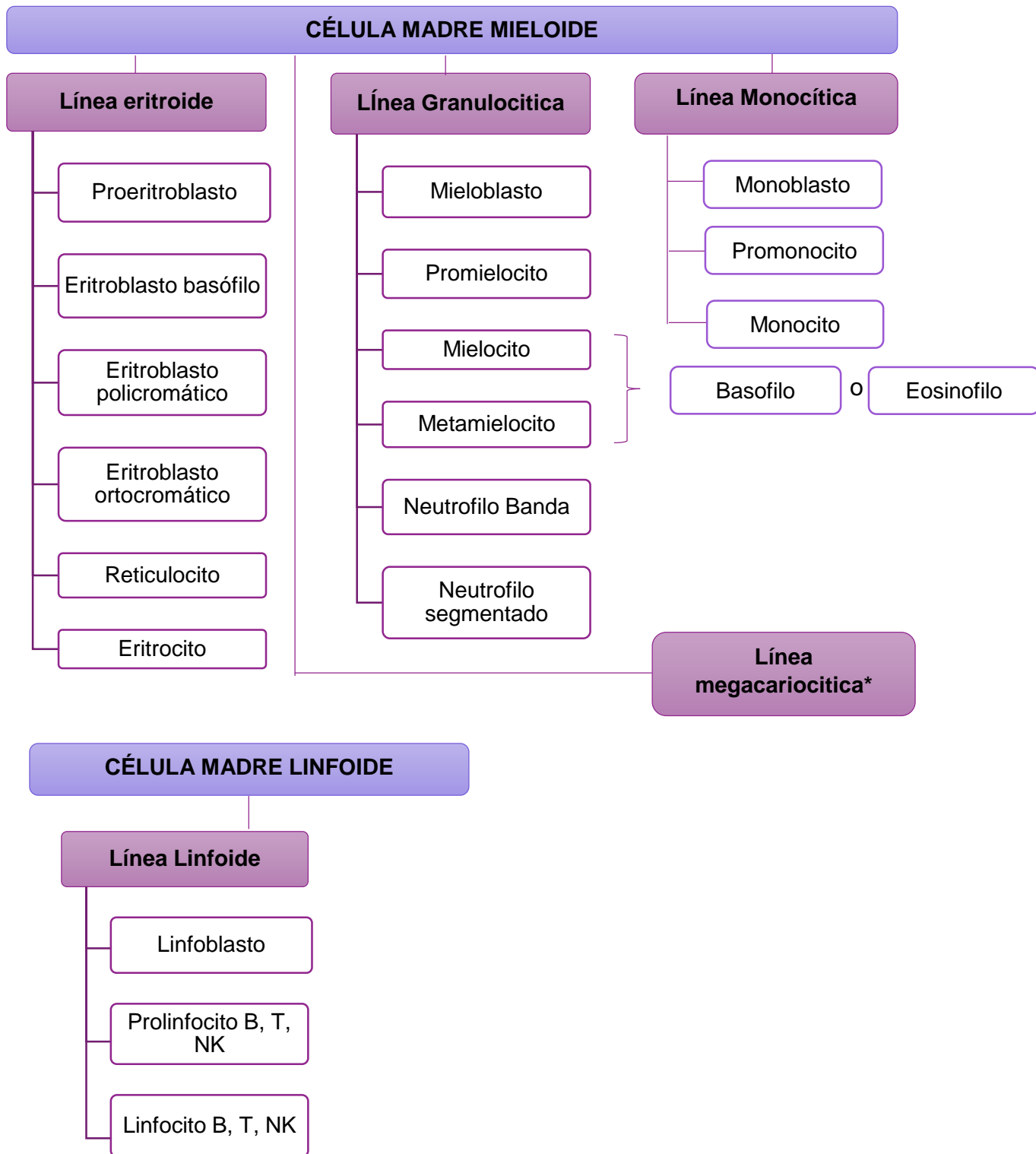


**Figura 10.** Tinción con eosina y hematoxilina del tejido de médula ósea.<sup>9</sup>

La hematopoyesis comprende la formación, el desarrollo y la especialización de todas las células sanguíneas funcionales, las características de maduración principales en un blasto (célula sanguínea inmadura) son: cromatina difusa, presencia de nucléolos y citoplasma basófilo; mientras que una célula sanguínea madura se caracteriza por tener una cromatina densa o compacta, ausencia de nucléolos y citoplasma sin basofilia.<sup>78</sup>

El desarrollo de la hematopoyesis requiere de la expresión de una gran variedad de genes, entre ellos lo de los factores de transcripción, receptores para factores de crecimiento, moléculas de adhesión y otros genes que conducen a la adquisición del fenotipo de la célula progenitora. Para llevarse a cabo de forma normal, la hematopoyesis requiere nutrientes esenciales, incluidos diversas proteínas, vitaminas como el ácido fólico y minerales como el hierro. Son necesarias hormonas como la eritropoyetina y la testosterona lo que explica que los varones posean mayor masa de eritrocitos que las mujeres; también es necesaria la presencia de hormonas tiroideas.<sup>76,77</sup>

**Diagrama 1.** Maduración de las células hematopoyéticas tanto de la serie mieloide como linfoide. (Diagrama de elaboración propia)

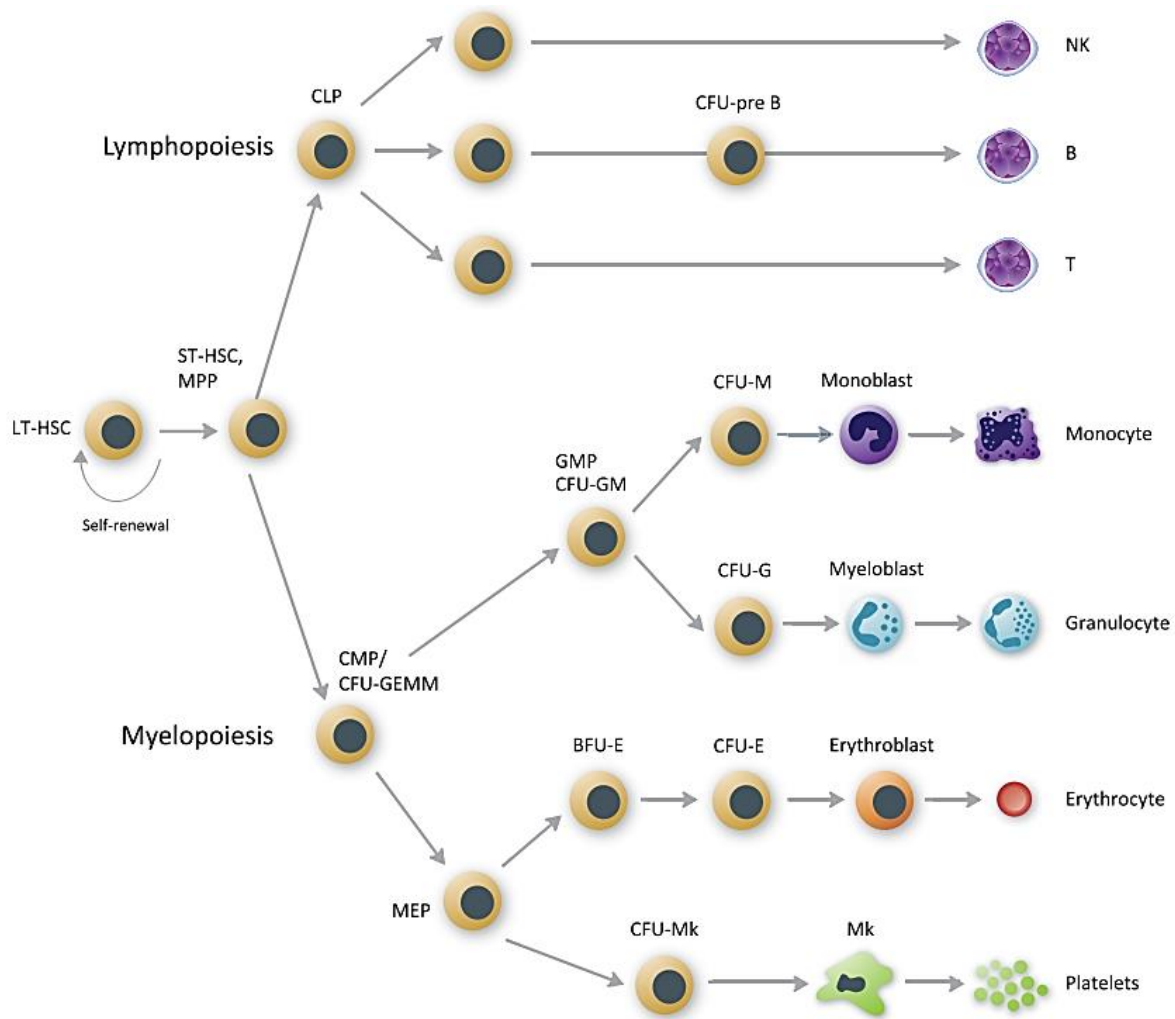


Las células maduras de la sangre tienen una vida útil finita y deben ser continuamente reemplazado a lo largo de la vida. En la medula ósea normal, se encuentran todas las células de la sangre, maduras e inmaduras. En la sangre periférica se identifica casi siempre células maduras y, en determinadas circunstancias, que pueden ser fisiológicas o patológicas, se observan células inmaduras. Las células progenitoras pluripotenciales de la medula ósea se autorreplican lentamente y de forma ocasional se diferencian a un estadio de compromiso linfóide o mielóide. El primer estadio de compromiso mielóide produce una célula progenitora capaz de autorrenovarse y también de diferenciarse hacia todos los progenitores de la células sanguíneas, con la excepción de las linfoides. Esta célula se conoce como la célula madre mielóide, que se autorreplica y evoluciona a un estado de célula progenitora hacia la eritropoyesis, granulopoyesis, megacariocitopoyesis y fagocitopoyesis.<sup>76, 77</sup>

Las células sanguíneas maduras provienen de dos tipos de células troncales: Indiferenciada y progenitora. Las células troncales indiferenciadas o pluripotenciales (PSC, también denominadas totipotenciales) son capaces de autorrenovarse y diferenciarse a progenitores encargados del linaje linfóide o mielóide. Las células progenitoras producen células precursoras específicas de linaje reconocibles por su morfología.<sup>78</sup>

La célula progenitora pluripotencial se caracteriza por ser capaz de dividirse sin diferenciarse, de tal manera que se perpetúa una capacidad denominada "autorrenovación". Tal propiedad le confiere a esta célula (que se encuentra también en la sangre del cordón umbilical y en pequeña cantidad en la sangre periférica) la capacidad de repoblar la medula ósea en los pacientes sometidos a trasplante de medula ósea. El megacariocito es la célula más grande de la medula ósea y de su citoplasma maduro se desprenden las plaquetas. Las células maduras que normalmente circulan son los reticulocitos y eritrocitos; granulocitos en banda y segmentados, neutrófilos, eosinófilos, basófilos; monocitos, linfocitos y plaquetas. Cuando la producción de un tipo de células aumenta por razones fisiológicas o patológicas, es posible que se observen células inmaduras en circulación; por ejemplo en un paciente con anemia hemolítica se observa un aumento del porcentaje de reticulocitos y se pueden identificar eritroblastos ortocromáticos en la sangre periférica; en un paciente con septicemia bacteriana es posible reconocer el aumento de bandas y segmentados y, si el proceso infeccioso es suficientemente grave, se pueden también encontrar en la circulación algunos metamielocitos e incluso mielocitos. La célula madre hematopoyética es capaz de reestablecer la hematopoyesis trilineal en un individuo que ha

sufrido mieloablación por quimioterapia y radiación, exposición a tóxicos o idiopática; también se observa en aquellos que han recibido un trasplante autólogo o alogénico de hematopoyetores y habitualmente dicha célula circula en números pequeños en la sangre periférica.<sup>76, 134</sup>



**Figura 11.** Secuencia de maduración de las líneas celulares en la médula ósea.<sup>76</sup>

El microambiente hematopoyético inductivo en la médula ósea cumple un papel importante en la diferenciación y la proliferación de las células hematopoyéticas. Las necesidades satisfechas por el microambiente son: una atmósfera con predominio de CO<sub>2</sub>; una superficie húmeda y pegajosa en la cual fijarse (formada por las células de la estroma, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, miocitos, células endoteliales, células dendríticas y macrófagos); y una población "normal" de células de la médula roja necesaria para

interacción celular. Este ambiente proporciona sostén, factores de crecimiento, citocinas y moléculas de matriz extracelular que ayudan en la regulación de la hematopoyesis.<sup>78</sup>

La hematopoyesis es un proceso complejo regulado por múltiples factores. La hematopoyesis se produce en sitios especializados de tejido ("nichos hematopoyéticos") que conducen al mantenimiento y diferenciación de las células madre y progenitoras. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, que son quiescentes y auto-renovables, están presentes en el nicho de células madre medulares, que es baja en oxígeno y favorable para mantener su identidad como células madre. El nicho de células madre medulares se compone de varias células y sus productos que regulan positivamente y negativamente el proceso. Las células reguladoras clave incluyen osteoblastos, células reticulares del ligando 12 de quimioquinas CXC (CXCL12) y células del endotelio vascular. Además, las señales del sistema nervioso simpático y los osteoclastos regulan la salida de células madre hematopoyéticas de la médula ósea a través de la regulación de un factor de retención y retención de células madre crítico llamado CXCL12. El requisito de un nicho especializado es un factor limitante para hematopoyesis extramedular (EH) en la periferia. Como consecuencia, EH suele estar limitado en la periferia en momentos específicos y bajo ciertas condiciones. En el proceso de control fino del nicho de células madre participan una serie de vías moleculares que incluyen receptores de detección de calcio, angiopoyetina 1, Tie-2 y componentes de la matriz extracelular. Aunque se entienden incompletamente, estas vías se piensa que están involucrados no sólo en el mantenimiento del nicho de células madre, sino también en la renovación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas dentro del nicho. Varias células producen citoquinas hematopoyéticas tales como el factor de células madre (SCF), proteínas morfogénicas óseas, factor de crecimiento transformante  $\beta$ , trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento de fibroblastos y factor 2 de crecimiento similar a insulina, que mantienen y regulan la proteína hematopoyética primitiva (G-CSF), interleucina-3 (IL-3), IL-7, eritropoyetina (EPO), granulocito-macrófago (GM)-CSF y macrófago (M)-CSF, juegan un papel importante en la diferenciación de las células progenitoras y hematopoyéticas a los linajes celulares comprometidos.<sup>134</sup>

Además de las células y factores antes mencionados, la hematopoyesis puede ser regulada por una serie de moléculas, tales como ligandos del receptor tipo Toll, productos metabólicos/fisiológicos, diversos mediadores inflamatorios y hormonas. Muchas de las citoquinas producidas en la inflamación actúan como factores mielopoyéticos, ciertos

ligandos del receptor tipo Toll promueven la mielopoyesis y la hipoxia es un inductor bien conocido de la eritropoyesis. Además, la hormona paratiroidea (PTH) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) controlan el tallo hematopoyético del nicho celular; La PTH puede aumentar el número de células madre y progenitoras de la médula ósea y el IGF puede regular la supervivencia y expansión de las células progenitoras y del tallo hematopoyético. Muchos de los tipos celulares producidos en la médula, como los monocitos y las células B, viajan a la periferia para convertirse en células inmunes completamente funcionales. Los monocitos migrarán a varios sitios de tejido para convertirse en macrófagos o células dendríticas y las células B deben activarse en la periferia para convertirse en células de memoria y plasma. Las células T Naïve se hacen en el timo, de progenitores que se originaron en la médula y se someten a una diferenciación adicional en respuesta a los antígenos propuestos por las células presentadoras de antígeno. El término "hematopoyesis extramedular" se refiere a una amplia gama de actividades hematopoyéticas desde las primeras etapas del compromiso de linaje hasta las últimas etapas de maduración de células hematopoyéticas.<sup>134, 1, 77</sup>

La hematopoyesis extramedular se produce si la médula ósea ya no es funcional. La mielofibrosis primaria es una forma de síndrome mieloproliferativo crónico Filadelfia negativo. En la mielofibrosis primaria se produce el desplazamiento y la movilización de las células madre y progenitoras. Como consecuencia, las células madre y progenitoras hematopoyéticas ocupan el hígado y el bazo como sitios alternativos de hematopoyesis. Al mismo tiempo, el nicho de células madre de la médula ósea se altera para que ya no haya hematopoyesis normal. Así, en la mielofibrosis primaria, el sitio de la hematopoyesis cambia de la médula al bazo y al hígado. La mielofibrosis primaria y el síndrome mieloproliferativo crónico relacionado con Filadelfia negativo se asocian con una mutación puntual en la tirosina quinasa JAK2 (JAK2V617F). Se cree que esta mutación hace que las células progenitoras y del tallo hematopoyético sean más sensibles a los factores de crecimiento, altera el tallo de la médula ósea y hace que las células se movilicen hacia el bazo y el hígado. Otra característica notable de la mielofibrosis primaria es la alta producción de citoquinas inflamatorias tales como SDF-1, HGF, IL-6, IL-8, SCF y VEGF. Asimismo, se incrementan los factores que promueven la fibrosis y la angiogénesis (bFGF, TGF- $\beta$ , PF4, VEGF, etc.). Estas moléculas son producidas principalmente por células hematopoyéticas y contribuyen a los cambios humorales regulatorios que ocurren en los nichos medulares y bazo. Además de la mutación JAK2, se han encontrado mutaciones activadoras del receptor de trombopoyetina MPL (MPLW515L y MPLW515K) en un número pequeño de

pacientes con síndrome mieloproliferativo crónico Filadelfia negativo. Sin embargo, la EH en mielofibrosis, nunca puede reemplazar completamente a la hematopoyesis en la producción de células sanguíneas necesarias.<sup>134</sup>

## 4.4 Leucemia

La palabra leucemia significa “sangre blanca”, es decir hace referencia a las células de linaje granulocítico y mononuclear que conforman la sangre. Las leucemias son un grupo de neoplasias hematooncológicas que se caracteriza por un crecimiento autónomo y desmedido de formas inmaduras de leucocitos (blastos) provenientes de una clona maligna, que terminan por volverse la estirpe predominante en la médula ósea, con la consecuente disminución del resto de series hematopoyéticas.<sup>56</sup>

Las leucemias pueden afectar a cualquier precursor de las diferentes líneas celulares de la médula ósea. Esta neoplasia impide que se produzcan eritrocitos, plaquetas y leucocitos maduros, saludables. Por lo tanto, algunos pacientes presentan síntomas potencialmente mortales a medida que disminuyen las células sanguíneas normales.

### 4.4.1 Etiología de las Leucemias

En el apartado tanto de “definición del cáncer” como en “ciclo celular” se puntualizó sobre el origen del cáncer y como es que una célula puede llegar a volverse cancerígena. La leucemia, al igual que otras neoplasias, es el resultado de mutaciones del DNA. Algunas mutaciones producen la activación de oncogenes o la desactivación de los genes supresores de tumores, y así se altera la regulación de la muerte celular, la diferenciación o la mitosis. Las mutaciones ocurren espontáneamente o como resultado de la exposición a la radiación o a sustancias cancerígenas, además de la probable influencia de factores genéticos o de algunos factores de riesgo.

La causa precisa de las Leucemias Aguda se desconoce. La clonación por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora constituye el origen de las leucemias agudas, tanto linfoblásticas como mieloblásticas. La activación de oncogenes como MLL, MYC, BCL-2 y RAS, al igual que la formación de genes quiméricos o fusión de genes como BCR/ABL (en leucemia linfoblástica aguda o mielocítica crónica), muy probablemente sea de origen multifactorial. Se dice, que es posible que la exposición a derivados del benceno



desempeñen algún papel en la leucemogénesis, así como la exposición a radiaciones ionizantes. Agentes que dañen el DNA, como alquilantes, pueden causar leucemia; asimismo, las leucemias agudas secundarias al uso de sustancias quimioterapéuticas para otras enfermedades pueden llegar a ser muy agresivas. También algunos virus pueden llegar a generar leucemias; entre ellos es posible mencionar algunos retrovirus como los virus linfotrópicos T humanos (HTLV) I y II, que tienen semejanzas al virus del HIV-1, agente causal del sida. También algunos padecimientos en los que hay inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Fanconi, pueden culminar en leucemia aguda y la prevalencia de este tipo de leucemia es mayor en individuos con trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) que en la población general.<sup>4</sup>

Además existe una tendencia familiar, ya que los hermanos de un paciente con Leucemia, sobre todo si se trata de gemelos idénticos, tienen mayor riesgo de ser afectados respecto de los que no tienen familiares con este problema. Algunos fármacos tales como el cloranfenicol, o los antineoplásicos alquilantes, como la ciclofosfamida, pueden causar alteraciones que precipiten la aparición de la leucemia. Con seguridad, la causa de la leucemia es multifactorial y no depende de una sola anomalía.<sup>76</sup>

En el caso de las leucemias crónicas se sabe que la frecuencia aumentó en la población japonesa que estuvo expuesta a la radiación atómica en 1945. Existe menos evidencia que en los casos de leucemia aguda en relación a fármacos, agentes químicos o factores hereditarios como causas directas de la enfermedad, pero se ha demostrado que existen genes alterados directamente que se vinculan con la presencia y permanencia de la entidad, los cuales se conocen como oncogenes, sin embargo el por qué aparecen dichos genes o alteraciones cromosómicas de la enfermedad no se tiene claro con certeza. Además en el caso de leucemia linfoblástica crónica, a diferencia de otras variantes de leucemia, la radiación no desempeña un papel relevante al igual que los agentes químicos, en este caso los retrovirus han sido implicados como causa etiológica más probable de la enfermedad y de hecho se han demostrado partículas virales en células cultivadas de pacientes con leucemia linfocítica crónica y como en todos los casos de leucemia existe predisposición genética y la mayoría de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas.<sup>4</sup>

En el caso de la leucemia que ocurre en la primera infancia, por ejemplo, consiste en una de los mejores modelos para estudiar las exposiciones gen-medio ambiente debido a la leucemia asociada a mutaciones somáticas, el corto tiempo transcurrido entre el impacto ambiental, la exposición a los factores de riesgo, y el inicio de la enfermedad. El

conocimiento sobre los patrones de la leucemia ha mejorado, desde que se han identificado mutaciones somáticas que ocurren durante la vida en el útero, como reordenamientos MLL (MLL-r) y los genes fusión ETV6-RUNX1. Estas mutaciones somáticas podrían estar relacionadas con los efectos del error en la diferenciación durante la vida temprana, modulada por factores de susceptibilidad heredados. Una variedad de carcinógenos químicos como el humo del cigarrillo, hidrocarburos, medicamentos y metilnitrorea; han demostrado inducir la proteína mitógena-activada cinasa (MAPK) en mutaciones tanto en humanos y animales. La señalización MAPK desregulada es comúnmente encontrada en células cancerígenas, y es usualmente causada por mutaciones en FLT3, familia RAS, PTPN11 y BRAF, que resultan en activación constitutiva de la vía. Las mutaciones en los genes FLT3, KRAS, NRAS y BRAF ha sido observada con prevalencia variable en la LMA y la LLA.<sup>80</sup>

Los factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad a la leucemia; entre los pacientes que están registrados en un Hospital, el 9% de los pacientes tienen un familiar con CLL. Además, los parientes de primer grado de los pacientes con CLL tienen un riesgo 8,5 veces mayor de desarrollar esta enfermedad y la concordancia de CLL es mayor entre los gemelos monocigóticos que entre los gemelos dicigóticos. Los estudios de asociación en todo el genoma han identificado poliformismos que están asociados con CLL familiar, demostrando que la variación genética común contribuye al riesgo heredable. La alteración de la expresión de los genes que se encuentran en o cerca de los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) asociados a CLL podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Además, se han encontrado SNPs asociados a CLL en BCL2, que codifica una proteína anti-apoptótica que se expresa en niveles elevados en CLL, y en PMAIP1, que codifica una proteína pro-apoptótica.<sup>82</sup>

Las alteraciones epigenéticas y genéticas son dos mecanismos importantes en la leucemia. Varios factores, como las translocaciones cromosómicas, así como la genética o las alteraciones epigenéticas, están implicados en la leucemogénesis. La metilación anormal del DNA y modificaciones en las histonas son importantes mecanismos en el silenciamiento de supresores de tumor, contribuyendo a la leucemogénesis, junto con alteraciones genéticas. El rol de las alteraciones epigenéticas en el desarrollo de tumores malignos hematológicos se han identificado en los últimos años. Se informó que muchos mecanismos que conducen a la activación o inactivación de genes contribuyen a la formación del tumor.

Por otra parte; la resistencia a fármacos, incluyendo resistencia al inhibidor de tirosin cinasas, se ha convertido en un desafío clínico.<sup>84</sup>

#### 4.4.2 Cuadro Clínico de las Leucemias

Los pacientes que sufren leucemias agudas se presentan con síndromes hemorrágicos, anémico o infiltrativo, aisladamente o en combinación. La hemorragia puede deberse a trombocitopenia por invasión leucocémica de médula ósea o a coagulopatía por consumo como en casos de leucemia promielocítica (LAM-M3). La anemia se debe también a invasión tumoral de médula ósea y habitualmente es más grave en leucemia linfoblástica. De manera interesante la anemia grave es un dato de buen pronóstico en la leucemia linfoblástica infantil. El síndrome infiltrativo supone crecimiento de ganglios, bazo o hígado. Las leucemias con componentes monoblásticos infiltran las encías con mayor frecuencia que las leucemias linfoblásticas. La expansión de la cavidad medular por proliferación celular monoclonal puede causar dolores óseos. Las LAL de linfocitos T con frecuencia generan crecimiento del timo visible en telerradiografías del tórax. Solo la mitad de los enfermos con LA muestra incremento en leucocitos, una cuarta parte tiene cifras de leucocitos en cifras normales y otra cuarta parte presenta disminución leucocitaria, por ende nunca debe descartarse el diagnóstico de LA solo porque el recuento de leucocitos sea normal.<sup>4</sup>

Las alteraciones genéticas que acompañan a la transformación leucémica de una célula suelen ser alteraciones cromosómicas adquiridas. En las LA las células blasticas proliferan en la médula ósea y reemplazan a la celularidad normal de la misma, lo que provoca una disminución de las 3 series hematopoyéticas en sangre periférica (anemia, neutropenia y trombocitopenia). En consecuencia, las LA suelen acompañarse de infección y/o hemorragia. La proliferación de células blasticas en otros órganos se traduce en la presencia de hepatomegalia y/o esplenomegalia o adenopatías.<sup>102</sup>

El síntoma más común de LLA es la fatiga o debilidad, seguido por el dolor óseo o articular, fiebre y pérdida de peso; a menudo el paciente busca atención medica por purpura, hemorragia o infección. Los signos más comunes son: esplenomegalia, adenomegalia, hepatomegalia, y dolor a la presión esternal. Casi todos los pacientes presentan palidez y los niños pequeños (lactantes) manifiestan irritabilidad. Todos los signos clínicos son explicables por la disminución de la hemoglobina, y el hematocrito, y por la trombocitopenia

y la neutropenia acompañantes, además del aumento del porcentaje de blastos en la médula ósea, sangre, bazo, hígado y ganglios. La LLA, también puede llegar a afectar el SNC al momento del diagnóstico, los riñones, los testículos y casi cualquier órgano o sistema, por lo que en ocasiones el cuadro clínico puede ser confuso o simular otra entidad. Los niños menores de dos años de edad pueden presentarse con crecimiento masivo del bazo e hígado, hiperleucocitosis, cromosomopatía 11q23, presencia de linfoblastos en el LCR y respuesta lenta a la quimioterapia. Las complicaciones más graves que los pacientes pueden presentar son la infección y la hemorragia, que son las causas más comunes de muerte. El SNC puede infiltrarse hasta en un 70% de los casos de LLA y en menor grado en la LMA, si no se toman medidas preventivas; si esto ocurre, los pacientes presentan los síntomas y signos de la hipertensión intracraneal, como náusea, vómito y un fondo de ojo anormal.<sup>76, 5</sup>

En el cuadro clínico de LLA del adulto se halla la presencia de masa en el mediastino, observada en una radiografía de tórax, de adolescentes y adultos jóvenes con LLA de estirpe T. Menos del 10% de los casos tiene invasión del SNC al establecer el diagnóstico. Existe mucha similitud en el cuadro clínico de los pacientes con LMA y aquellos con LLA. Casi todos los casos se presentan con un curso agudo y en solo unas cuantas semanas aparece el cuadro clínico típico que se caracteriza por debilidad, síndrome anémico, fenómenos hemorrágicos y fiebre. En esta leucemia el dolor óseo y el crecimiento ganglionar y visceral son menos comunes que en la LLA. El paciente con LMA se deteriora en menos tiempo, se infecta con mayor facilidad y si no se detecta de manera oportuna la enfermedad o con tratamiento adecuado, la mortalidad puede llegar a ser muy alta en las primeras semanas. Este tipo de leucemia tiende de manera menos común a infiltrar el SNC que la linfoblástica, pero puede infiltrar sitios infrecuentes, como las encías, senos paranasales, orbitas o columna vertebral e incluso la piel, algunos de estos pequeños tumores extra medulares se les conoce como cloromas.<sup>76, 8</sup>

**Tabla 3.** Cuadro clínico de pacientes con leucemias agudas (Modificado de Jaime y Gómez, 2012)

SIGNOS	SÍNTOMAS	EXPLORACIÓN FÍSICA
Irritabilidad*	Palidez de piel y mucosas*	Dolor a la presión esternal
Falta de concentración*	Hemorragias	Hepatomegalia
Cefalea	Hipotensión*	Esplenomegalia
Insomnio*	Sudoración*	Adenomegalia
Adinamia y astenia*	Taquicardia*	Crecimiento ganglionar
Dolor óseo o articular	Fiebre	
Perdida de peso	Infiltración	
Nausea**	Hipertensión intracraneal**	
Vómito**	Púrpura	
Fondo de ojo anormal**	Infección	

\*Relacionados con Síndrome Anémico

\*\*Relacionados con infiltración del SNC

En el caso de la leucemia crónica en muchas ocasiones el diagnóstico se efectúa cuando el paciente se encuentra asintomático. En un estudio rutinario, ya que en las BH por regla general se hallan más de 30,000 leucocitos por microlitro y usualmente se encuentran cifras superiores a 100,000. En algunos casos se han observado más de 1,000,000 leucocitos por microlitro. La anemia puede o no existir y cuando se presenta suele ser moderada, las plaquetas suelen estar aumentadas en la mitad de los casos y la trombocitopenia al momento del diagnóstico es excepcional. Los síntomas más frecuentes al momento del diagnóstico son: debilidad, pérdida de peso, hiporexia y molestias abdominales. La aparición de síntomas vagos y que en ocasiones pueden desorientar es lo que lleva al paciente a su primer visita médica; los más comunes son fatiga, pérdida de peso, plenitud abdominal y en ocasiones sangrados o dolor de abdomen. En la exploración física se encuentran: esplenomegalia y hepatomegalia aunque es común encontrar adenomagelia moderada. Se reconoce también purpura o fiebre en menos de la cuarta parte de los pacientes.<sup>4</sup>

Los pacientes con LLC se pueden presentar con un amplio espectro de signos y síntomas, la mayoría de los casos se descubre como hallazgos fortuitos en un BH que muestra

leucocitosis con linfocitosis en individuos asintomáticos. En otros pacientes el diagnóstico se realiza al estudiar manifestaciones como astenia, y adenopatías y un aumento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas (neumonías) o virales, en las que se incluye el herpes simple o zoster. Además, no es rara la hemorragia mucocutánea. Los datos físicos varían desde una exploración normal hasta la presencia de linfadenopatía local o generalizada, así como hepatomegalia o esplenomegalia que resulta de la infiltración progresiva por leucocitos, de manera habitual la LLC se presenta con adenomegalia cervical, sin embargo como la enfermedad progresa la adenomegalia se generaliza. En ocasiones se puede hallar infiltración a órganos no linfoides como la próstata, el riñón o la pleura. Las complicaciones más frecuentes en los pacientes con LLC son las infecciones o fenómenos autoinmunes como anemia hemolítica autoinmune y púrpura trombocitopénica inmunológica, la transformación en leucemia prolinfocítica o un linfoma de células grandes o la aparición de segundas neoplasias.<sup>76</sup>

En el caso de la LGC los pacientes se diagnostican en la fase crónica, ya que los síntomas iniciales son inespecíficos como astenia, hiporexia, pérdida de peso, febrícula y diaforesis nocturna. Puede haber manifestaciones relacionadas con la esplenomegalia, como dolor en el hipocondrio izquierdo, sensación de plenitud posprandial o ambas cosas. En algunas ocasiones hay pacientes que refieren dolor óseo, hemorragia, gota y litiasis renal. En la exploración física el dato más frecuente es la esplenomegalia.<sup>76</sup>

**Tabla 4.** Cuadro clínico de pacientes con leucemias crónicas (Modificado de Jaime y Gómez, 2012)

SIGNOS	SÍNTOMAS	EXPLORACIÓN FÍSICA
Debilidad*	Púrpura	Esplenomegalia
Pérdida de peso	Fiebre	Hepatomegalia
Hiporexia	Infecciones virales o bacterianas	Linfadenopatía
Molestias abdominales	Hemorragias mucocutáneas	
Astenia*	Infiltración	
Dolor óseo		

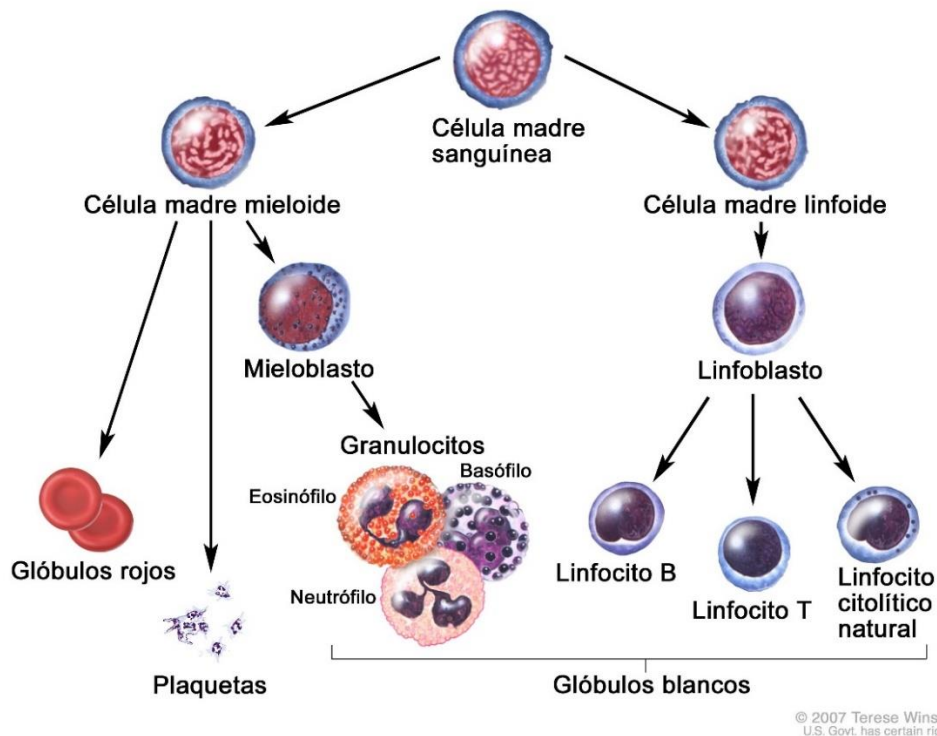
\*Anemia moderada

Con mayor frecuencia, los pacientes con CLL son asintomáticos en el momento del diagnóstico y son conscientes de la enfermedad después de la detección de linfocitosis en un recuento sanguíneo de rutina. Sin embargo, CLL puede tener una gama de

presentaciones clínicas; Algunos pacientes se sienten bien y están plenamente activos, pero una minoría tiene síntomas relacionados con la enfermedad. Los síntomas habituales de CLL incluyen fatiga, pérdida involuntaria de peso, sudoración nocturna excesiva, plenitud abdominal con saciedad temprana y aumento de la frecuencia de infecciones, que podrían estar asociadas con hipogammaglobulinemia. Algunos pacientes pueden presentar síntomas de una citopenia autoinmune (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmune o púrpura trombocitopénica inmune). Los pacientes también pueden tener o desarrollar ganglios linfáticos agrandados, hepatomegalia y esplenomegalia, que son palpables en el examen físico. Los ganglios linfáticos agrandados pueden ser fácilmente palpables en tres sitios: las regiones cervical, axilar e inguino-femoral.<sup>82</sup>

#### 4.4.3 Clasificación de Leucemias

A pesar de que las leucemias inicialmente se clasificaron en agudas y crónicas por su tiempo de aparición, en la actualidad, gracias al conocimiento de la biología molecular de cada una de ellas, sabemos que son entidades distintas derivadas cada una de una célula hematopoyética tumoral. Y esta clasificación se debe a la gravedad de la patología:

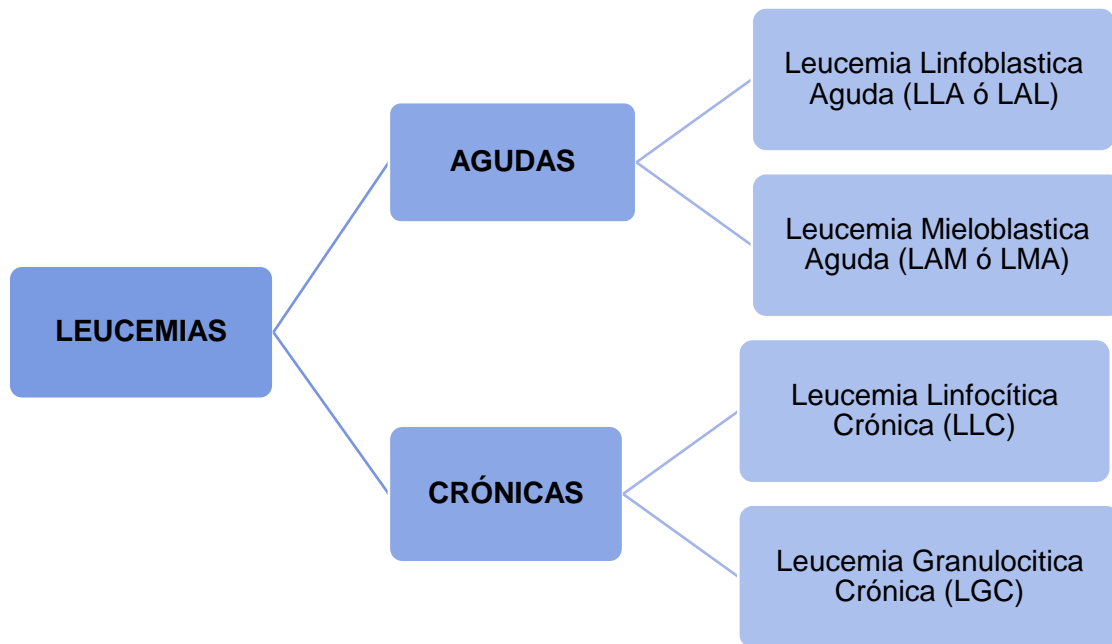


**Figura 12.** Diferenciación mieloide y linfoide de las células sanguíneas.<sup>115</sup>

**Aguda:** se da un aumento muy rápido de las células sanguíneas inmaduras. Estas células no realizan las funciones sanguíneas necesarias. La progresión celular y la dispersión de las células malignas puede conducir a que la leucemia llegue a otros órganos. Esta es la leucemia que es más común en niños. Las leucemias agudas (LA) constituyen un grupo heterogéneo de hemopatías con diferente etiología, patogenia, historia natural y pronóstico. Con su clasificación se ha intentado reducir dicha heterogeneidad e identificar subgrupos biológicamente diferentes y con distintas opciones terapéuticas, lo que ha permitido mejorar el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.<sup>102</sup>

**Crónica:** se producen demasiados leucocitos maduros pero anormales. Progresan durante meses o años y aunque pueden ocurrir en cualquier grupo de edad, la leucemia crónica ocurre más a menudo en personas mayores.

**Diagrama 2.** Clasificación general de las leucemias (Diagrama de elaboración propia).



#### 4.4.3.1 Agudas

Las leucemias agudas (LA) 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 leucémica es un precursor que pierde la capacidad de seguir su proceso normal de maduración. Las leucemias agudas son un grupo heterogeno de padecimientos que suponen la proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a los cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. Las células malignas individuales maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular a menudo es prolongado y la mayoría de dichas células incompetentes sobreviven más que las normales.<sup>4, 103</sup>

La leucemia se clasifica de acuerdo con la célula de la cual se origina y que se denomina blasto. Se reconocen dos grandes familia de leucemia aguda: linfoblástica (LAL) y mieloblástica (LAM).<sup>76</sup>

#### **4.4.3.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LAL)**

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una transformación maligna y proliferación de células progenitoras linfoides en la médula ósea, sangre y sitios extramedulares. Mientras que el 80% de ALL ocurre en niños, representa una enfermedad devastadora cuando ocurre en adultos. Es grupo de enfermedades heterogéneo y variable en presentación, morfología, inmunología, citogenética, bioquímica, etc. Las características iniciales del enfermo con LAL, permiten predecir con cierta seguridad la respuesta a la terapia y las probabilidades de supervivencia prolongada o curación. Además en el pronóstico del paciente influyen también: edad, sexo, estado nutricional y raza. Se acepta que la edad, sexo, estado nutricional y el recuento leucocitario son datos muy importantes, seguidos de la estirpe T o B de la leucemia y los cambios cromosómicos en un cariotipo de medula ósea. Conocer el inmunofenotipo del tipo de blasto permite separar a las leucemias tipo T y B. La leucemia tipo T tiene un tratamiento menos agresivo y las LAL con antígenos mieloides son de mal pronóstico. La presencia del BCR/ABL en las LAL supone un peor pronóstico y un tratamiento diferente. La LAL es la enfermedad más importante en la hematooncología pediátrica, dado que es la neoplasia más común en menores de 15 años, grupo que constituye el 30% de todos los cánceres. Este padecimiento afecta de modo predominante al género masculino.<sup>4, 76,82</sup>

Las LAL se presentan en tres variantes morfológicas definidas: L-1, L-2 y L-3. La diferencia entre un grupo y otro se basa en el tamaño, el grado de maduración del núcleo y la presencia de nucléolos y vacuolas.<sup>76</sup>

**Tabla 5.** Clasificación morfológicas de las leucemias agudas linfoblásticas (Modificada de Ruíz, 2009)

<b>LA-L1 (LAL-L1)</b>	Linfoblástica típica. La más uniforme de todas y menos indiferenciada. Células pequeñas y escaso citoplasma.
<b>LA-L2 (LAL-L2)</b>	Linfoblástica atípica. Linfoblastos de tamaño variable, nucléolos más evidentes y menos diferenciados.
<b>LA-L3 (LAL-L3)</b>	Parecidas al linfoma de Burkitt. Células grandes, indiferenciadas, nucléolos notorios y numerosas vacuolas.

Esta fue la clasificación propuesta por la FAB, sin embargo la morfología ofrece poca objetividad y numerosas variantes en la interpretación; no revela con claridad las características biológicas de la célula y es poco útil para poder predecir con certeza el pronóstico de la enfermedad; por ello se ha clasificado a las LAL en subtipos, no solo de acuerdo con criterios morfológicos, sino también su origen inmunológico y las características genéticas de la diferenciación del linfoblasto.<sup>76</sup>

La patogénesis de LAL implica la proliferación anormal y diferenciación de una población clonal de células linfoides. Estudios en la población pediátrica ha identificado síndromes genéticos que predisponen a una minoría de casos de LAL, como el síndrome de Down, Anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia telangiectasia y Síndrome de descomposición de Nijmegen. Otros factores predisponentes son la exposición a radiaciones ionizantes, plaguicidas, ciertos disolventes o virus tales como el virus de Epstein-Barr y la inmunodeficiencia humana, sin embargo, en la mayoría de los casos, aparece como de novo en individuos previamente sanos. Las aberraciones cromosómicas son el sello distintivo de LAL, pero no son suficientes para que se desarrolle la leucemia. Las translocaciones características incluyen t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(1; 19) [TCF3-PBX1], t(9;22) [BCR-ABL1] y reordenamiento de MLL.<sup>82</sup>

La primer clasificación de LLA fueron de acuerdo con los criterios morfológicos de la FAB que dividieron todos en 3 subtipos (L1, L2 y L3) basados en el tamaño de la célula, citoplasma, nucléolos, vacuolación y basofilia. En 1997, la Organización Mundial de la Salud

propuso una clasificación compuesta para intentar explicar la morfología y perfil citogenético de las ráfagas leucémicas e identificaron tres tipos de LLA: B linfoblástico, T linfoblástico y Leucemia de células de Burkitt. Posteriormente en 2008, la leucemia de células de Burkitt fue eliminado ya que ya no se ve como una entidad separada del linfoma de Burkitt y la leucemia linfoblástica B se dividieron en dos subtipos: B-ALL con anomalías genéticas recurrentes y B-ALL no se especifica de otra manera. B-ALL con anomalías genéticas recurrentes se delimita más en base a los rearrreglos cromosómico específicos. En 2016, dos nuevas entidades provisionales se agregaron a la lista de anomalías genéticas recurrentes y la hipodiploidia se redefinió como baja hipodiploidia o hipodiploidia con mutaciones TP53. En adultos, las leucemias de células B representan el ~ 75% de todos los casos mientras que la LLA de células T comprende el número de casos restantes.<sup>83</sup>

**Tabla 6.** Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda de acuerdo con las anomalías genéticas recurrentes (Modificada de Terwilliger y Abdul-Hay, 2017).

Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, no especificado de otra forma
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con anomalías genéticas recurrentes
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con hipodiplidia
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con hiperdiploidia
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con t(9;22)(q34;q11.2)(BCR-ABL1)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con t(v;11q23)(MLL rearrreglo)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con t(12;21)(q23;p13.3)(TCF3-PBX1)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con t(5;14)(q31;q32)(IL-IGH)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con amplificación intracromosomal del cromosoma 21 (IAMP21)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células B, con translocación que involucra tirosin-quinasa o receptores de citocinas (BCR-ABL1-como ALL)
Linfoma/Leucemia linfoblástica de células T
Linfoma/ Leucemia de precursores de células T tempranas

#### 4.4.3.1.2 Leucemia Mieloblástica Aguda (LAM)

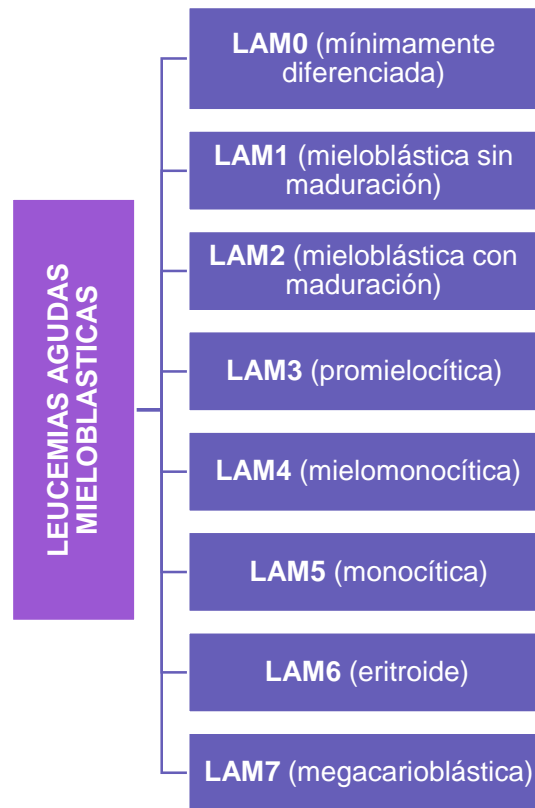
La AML es un trastorno hematológico caracterizado por una proliferación de células mieloides indiferenciadas en la médula ósea que se infiltran en el hígado, el bazo, los ganglios y sangre periférica. Este tipo de cáncer progresa rápidamente y es relativamente

mortal debido a la genética y/o aberraciones citogenéticas. La recaída es la principal razón para una supervivencia deficiente y ocurre hasta en un 80% de los pacientes con LMA.<sup>96</sup>

En 1976, fueron propuestos por un grupo internacional de investigadores (francés, estadounidenses y británicos) los criterios para realizar la clasificación morfológica de las leucemias agudas, que las dividid en 9 tipos, tres de estirpe linfoide y seis de estirpe mieloide. El desarrollo de esta clasificación franco-americana-británica (FAB) fue estimulada por la necesidad de un esquema que unificara los criterios morfológicos y sirviera para correlacionarlos con el pronóstico de la enfermedad, Algunos años más tarde y ante el cúmulo de información generada por el uso de inmunorreactivos para estudiar y clasificar a las células leucémicas, los miembros del FAB agregaron a esta clasificación inicial dos variedades más de leucemia mieloblástica (M0 y M7), las cuales estrictamente no pueden ser diagnosticadas solo con bases puramente morfológicas, ya que requieren estudios adicionales para ser definidas.<sup>4</sup>

Cuando el precursor hematopoyetico es de origen mieloide, se desarrolla una leucemia aguda mieloide (LAM). La clasificación de las LA más ampliamente utilizada ha sido la del Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB). El grupo cooperativo FAB diferenció las siguientes variedades morfológicas de LAM:<sup>103</sup>

**Diagrama 3.** Clasificación general de las leucemias agudas mieloblásticas (Diagrama de elaboración propia).



**LAM-M0.** La LAM mínimamente diferenciada o LAM0 tiene una gran dificultad diagnóstica desde el punto de vista morfológico, dado que los blastos presentan rasgos morfológicos linfoides y mieloides<sup>12</sup>. Constituye únicamente el 5% de las LAM en el adulto y tiene un mal pronóstico. Miembros del grupo FAB, utilizando citología ultraestructural y anticuerpos monoclonales, demostraron que algunos casos con una cifra inferior al 3% de blastos mieloperoxidasa (MPO) positivos clasificados como leucemias agudas linfoides (LAL) eran en realidad LAM con signos mínimos de maduración. En el estudio inmunofenotípico al menos un marcador mielóide (MPO citoplasmática, CD13 o CD33) es positivo en los blastos. Los marcadores linfoides son negativos (CD3, CD22, CD79a).<sup>103</sup>

**LAM-M1:** La leucemia aguda mielóide sin maduración suele observarse un monomorfismo celular, con presencia en sangre periférica (SP) de blastos mieloides (43%) en ausencia de otras células en estadios posteriores al mieloblasto. Los blastos son de tamaño mediano, con elevada relación núcleo-citoplasma (N/C), contorno nuclear redondeado, núcleo de

cromatina laxa e inmadura con presencia de uno o varios nucléolos prominentes. Los blastos pueden presentar una fina granulación azurofila, o algún bastón de Auer visible en el citoplasma, y una cifra superior al 3% de las células blasticas son MPO positivas. En el estudio inmunofenotípico se demuestra que los blastos expresan antígenos mieloides (CD33 y CD13) y pueden expresar también el antígeno CD34.<sup>103</sup>

**LAM-M2.** Constituye alrededor del 30% de todos los casos de LAM y muestra células en estadios madurativos posteriores al mieloblasto (promielocitos, mielocitos y neutrófilos) en un porcentaje superior al 10%. El tamaño de los blastos en la LAM2 es de pequeño a mediano, con una elevada relación N/C y un perfil nuclear redondeado, que a veces adopta una posición cuadrangular respecto al citoplasma. El núcleo muestra una cromatina laxa e inmadura, con uno o varios nucléolos visibles. El citoplasma es basófilo y puede contener ocasionalmente algún bastón de Auer. Los blastos de la LAM2 son positivos para la MPO y el Negro sudan B, y expresan los antígenos CD34, HLA-DR, CD13 y CD15. Una tercera parte de las LAM2 se asocian a t(8;21). Los casos de LAM2 con esta alteración citogenética presentan una supervivencia más prolongada y constituyen un subtipo de LAM con anomalías citogenéticas recurrentes según la clasificación de la OMS. Otras alteraciones son deleciones o translocaciones a nivel del cromosoma 12, y la t(6;9). Una asociación menos frecuente es la t(8;16)(p11;p13) y la alteración citogenético más común en este tipo de leucemia es la t(8:21) (q22.1;q22.3).<sup>4,103</sup>

**LAM-M3.** Las células que proliferan muestran una morfología muy característica y se denominan promielocitos atípicos (hipergranulares). Puede cursar con accidentes hemorrágicos muy graves por coagulación intravascular diseminada. El núcleo suele ser de aspecto monocitoide (reniforme) y con un perfil bilobulado con la presencia de una hendidura amplia, o bien de perfil irregular. El citoplasma es poco basófilo debido al elevado contenido de granulación azurofila. Algunos de los promielocitos atípicos contienen además inclusiones citoplasmáticas cristalinas alargadas o astillas, específicas de este tipo de leucemia. La alteración citogenética característica en este tipo de LAM es T(15;17) (q22;q11.2) que provoca la fusión del oncogen PML (promyelocytic leukemic gen) con el gen del receptor del ácido retinoico (RARa), con el resultado de la formación del transcrito PML-RARa. Para detectar la t(15;17) se utilizan técnicas citogenéticas, de hibridación in situ y de biología molecular. Estas últimas identifican específicamente el transcrito PML-RARa en todos los casos de LAM3 que responden al tratamiento con ATRA (ácido trans-

retinoico). El ATRA induce la maduración de las células leucémicas (a promielocitos, mielocitos y neutrófilos).<sup>4,103</sup>

**LAM-M4.** Tiene un componente granulocítico y otro monocítico, en proporciones variables y con diversos grados de maduración. Los blastos monocíticos son de gran tamaño, moderada relación N/C y basofilia variable. El núcleo puede ser redondeado, arriñonado o de forma irregular. Los nucléolos acostumbran a ser prominentes. De las alteraciones únicas en LAM-M4, pueden señalarse la t(4:11) (q21;q23).<sup>4,103</sup>

**LAM-M5.** Constituye alrededor de un 15% del total de LAM. Las células leucémicas son de estirpe monocítica (monoblastos y promonocitos). La LAM5 incluye 2 subtipos:

1. LAM5a o leucemia aguda monoblástica, en la que predominan los monoblastos.
2. LAM5b o leucemia aguda monocítica, en la que junto a los monoblastos se observa una elevada proporción de promonocitos y monocitos.

El subtipo LAM5a constituye alrededor de un 5–8% de las LAM. Los elementos blasticos son de gran tamaño, con un núcleo de perfil redondeado de cromatina laxa e inmadura (1–3 nucleolos), y un citoplasma moderadamente amplio e intensamente basófilo. En el citoplasma es posible observar algún bastón de Auer y/o prolongaciones o mamelones.<sup>103</sup>

En la LAM5b (3–6% de las LAM) los promonocitos presentan un núcleo de perfil redondeado o arriñonado, y un citoplasma menos basófilo, con mayor contenido de granulación que los monoblastos y con la presencia de alguna vacuola. La observación de eritrofagocitosis junto a blastos monocíticos sugiere la existencia de una t(8;16).<sup>103</sup>

La forma monoblástica suele asociarse a la t(9;11), la t(6;11) o la t(8;16) y también es frecuente el reordenamiento 11q23 (LAM con anomalías genéticas recurrentes según la OMS), la trisomía 8 y la monosomía 7.<sup>103</sup>

**LAM-M6.** Ha sido definida por la clasificación FAB como una proliferación de elementos eritroides displásicos, junto a una proliferación de elementos blasticos de origen mieloide.

Se ha categorizado en dos subtipos:

1. La eritroleucemia (LAM6a), con una proliferación blástica mixta mieloide y eritroide.

2. La LAM6 variante o leucemia eritroide pura (LAM6b) según la clasificación de la OMS. Y Las anomalías cromosómicas se sitúan frecuentemente en los cromosomas 5 y 7.

**LAM-M7.** Representa un 3–5% de las LAM. Los blastos muestran un aspecto morfológico muy inmaduro, y son muy polimórficos. El núcleo es excéntrico, de cromatina laxa y reticulada y con 1–3 nucléolos prominentes. El citoplasma es basófilo, agranular y muestra un aspecto muy similar a las plaquetas circulantes. Y la t(1;22)(p13;q13) es frecuente en niños menores de 1 año.<sup>103</sup>

La respuesta al tratamiento en las LAM es mejor en pacientes que no presentan alteraciones cromosómicas; entre estas, las de mayor significado pronóstico son: la translocación (15;17)(q22;q11.2) de la LAM-M3 (promielocítica), que produce el gen quimérico PML/RAR- $\alpha$  (promyelocytic leukemia/retinoid acid receptor alpha); la translocación (8:21) de la LAM-M2 que da lugar al gen quimérico AML1/ETO; y la inversión del cromosoma 16 (inv16) de la leucemia mielomonoblastica con eosinofilia (LAM-M4Eo). La presencia de cualquiera de estas tres alteraciones genéticas en la LAM se asocia con un pronóstico menos sombrío, con mayor probabilidad de lograr la remisión y con supervivencia más prolongada. En las LAM, otros marcadores moleculares de valor pronóstico favorable y de respuesta al tratamiento son los biomarcadores CBF-AML, NP-1 y CEBPA, entre otros. Por otro lado, los biomarcadores FLT3-ITD (identificado en el 20% de los pacientes con LAM), WT1, RUNX1 y TET2 se asocia con un valor pronóstico pobre y de poca respuesta al tratamiento.<sup>4</sup>

Según la organización mundial de la salud, la clasificación introduce algunos cambios que tienen en cuenta nuevos conceptos en la biología de las LAM, especialmente a nivel citogenético, inmunológico y molecular:<sup>103, 86</sup>

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 categorizadas previamente, que incluyen:

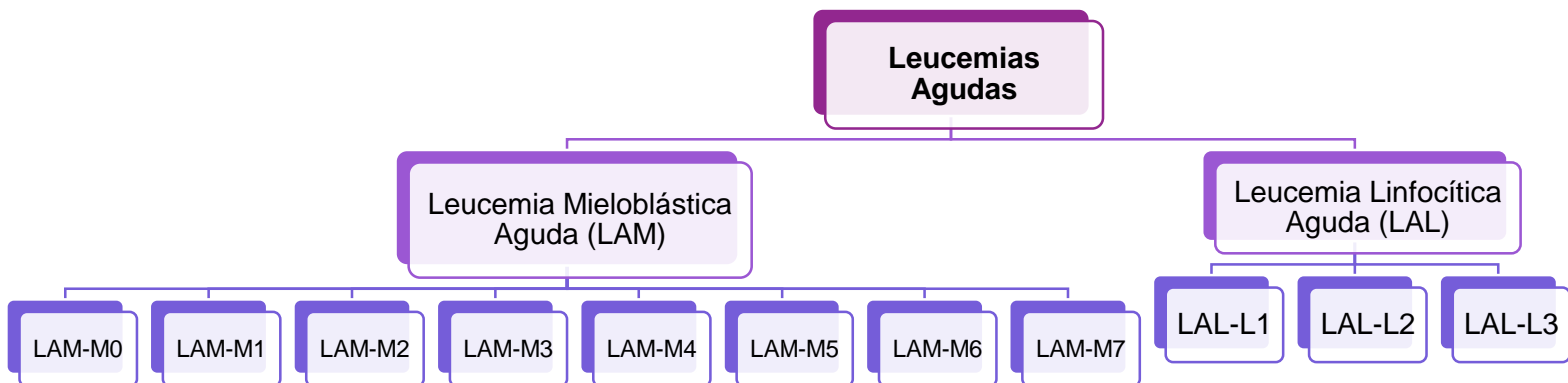
- a) Subtipos de la clasificación FAB.
- b) Leucemia aguda basofílica.
- c) Panmielosis aguda con mielofibrosis.

V) Sarcoma mieloide.

VI) Proliferaciones mieloides en relación con el síndrome de Down.

VII) Neoplasias de células blásticas dendríticas plasmocitoides.

**Diagrama 4.** Clasificación morfológica de las Leucemias Agudas (FAB).  
(Diagrama de elaboración propia)



#### 4.4.3.2 Crónicas

##### Síndromes Mielodisplásicos

Las neoplasias mieloproliferativas crónicas o síndromes mielodisplásicos son enfermedades clonales, es decir, que provienen de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial. Esta célula es la responsable de la proliferación, autorrenovación y diferenciación de tres líneas celulares que provienen de la médula ósea en un individuo normal: eritroide, mieloide y megacariocítica. Estas enfermedades se caracterizan por la

proliferación celular excesiva y desordenada, que da lugar a un número aumentado de eritrocitos, granulocitos y plaquetas, respectivamente. La clasificación de los síndromes mielodisplásicos se da de acuerdo a la presencia o ausencia del CrPh1, origen genético de la LGC. Los síndromes mielodisplásicos clásicos que no presentan esta alteración cromosómica son: policitemia vera, trombocitosis esencial y mielofibrosis primaria. Aunque difieren en la estirpe celular predominante, estas neoplasias comparten algunas características, como la proliferación aumentada de células maduras, un curso frecuentemente indolente y un potencial variable de progresión y transformación maligna.<sup>4</sup>

#### **4.4.3.2.1 Leucemia granulocítica crónica (LGC)**

La LGC consiste en una proliferación neoplásica predominante de la serie granulocítica; sin embargo, se observan alteraciones en la serie roja y en las plaquetas, lo cual indica que el origen de la entidad parte de la célula troncal o pluripotencial (stem cell). Esta enfermedad se ha relacionado con una anomalía cromosómica (translocación del cromosoma 22 al 9; t:9q+: 22q-) que se denomina cromosoma Philadelphia (CrPh1), la cual se observa en más del 90% de los pacientes. La célula proliferante no es una en especial, como en el caso de las leucemias agudas, sino prácticamente todas las células hematopoyéticas, si bien predomina la serie granulocítica. La medula ósea de hecho es de poca utilidad para el diagnóstico, ya que solo se observa hiperplasia granulocítica, la cual es inespecífica en ausencia de un cuadro clínico y de laboratorio característico. El hallazgo más consistente es la presencia de CrPh1. Esta translocación condiciona la aparición de un gen quimérico BCR-ABL, el cual se asocia a una tirosin-cinasa que otorga ventajas proliferativas a la célula leucémica. Esta proteína de fusión o gen quimérico puede ser detectado mediante técnicas de biología molecular como la PCR. Encontrar este gen equivale a encontrar al CrPh1. En el 90% de los pacientes se halla el cromosoma Philadelphia, mientras que en otro 5% solo se encuentra el gen quimérico sin detectar la translocación cromosómica, y en el 5% restante simplemente la enfermedad no es LGC, aunque lo parezca.<sup>4</sup>

#### **4.4.3.2.2 Leucemia linfocítica crónica (LLC)**

La LLC es una neoplasia hemática que se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos de aspecto relativamente maduro o normal. Esta leucemia se origina en el 90% de los casos en linfocitos de tipo B. La LLC es la leucemia más común en Estados Unidos mientras que en México es muy escasa, aunque si se observa ocupa el penúltimo lugar en casos de leucemias, ya que la última es la tricoleucemia. La LLC aparece de manera típica

en individuos mayores de 50 años, es muy poco frecuente en menores de 35 años e inexistente en niños. En México el diagnóstico casi siempre se efectúa de manera tardía y en muchos casos es posible que el paciente fallezca sin que se le haya el diagnóstico, ya que la enfermedad es de curso indolente y menos notoria, que, por ejemplo el mieloma múltiple. En la LLC proliferan linfocitos morfológicamente indistinguibles de los normales; se han descrito algunas variantes del padecimiento y en esos casos se observan linfocitos anormales con grandes nucléolos, como en la llamada leucemia prolinfocítica. En los casos de LLC los órganos afectados casi de forma exclusiva son aquellos en los que normalmente se encuentra tejido linfoide, como sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo. Existe supervivencia prolongada de linfocitos y en consecuencia acumulación de linfocitos en los órganos señalados. Es una enfermedad poco agresiva e indolente, por lo que los síntomas que presentan los pacientes son inespecíficos. En muchas ocasiones el diagnóstico se efectúa por hallazgos de laboratorio y sin haber sospechado de la entidad, por lo que la linfocitosis en un BH de un paciente asintomático con frecuencia constituye el dato inicial que lleva al diagnóstico.<sup>4</sup>

#### **4.4.4 Epidemiología de las Leucemias**

El perfil de mortalidad por Cáncer en las naciones menos desarrolladas presenta todavía un claro patrón ascendente. México no es la excepción y las tasas de mortalidad por Cáncer muestran una marcada tendencia creciente en las últimas décadas, lo cual constituye un enorme reto para las instituciones de salud.<sup>34</sup>

Una de las enfermedades de mayor incidencia en la población mundial es el cáncer. Este padecimiento se da a raíz del crecimiento descontrolado de las células al alterarse los mecanismos de división y muerte celular, lo que genera el desarrollo de tumores o masas anormales, las cuales se pueden presentar en cualquier parte del organismo, dando lugar a más de 100 tipos de cáncer que se denominan según la zona de desarrollo. En 2012, la OMS señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago. Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado (WHO, 2015).<sup>35</sup>

**Tabla 7.** Tasa de morbilidad Hospitalaria por principales tumores malignos de la población de 20 años y más, estadísticas establecidas por el INEGI. (Modificada de INEGI, 2017)

Por cada 100 mil habitantes en cada grupo de edad								
Tumor maligno	Grupo de edad							
	20-29	30-39	40-49	50-59	60-64	65-74	75-79	80 y más
<b>HOMBRES</b>								
Células germinales (Testículos)	28	18	6	3	3	3	2	3
Órganos hematopoyéticos	17	13	17	22	26	40	49	37
Sistema linfático y tejidos afines	11	12	16	28	44	51	57	47
Órganos digestivos	4	13	36	80	141	195	200	149
Órganos respiratorios e intratorácicos	2	3	7	21	46	82	105	76
Órganos genitales masculinos	0.63	1	4	23	65	148	206	155
Mama	0.41	0.57	2	3	4	8	9	6
<b>MUJERES</b>								
Órganos genitales femeninos	13	39	67	90	105	100	85	80
Órganos hematopoyéticos	11	10	16	22	26	32	27	25
Mama	7	40	125	203	218	209	156	95
Sistema linfático y tejidos afines	7	8	11	22	32	43	48	35
Células germinales (ovario)	5	9	25	40	41	41	28	18
Órganos digestivos	4	10	32	69	106	134	150	118
Órganos respiratorios e intratorácicos	0.76	2	4	12	17	28	42	24

En los varones se observa que el cáncer de órganos digestivos es el que tienen mayor porcentaje de morbilidad hospitalaria en la población de 20 años y más de edad con cáncer, mientras que en las mujeres, el de mama es el tipo de cáncer cuyas tasas de morbilidad hospitalaria muestran los mayores incrementos con la edad.<sup>35</sup>

La leucemia es la segunda enfermedad hematológica más frecuente en el mundo, sólo después del Linfoma de Hodgkin; ocupa el 11 lugar entre las neoplasias de mayor incidencia a nivel mundial y representan un el 3.09% del total de los casos de cáncer.<sup>2</sup>

A nivel mundial, las leucemias son el cáncer de mayor frecuencia en la población de 0 a 14 años. Aunque esta condición puede ser potencialmente mortal por la alteración en los componentes sanguíneos y la generación de hemorragias, en los últimos 30 años los avances tanto en su detección temprana como en su tratamiento oportuno han logrado que 90% de los casos tengan curación.<sup>34</sup>

En los últimos años, México ha tenido un incremento significativo de las enfermedades crónico degenerativas. En la actualidad la leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común de la infancia y en México se ha reportado una de las mayores tasas de incidencia de América Latina. Cabe recordar que la edad es una de las variables clínicas que afecta por sí sola al pronóstico. Tomando en cuenta los datos de morbilidad hospitalaria por tumores malignos (egresos hospitalarios) se observa que durante 2014, el cáncer en órganos hematopoyéticos es el de mayor presencia en hombres (59.2%) y mujeres (61.1%) que tienen menos de 20 años de edad. En los varones, el segundo lugar lo ocupan los tumores malignos del sistema linfático y tejidos afines (8.6%), seguido del de hueso y cartílagos articulares (6.8 por ciento), el cual ocupa el segundo lugar entre las mujeres (6%), mientras que en tercer lugar para ellas están las neoplasias del sistema linfático y tejidos afines, y las del encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (ambos con 5.9 por ciento).<sup>35</sup>

**Tabla 8.** Tasa de morbilidad Hospitalaria por principales tumores malignos de la población menos de 20 años, estadísticas establecidas por el INEGI (Modificada de INEGI, 2017)

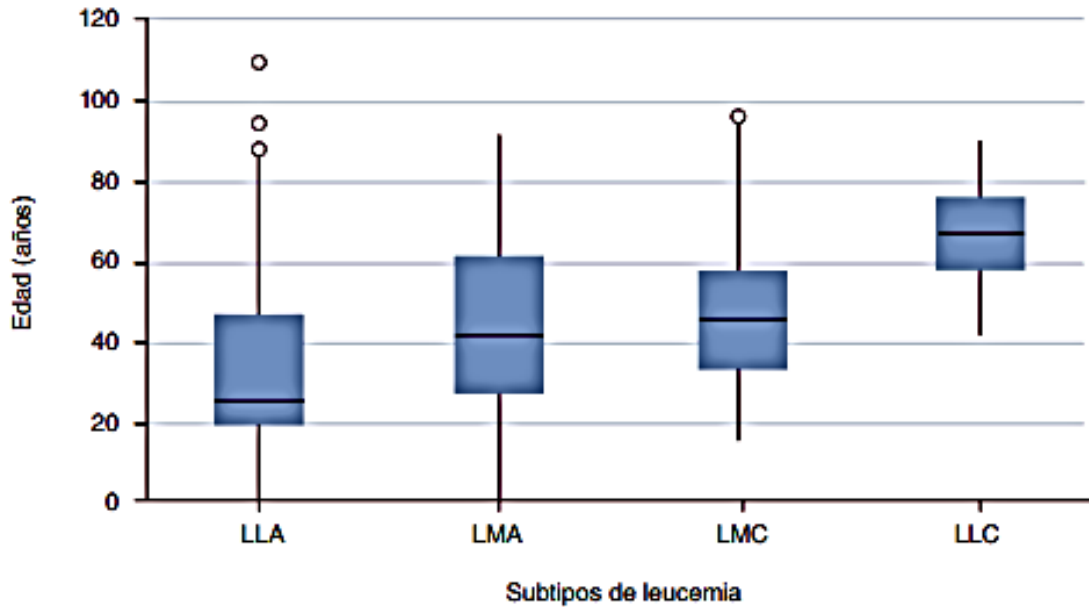
Por cada 100 mil habitantes en cada grupo quinquenal de edad				
Tumor maligno	Grupo de edad			
	0-4	5-9	10-14	15-19
<b>HOMBRES</b>				
Órganos hematopoyéticos	59	79	63	42
Encéfalo y otras partes de SNC	6	7	7	4
Vías urinarias	5	2	0.84	0.43
Sistema linfático y tejidos afines	5	11	11	8
Células germinales (testículos)	2	0.33	1	13
Huesos y de los cartílagos articulares	1	6	10	10
<b>MUJERES</b>				
Órganos hematopoyéticos	45	80	50	25
Vías urinarias	5	3	1	0.23
Encéfalo y otras partes de SNC	5	7	5	2
Sistema linfático y tejidos afines	4	4	5	6
Huesos y de los cartílagos articulares	0.83	3	9	6
Células germinales (ovario)	0.57	1	2	4

Con datos de 2014 se tiene que la tasa de mortalidad por principales tumores malignos más alta en la población con menos de 20 años, es la que corresponde al tumor maligno de órganos hematopoyéticos (tres defunciones por cada 100 mil habitantes). Por sexo, los hombres superan ligeramente a las mujeres (tres contra dos defunciones por cada 100 mil habitantes para cada sexo). El resto de las neoplasias malignas analizadas presentan tasas de mortalidad menores.<sup>35</sup>

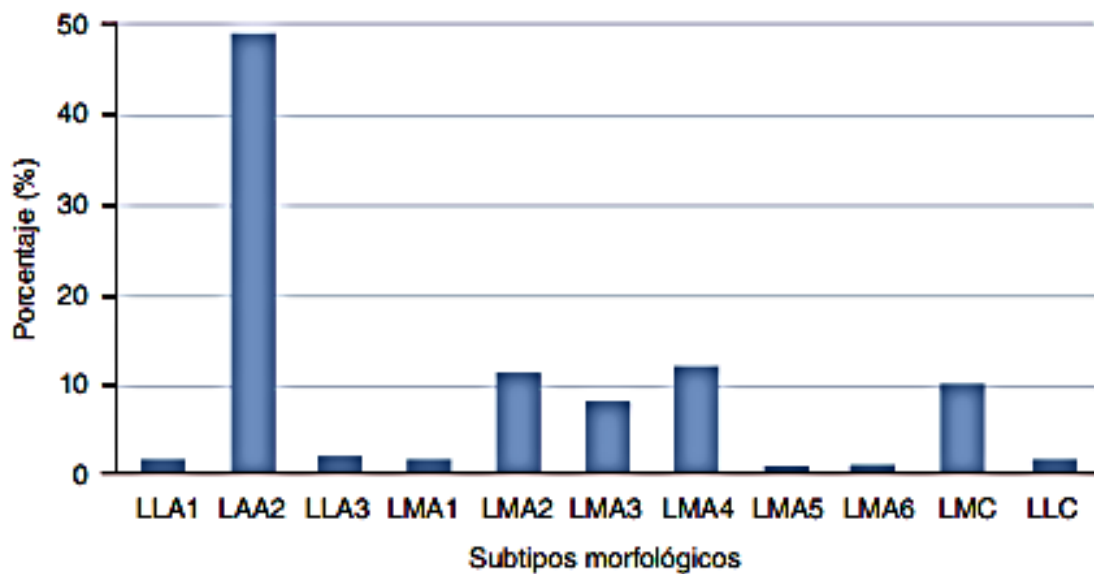
Gracias a los grandes registros poblacionales de cáncer, conocemos el patrón epidemiológico de las LLA que suelen afectar principalmente a los varones, con picos de incidencia durante las etapas tempranas de la infancia y la adolescencia, mientras que las leucemias mieloides agudas y las leucemias crónicas, en general, se esperan en pacientes de edad avanzada, principalmente en los mayores de 70 años.<sup>56</sup>

Este patrón se basa mayormente en datos provenientes de países desarrollados. México, al no contar con un registro poblacional hasta el día de hoy, importa los datos

epidemiológicos de la Organización Mundial para la Salud (OMS), o, en el mejor de los casos, provienen de reportes sobre la experiencia y lo observado en una institución, en su mayoría hospitales de concentración ubicados en la Ciudad de México.<sup>56, 35</sup>



**Gráfico 1.** Rango de edad entre los diferentes subtipos de Leucemia (INEGI, 2017)



**Gráfico 2.** Frecuencia en porcentaje de los principales subtipos morfológicos de Leucemia (INEGI, 2017)

Según un estudio publicado en la Gaceta Médica realizado en Febrero de 2015, la leucemia que se atendió con mayor frecuencia en el Hospital General de México y en el Hospital de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia, perteneciente al ISSSTE fue la LLA y la variedad morfológica FABL2 fue la más frecuente. La variedad de leucemia mieloide más frecuente fue la variante M4 (leucemia mielomonocítica).<sup>56</sup>

La LGC en México es menos común que la LA, pero más frecuentes que la LLC; esto es muy diferente de lo que ocurre en los países anglosajones, donde la LLC es mucho más frecuente. Se puede observar a cualquier edad, pero en los niños constituye un 3% de las leucemias en general. Su frecuencia aumenta gradualmente y predomina en adultos entre los 40 y 60 años y es más frecuente en hombres que en mujeres con una relación de 3:2.<sup>2</sup>

Internacionalmente se reporta la edad de presentación de las leucemias mieloides durante la séptima década de la vida: 69 años para las agudas y 64 para las crónicas. En cuanto a la variedad linfocítica crónica, el género masculino se mostró principalmente afectado (60% de los casos). Estos datos son constantes en la mayoría de los registros de pacientes con leucemia linfocítica crónica, y esto es de gran relevancia, ya que, acorde a diversos estudios poblacionales, tanto la respuesta como la severidad de la enfermedad son menores en pacientes del género femenino que en pacientes del género masculino (83 vs. 71%).<sup>57, 58</sup>

**Tabla 9.** Tasa de morbilidad por principales tumores malignos de la población de 20 años y más según sexo, estadísticas establecida por el INEGI (Modificada de INEGI, 2017)

Por cada 100 mil habitantes en cada grupo quinquenal de edad			
Tumores Malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	33	35	31
Encéfalo y otras partes de SNC	10	14	7
Órganos respiratorios e intratorácicos	16	18	13
Órganos genitales masculinos/femeninos	8	0.15	15
Mama	8	0.15	16
Sistema linfático y tejidos afines	4	5	3
Células germinales (testículos u ovarios)	4	1	6



De acuerdo a lo anterior las leucemias se posicionan como la tercer causa de muerte por cáncer en México en 2017.

## 5. Diagnóstico y Tratamiento de las Leucemias

Las malignidades hematológicas se generan por alteraciones hematopoyéticas e incluyen leucemias, linfomas, mielomas, anemia aplásica (AA), síndromes mielodisplásico (MDS) y trastornos mieloproliferativos crónicos (CMPD). En general, los linfomas se clasifican tipo de célula de origen, mientras que las leucemias mieloides (AML/ ML) o linfoides (ALL/CLL) en agudas o crónicas. Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son un grupo de trastornos caracterizado por una o más citopenias de sangre periférica, secundaria a la disfunción de la médula ósea. Generalmente, los CMPDs presentan una mayor cantidad de células mieloides maduras en sangre e incluyen síndromes que comparten características de MDS/CMPD y leucemia mieloides crónica atípica (CMML). Estos últimos son enfermedades de adultos con un pico frecuente en la quinta y sexta década de la vida. A nivel mundial, las leucemias y linfomas son las neoplasias hematológicas más frecuentes, representando el 2,8% de los nuevos casos de cáncer. En México, el Registro de Cáncer basado en la población coloca las malignidades hematológicas en los primeros cinco lugares. Los estudios citogenéticos en hematopatías malignas y benignas son importantes para la caracterización de la enfermedad, ya que contribuye al diagnóstico y es un factor pronóstico bien definido. En más del 50% de las neoplasias malignas hematológicas, las alteraciones cromosómicas clonales se han caracterizado basadas en el número de cromosomas (hiperdiploidia, trisomías o monosomías) o la estructura de los cromosomas (translocaciones, inversiones, deleciones). El primer reordenamiento cromosómico descrito en el cáncer, y actualmente mejor caracterizada en pacientes con LMC, es t(9;22) (q34; q11), también conocido como el cromosoma de Filadelfia (Ph +). En pacientes con AML-M3 o leucemia promielocítica aguda (APL), el ácido trans retinoico (ATRA) es otro objetivo de terapia dirigido contra un gen de fusión, PML/ RAR $\alpha$ , causado por la t(15;17) (q22; q21). La presencia de t(15;17) en pacientes con sospecha clínica de M3/APL es un criterio de diagnóstico e indica un candidato para el tratamiento con ATRA. En ALL, las alteraciones citogenéticas que presentan una alta el riesgo es t(9;22) (q34; q11), t(4; 11) (q21; q23) e hipodiploidia con 30-39 cromosomas (baja hipodiploidia). Los cariotipos complejo son un factor de riesgo independiente de la edad y recuento de células sanguíneas. Alteraciones con mejor pronóstico en ALL son t(12;21) (p13;q22) translocación, 9p deleciones y

hiperdiploidia con más de 50 cromosomas. Se presenta cariotipo normal en 15-45% de todas las malignidades hematológicas y se considera de riesgo intermedio. En AML, las alteraciones de bajo riesgo son: t (8; 21) (q22; q22), t (15; 17) (q22; q21), inv (16) (p13q13), rearr (11q23) y alto Las alteraciones de riesgo son: reordenamientos 3q, monosomía 7 y t(1; 22) (q10; p10). Por todo ello es importante que además de las técnicas clásicas de laboratorio se implementen siempre técnicas de diagnóstico citogenéticas y moleculares, las cuales proporcionan datos adicionales muy importantes para el seguimiento del paciente.<sup>117</sup>

La leucemia es un tipo común de cáncer, sin embargo hoy en día todavía requiere una mejora en el ámbito del diagnóstico y clasificación. Actualmente, las modernas técnicas de biología molecular están siendo evaluadas para su adecuación en la detección y distinción entre los subtipos de leucemia. En 1980 el análisis de DNA y RNA por citometría de flujo se ha utilizado para identificar los subtipos de leucemia linfoblástica aguda. Junto con la creación de tecnologías de microarrays surgieron nuevas oportunidades para poder caracterizar la leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda (ALL, AML), utilizando datos de expresión. Además, el perfil de expresión génica se utilizó para clasificar los subtipos pediátricos de leucemia linfoblástica aguda.<sup>81</sup>

La detección y tratamiento del cáncer requiere una correcta coordinación de distintas especialidades, aportando una visión integral de la enfermedad para abordar con mayor garantía todos los aspectos del proceso oncológico. Es decir, requiere la actuación de un equipo multidisciplinar donde se incluyan todos los especialistas que actúen tanto en el tratamiento curativo de los pacientes, como en el diagnóstico acertado: cirujanos, oncólogos médicos, radioterapeutas, químicos clínicos, enfermeras especializadas, unidad del dolor así como en los cuidados paliativos de los pacientes incluyendo la fase cercana a la muerte o el duelo.<sup>33</sup>

En el paciente oncohematológico, su enfermedad invade médula ósea o tejido linfático, por lo tanto, esta enfermedad está dispersa en todo el organismo. En ellos, ya por la enfermedad de base hay alteración de toda la producción de células de las distintas series; como consecuencia habrá: anemia, leucopenia, plaquetopenia. Por ende, es probable que durante todo el tratamiento requieran terapia transfusional. La infección es uno de los riesgos a tener en cuenta en este paciente, y la neutropenia febril es una de las urgencias más importantes a las que se enfrenta el paciente tras recibir tratamiento oncológico, también cursan con astenia y adinamia.<sup>60</sup>

El diagnóstico suele ser sencillo ya que se sospecha en una biometría hemática (BH) al encontrar los cambios señalados y se confirma cuando se observa leucocitosis (60% de los casos) con un alto porcentaje de blastos, anemia, y trombocitopenia. Algunas infecciones virales, como las de citomegalovirus o mononucleosis infecciosa, pueden dar lugar a confusión; un estudio de médula ósea es casi siempre suficiente para disipar la duda. Se requiere un mínimo de 25% de linfoblastos en la médula ósea para establecer el diagnóstico. En algunos casos de pancitopenia notoria puede haber confusión, en algunos casos puede sospecharse de anemia aplásica. Por lo regular la revisión de sangre y médula ósea permite determinar con éxito el diagnóstico. El aspecto más difícil del diagnóstico desde el punto de vista técnico es la clasificación con marcadores citoquímicos, citogenéticos e inmunológicos, esto tiene en la actualidad gran importancia dado que el pronóstico y el tratamiento óptimo dependen de ellos.<sup>76</sup>

Cuando se emplea la morfología convencional como medio único para efectuar la clasificación de las leucemias agudas, se pueden cometer errores diagnósticos y, en consecuencia, terapéuticos en aproximadamente el 20% de los casos de LA. El empleo de tinciones citoquímicas de la clasificación inmunológica de las leucemias, de la citogenética, de la biología molecular y, en algunos casos, de la microscopía electrónica, permite establecer con certeza la naturaleza de las células malignas y, por lo tanto, efectúa un diagnóstico preciso y tratamiento adecuado.<sup>2</sup>

Por ejemplo, con la conjunción de los datos clínicos, la edad, resultados de la BH, la clasificación exacta de leucemia, el cariotipo y el subtipo inmunológico se pueden dividir a los pacientes en grupo de riesgos diferente. Los casos de mejor pronóstico son aquellos de niñas de 3-7 años de edad, con menos de 50,000 leucocitos/ul, sin megalias ni infiltración al SNC, con morfología L1 e hiperdiploidia, con trisomías 4, 10, 17 o 21 y la traslocación 12;21 (TEL-AML1), con subtipo pre B temprano. Los pacientes que carecen de alguno de los datos anteriores deben tratarse de manera diferente, ya que se consideran de riesgo alto en especial si son menores de 1 año o mayores de 10, si el recuento de leucocitos al momento del diagnóstico fue mayor de 50,000 por microlitro, y cuando se identifica adenomegalia u organomegalia masiva, crecimiento testicular, morfología L2, hipodiploidia o traslocación 9;22(BCR-ABL).<sup>76</sup>

En el caso del tratamiento, los pacientes con LLC, por ejemplo, puede incluir quimioterapia, una combinación de quimioterapia e inmunoterapia, o fármacos que se dirigen a las vías de señalización que promueven el crecimiento y/o la supervivencia de las células LLC (por

ejemplo, señalización BCR y BCL-2). Se han evaluado tres clases principales de fármacos que pueden inhibir la señalización de BCR en pacientes con inhibidores de CLL: BTK, inhibidores de PI3K e inhibidores de tirosina cinasa de bazo (SYK ). Las células LLC con IGHV no mutado parecen ser más sensibles a los inhibidores de la señalización BCR que las células LLC con IGHV mutado, pero si los inhibidores, como el ibrutinib, son más eficaces en pacientes con LLC y IGHV no mutado, queda por validarse en ensayos clínicos.<sup>82</sup>

## **5.1 Diagnóstico Hematológico de las Leucemias**

### **5.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda**

El diagnóstico suele ser sencillo ya que se sospecha en una BH al encontrar leucocitosis, con un alto porcentaje de blastos, anemia y trombocitopenia y un estudio de médula ósea es casi siempre suficiente para disipar la duda, se requiere un mínimo de 25% de linfoblastos en médula ósea para establecer el diagnóstico.<sup>75</sup>

El diagnóstico de LAL se establece por la presencia de un 20% o más linfoblastos en la médula ósea o sangre periférica. La evaluación morfológica, citometría de flujo, inmunofenotipificación y la prueba citogenética es valiosa tanto para confirmar el diagnóstico como la estratificación del riesgo. La punción lumbar con análisis de LCR es estándar en el momento del diagnóstico para evaluar el SNC. Si el SNC está involucrado, se debe realizar una resonancia magnética. Otras evaluaciones incluyen hemograma completo, diferencial y frotis para evaluar la otra línea celular hematopoyética, perfiles de coagulación y química sérica. En la BH los pacientes suelen presentar anemia y plaquetas disminuidas.<sup>83</sup>

### **5.1.2 Leucemia Mieloblástica Aguda**

Las leucemias mieloides agudas (LMA) son el resultado de la malignización de un precursor hematopoyético precoz, que provoca que esta célula de lugar a una progenie que no es capaz de diferenciarse pero continua proliferando de forma incontrolada, lo que trae como consecuencia la rápida acumulación de células mieloides inmaduras en la médula ósea. Estas células, llamadas blastos, progresivamente reemplazan al tejido hematopoyético normal, provocando una reducción en la producción de leucocitos, hematíes y plaquetas, y con el tiempo pasan al torrente circulatorio infiltrando el bazo, los ganglios, el hígado y otros órganos vitales. El diagnóstico de una leucemia mieloide aguda se basa en los resultados

del medulograma y la biopsia de médula ósea que generalmente son hipercelulares, con la presencia de 20 a 100 % de células blásticas.<sup>86</sup>

Al igual que la LAL, el diagnóstico se sospecha por alteraciones notorias en una Bh. En ocasiones el diagnóstico es sencillo por la presencia de blastos con granulación citoplasmática y cuerpo de Auer, característicos de la LAM, en especial de la M3. Con frecuencia el blasto mielóide carece de granulaciones. Resulta además de gran importancia las tinciones citoquímicas de mieloperoxidasa, enzima presente en los granulos, del citoplasma de la mayoría de las variedades de LAM. El diagnóstico en las LA se efectúa con el estudio de extendidos de sangre periférica o aspirados de médula ósea, empleando tinciones tipo May-Grunwald-Giemsa, Wright o Romanowsky. Cuando la invasión blástica de la sangre periférica es muy grave, no hay dificultad para establecer un diagnóstico de LA; sobre todo en casos de LAL. Y la presencia de cuerpos o bastones de Auer en las células leucémicas de SP o MO, es suficiente para establecer un diagnóstico inequívoco de LAM. La identificación de las proteínas de fusión PML/RAR, AML1/ETO, BCR/ABL u otras por medio de la biología molecular permiten establecer tanto el diagnóstico como la variedad de la leucemia, y es también útil en el seguimiento de los pacientes.<sup>4, 76</sup>

Ante la sospecha de una LAM se realizara un mielograma, un estudio citoquímico, un análisis inmunofenotípico y un análisis citogenético para obtener información pronóstica.<sup>102</sup>

**Tabla 10.** Valores de analitos en una BH para las Leucemias Agudas  
(Modificada de Yang dai, et. Al, 2017)

ANALITO	RESULTADO
Hemoglobina	↓
Hematocrito	↓
VCM	Normal
HCM	Normal
CHCM	Normal
Plaquetas*	↓
Leucocitos*	↓ ó ↑ ó normales
Linfocitos	↑

\*Bicitopenia

### 5.1.3 Leucemia Granulocítica Crónica

Durante la fase crónica, el recuento de leucocitos es variable, desde cifras inferiores a loes 50,000/ul hasta algunas tan elevados como 200,000/ul. Las células mieloides en SP muestran todas las fases de maduración pero se observa un predominio de mielocitos; también existe un aumento de eosinofilos y basófilos, este último más constante. En casi la mitad de los pacientes puede haber una cifra mayor de 1,000,000 de plaquetas/ul y a pesar de ellos, son raras las crisis trombóticas; además, es común encontrar un grado moderado de anemia.<sup>76</sup>

El diagnostico se basa principalmente en los hallazgos de un BH. Cuando la leucocitosis de causa no explicada, la proliferación de formas jóvenes de la serie mieloide, el aumento de plaquetas, etc, se asocian con esplenomegalia, las posibilidades diagnosticas diferenciales son escasas. La vigilancia adecuada y el estudio integral del individuo suele ser suficientes para aclarar el diagnostico, en casos de dudas se puede recurrir a la determinación del CrPh1, y los niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria. La investigación del gen quimérico BCR/ABL empleando la técnica de laboratorio conocida como hibridación fluorescente in situ (FISH) o bien una PCR, tienen mayor sensibilidad que la investigación del CrPh1 por medio de la citogenética.<sup>4</sup>

### 5.1.4 Leucemia Linfocítica Crónica

Las características de laboratorio para una leucemia linfoblástica crónica (CLL o LLC) incluye un recuento completo de células sanguíneas y citometría de flujo. La anomalía de laboratorio más consistente observada es un aumento en el número absoluto de linfocitos sanguíneos por encima del límite superior normal de adultos de ~ 3.500 células por  $\mu$ l, detectado por un hemograma. La mayoría de los pacientes presentan con  $\geq 10.000$  células por  $\mu$ l, pero algunos podrían tener menos números de linfocitos en la sangre después de la terapia. El diagnóstico inicial requiere la detección de  $\geq 5.000$  células por  $\mu$ l de células LLC B clonales<sup>107</sup>, que típicamente expresan bajos niveles de inmunoglobulina superficial con cadenas ligeras de  $\kappa$ -inmunoglobulina o  $\lambda$ -inmunoglobulina. Morfológicamente, las células LLC son pequeños linfocitos de apariencia madura con cromatina densa, un núcleo que prácticamente llena la célula con sólo un borde de citoplasma visible y sin presencia de nucleolos (o en ocasiones pequeños). En LLC, la presencia de células manchadas en el frotis de sangre es común y representa linfocitos que se trituraron en el proceso de fabricación. Las células LLC también pueden aparecer como prolinfocitos, que son más

grandes que las células LLC típicas, tienen núcleos menos condensados y un único nucléolo prominente. Sin embargo, si > 55% de las células del frotis de sangre son prolinfocitos, el diagnóstico de leucemia prolinfocítica debe ser considerado.<sup>82</sup>

En el aspirado de médula ósea se reconoce una infiltración por linfocitos de aspecto maduro, pequeños y con núcleo redondo y cromatina condensada. Aunque no se requiere para establecer un diagnóstico de LLC, una biopsia de médula se realiza a menudo; esto generalmente muestra hiper celularidad debido a un mayor porcentaje de linfocitos de aparición madura. Se han descrito cuatro patrones de infiltración linfocítica en la médula: nodular, intersticial, mixta (nodular e intersticial) o difusa; El patrón difuso está típicamente asociado con enfermedad avanzada. Además, la médula suele mostrar un número reducido de células mieloides y eritroides, que de otro modo tienen maduración normal. El curso clínico de LLC recién diagnosticada es extremadamente variable; Algunos pacientes permanecen libres de síntomas y están plenamente activos durante décadas, mientras que otros se vuelven rápidamente sintomáticos o desarrollan una enfermedad de alto riesgo, que requiere tratamiento poco después del diagnóstico y puede resultar en muerte debido a complicaciones relacionadas con la terapia y / o enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen un curso clínico que se encuentra entre estos dos extremos.<sup>76, 82</sup>

**Tabla 11.** Valores de analitos en una BH para las Leucemias Crónicas  
(Modificada de Jaime y Gómez, 2012)

<b>ANALITO</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Hemoglobina</b>	Normal
<b>VCM</b>	Normal
<b>HCM</b>	Normal
<b>CHCM</b>	Normal
<b>Leucocitos*</b>	↑
<b>Linfocitos</b>	LLC: linfocitosis
<b>Plaquetas</b>	↑

## 5.2 Diagnóstico Citogenético Clásico de las Leucemias

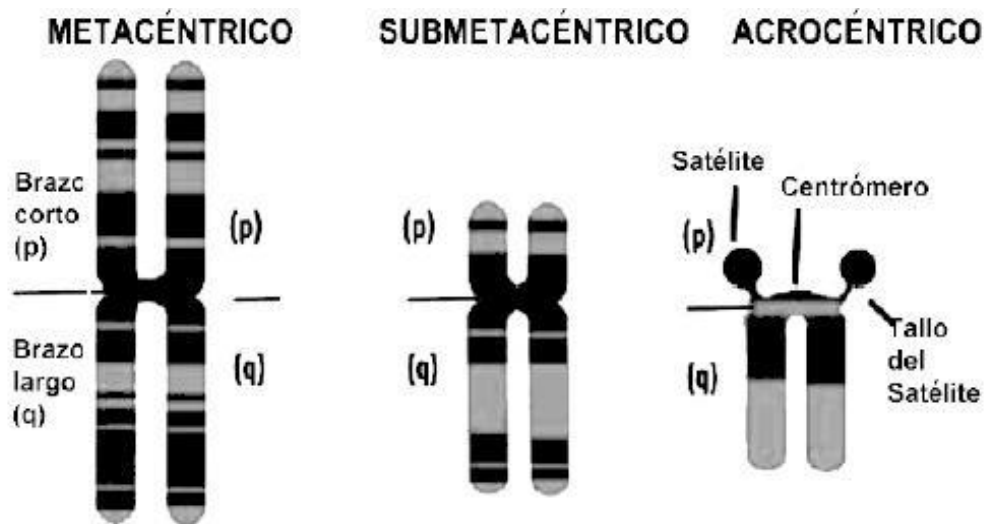
El análisis citogenético, junto a la citología, los marcadores celulares y la biología molecular, constituyen el conjunto de las pruebas diagnósticas esenciales en la leucemia. Por ejemplo, se presentan cariotipos alterados entre un 64 y un 85% de casos de LLA del adulto, y constituyen un factor pronóstico independiente de primer orden. El diagnóstico citogenético clásico hace referencia al diagnóstico mediante la realización de un cariotipo, para ello es preciso además conocer qué se espera observar en uno.<sup>27</sup>

Cada célula humana contiene 46 cromosomas, y cada cromosoma está formado por una hebra de DNA asociado a proteínas. El conjunto de los 46 cromosomas situados en el interior del núcleo se denomina cromatina. Los cromosomas eucariontes son entidades dinámicas cuya apariencia varía a lo largo del ciclo celular. El número de cromosomas y contenido de DNA en un organismo eucariota es el mismo en todas sus células somáticas (diploides) y se reduce a la mitad en sus gametos (espermatozoides y óvulos) (haploides). Las células diploides son aquellas que contienen  $2n$  cromosomas, cada uno de los cromosomas de cada pareja se denomina cromosoma homólogo y proceden cada uno de uno de los progenitores (cromosoma paterno y cromosoma materno). En los humanos, el genoma nuclear se encuentra distribuido en 23 pares de cromosomas. Por otro lado, las células haploides sólo poseen una serie de cromosomas, todos diferentes entre sí. En la serie haploide hay un solo gen para cada carácter. Los gametos (óvulos y espermatozoides) son células haploides. Los gametos masculinos pueden tener un cromosoma X o Y, pero los gametos femeninos siempre tendrán un cromosoma X.<sup>141</sup>

Al microscopio óptico los cromosomas metafásicos en el hombre se observan como cuerpos compactos y alargados en forma de bastoncillos. Se pueden distinguir en ellos las siguientes partes: a.) brazo del cromosoma Consisten en dos brazos separados por un estrechamiento denominado centrómero. Al brazo largo se le designa como brazo "q" y al brazo corto como "p". Los cromosomas metafásicos presentan dos cromátides hermanas unidas por el centrómero. b.) Centrómero. Es una región estrecha del cromosoma que lo divide en brazo corto y brazo largo. En ella se unen las cromátides hermanas (cada una de las hebras de DNA duplicadas). Durante la división celular, al centrómero se adhiere una estructura proteica en forma de disco llamada cinetocoro, a la que se unen los filamentos del huso acromático durante la división celular. c.) Telómeros: Son estructuras



especializadas que cubren los extremos de cromosomas eucariotas a modo de “capuchones”, Están formados por DNA y proteínas. El DNA de los Telómeros presenta secuencias moderadamente largas de repeticiones en tándem de una secuencia simple del hexanucleotido. El telómero tiene la función de conservar la integridad estructural de los cromosomas. Cuando se pierde el telómero el extremo resultante del cromosoma es inestable, tiene tendencia a fusionarse con los extremos de otros cromosomas rotos o bien puede sufrir proceso de degradación. Además asegura la replicación completa del DNA gracias a la acción de la telómero y permite situar al cromosoma en el núcleo. D.) Satélites. Se trata de zonas redondeadas unidas al resto del cromosoma por una constricción secundaria de longitud variable. Solo están presentes en un determinado tipo de cromosomas (acrocéntricos), aunque no todos los cromosomas acrocéntricos muestran satélites. E.) Origen de replicación. En mamíferos, el inicio de la replicación del DNA está controlado por secuencias de decenas de kilobases de largo en múltiples sitios en todo el DNA. <sup>141</sup>



**Figura 13.** Clasificación de los cromosomas de acuerdo a la posición del centrómero. <sup>129</sup>

La morfología de los cromosomas se observa mejor durante el estado de metafase y anafase, ya que en estos estados la condensación de los cromosomas es máxima. Todos los cromosomas tienen unos componentes comunes, pero según la posición de centrómero y el tamaño relativo de los brazos (p y q) se pueden distinguir varios tipos de cromosomas (Figura 17). <sup>141, 24</sup>

**Metacéntricos:** Aquellos cromosomas en los que el centrómero está situado en una posición central, en ellos los brazos p y q son del mismo tamaño. Son cromosomas metacéntricos: 1, 3, 16, 19 y 20.<sup>141</sup>

**Submetacéntrico:** Cromosomas que tienen el centrómero en una posición ligeramente fuera del centro; el brazo p es de mucha menor longitud que el brazo q. Son cromosomas submetacéntricos: 2, 4-12, 17-18 y el X.<sup>41</sup>

**Acrocéntrico:** Cromosomas cuyo centrómero se halla casi en la parte superior del cromosoma. No tiene brazos cortos o son muy pequeños. Son acrocéntricos: 13, 14, 15, 21, 22 y el cromosoma Y.<sup>141</sup>

Los cromosomas presentan diferente tamaño y morfología; para su estudio, en 1978 el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana estableció clasificar los cromosomas teñidos y no bandeados en 7 grupos, nombrándolos de la A-G y como se indica a continuación:<sup>141</sup>

**Tabla 12.** Clasificación por grupo de los cromosomas.

Grupos	Cromosomas	Morfología	Tamaño
A	1-3	Metacéntricos El cromosoma 2 no es totalmente metacéntrico	Grandes
B	4-5	Submetacéntricos	
C	6-12, X	Submetacéntricos	Medianos
D	13-15	Acrocéntricos con posibles satélites	
E	16-18	El 16 es metacéntricos, el 17 y 18 son submetacéntricos	Pequeños
F	19 y 20	Metacéntricos	
G	21,22, Y	Acrocéntricos, el 21 y 22 con posibles satélites	

El análisis citogenético consiste en la visualización de los cromosomas. Es decir, la obtención del cariotipo de una persona con el fin de detectar la presencia de alteraciones en el número o en la estructura de los cromosomas. En las técnicas de obtención de cromosomas hay que distinguir entre el cariotipo constitucional y el hematológico. En ambos casos se siguen con pautas generales comunes, si bien varían en algunos aspectos. El

cariotipo constitucional es el que está presente en todas las células del individuo, excepto en las células sexuales y se mantiene variable a lo largo de toda la vida del individuo. En los procesos oncohematológicos la dotación cromosómica de algunos tipos de células puede variar dependiendo de la evolución del proceso, se habla entonces de cariotipo hematológico. Para la visualización de los cromosomas resulta esencial que estos se encuentren en su estado de máxima condensación, es decir, en metafase. La visualización directa de las metafases solo es posible en tejidos que dividen espontáneamente, es decir, aquellos que tienen una proliferación rápida, tales como gónadas, médula ósea y trofoblasto, o en los tejidos con tumores. Para el resto de las células es necesario realizar un cultivo celular. Una vez realizado el cultivo y obtenidos los cromosomas metafásicos, para la visualización de los cromosomas al microscopio hay que extender los cromosomas en un portaobjetos y aplicar técnicas de tinción y bandeado que permitan su conteo e identificación.<sup>141, 23, 24</sup>

Por lo general, el análisis citogenético se ha centrado en la identificación de alteraciones cromosómicas clonales (CCA), específicamente aquellos relacionados con enfermedades específicas. Dichas alteraciones cromosómicas clonales se definen como una aberración cromosómica dada, que puede ser detectada examinando aleatoriamente al menos dos veces dentro de 20 a 40 figuras mitóticas (rango de ocurrencia mayor del 30%). CCAs son caracterizadas por la presencia de una población de células, derivada de una única célula anormal, que generalmente tiende a expandir y alterar (suprimir o reemplazar) el crecimiento y desarrollo de las células normales. El cariotipo que muestra aberraciones genéticas recurrentes (CCAs) se han encontrado en muchos tipos de tumores y han surgido como marcadores pronósticos y predictivos en ambos cánceres hematológicos y en algunos tipos de tumores sólidos. Además, la identificación de tales anomalías citogenéticas aumentan nuestro conocimiento sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de tumores y, lo más importante, ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas a una CCA específica. Por ejemplo, PTEN, ERBB2 y ESR1 son algunos de los objetivos más específicos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer.<sup>112</sup>

En los trastornos hematológicos malignos, se detectan anomalías cromosómicas recurrentes, varias de las cuales se correlacionan con subtipos de leucemia que tienen rasgos clínicos, morfológicos e inmunológicos característicos, tales como la respuesta a la terapia. Por ejemplo, en la leucemia aguda linfocítica en niños, el grado de ploidía y la presencia o ausencia de translocaciones específicas, son considerados como factores

pronósticos importantes e independientes. El estudio de las anomalías cromosómicas en las leucemias cumple varias funciones. Contribuye a establecer un diagnóstico más preciso, proporciona información pronóstica y permite una selección más racional de la terapia para un paciente en particular. Además hace posible identificar los sitios que presentan rearrreglos consistentes, los cuales pueden ser luego aislados y analizados molecularmente.<sup>65, 24</sup>

El uso de las características genéticas (por ejemplo la ploidia y algunas anomalías estructurales específicas de los cromosomas) de las células de leucemia, en conjunción con las características clínicas ha mejorado el pronóstico de los pacientes con leucemia. Un ejemplo es que la hiperploidia con más de 52 cromosomas se ha asociado con un pronóstico excelente usando una quimioterapia basada en antimetabolitos, mientras que en los pacientes con células hipoploides o tetraploides el pronóstico no es tan bueno con este tipo de quimioterapia. Otro ejemplo es la translocación t(4;11) que es encontrada predominantemente en pacientes pediátricos con LAL, y llega a abarcar hasta el 70% de los casos dependiendo de la serie examinada. Los pacientes que presentan esta translocación tienen una respuesta terapéutica muy pobre a la quimioterapia convencional, de tal manera que su identificación rápida se requiere actualmente para iniciar el esquema de tratamiento apropiado. Desafortunadamente el problema con los estudios citogenéticos, están relacionado a los costos elevados, ya que no son accesibles para la mayoría de los pacientes con leucemia comúnmente diagnosticados y durante la remisión, difícilmente se puede evidenciar las células residuales de leucemia, sino fuera por la citogenética. Actualmente la citogenética se utiliza para la identificación de más translocaciones, sin embargo, son técnicas difíciles de realizar. Afortunadamente los genes de las principales translocaciones en leucemia han sido clonados permitiendo el desarrollo de ensayos de PCR específicos y mucho más sensibles para la rápida detección de las translocaciones.<sup>79</sup>

### 5.2.1 Cariotipo

El cariotipo es característico de cada especie y, el ser humano tiene 46 cromosomas o 23 pares de cromosomas, organizados en 22 pares autosómicos y un par sexual. (Hombre XY) (Mujer XX). Cada brazo ha sido dividido en zonas y cada zona, a su vez, en bandas e incluso las bandas en subbandas, gracias a las técnicas de marcado. Mediante el cariotipado se pueden analizar anomalías numéricas y estructurales. Además, el cariotipo de las células cancerosas sigue siendo esencial para entender la relación entre la

evolución clonal y la progresión de la enfermedad, ya que proporciona un análisis global de las anomalías en todo el genoma de una sola célula. <sup>24</sup>

En 1970 Casperson publicó un descubrimiento importante en la identificación cromosómica que es que cada cromosoma tiene su propia anatomía única en virtud de su patrón de banda. El IV Congreso Internacional de Genética Humana celebrada en París en 1971 se acordó un sistema internacional para describir el patrón de bandas de los cromosomas, por el cual cada cromosoma homólogo puede ser identificado por puntos específicos, regiones y bandas. Los cromosomas se disponen en un cariotipo basado en la posición del centrómero, patrón de la banda y longitud de los brazos del cromosoma. Los números de cromosomas se designan de forma descendente, excepto para el cromosoma 21 que es menor que el 22. La ubicación del centrómero es una característica clave descrita en la morfología cromosómica. Las regiones y bandas están numeradas consecutivamente del centrómero hacia afuera a lo largo de cada brazo del cromosoma. Los símbolos p y q se utilizan para designar los brazos corto y largo de cada cromosoma respectivamente, como se mencionó previamente<sup>24</sup>

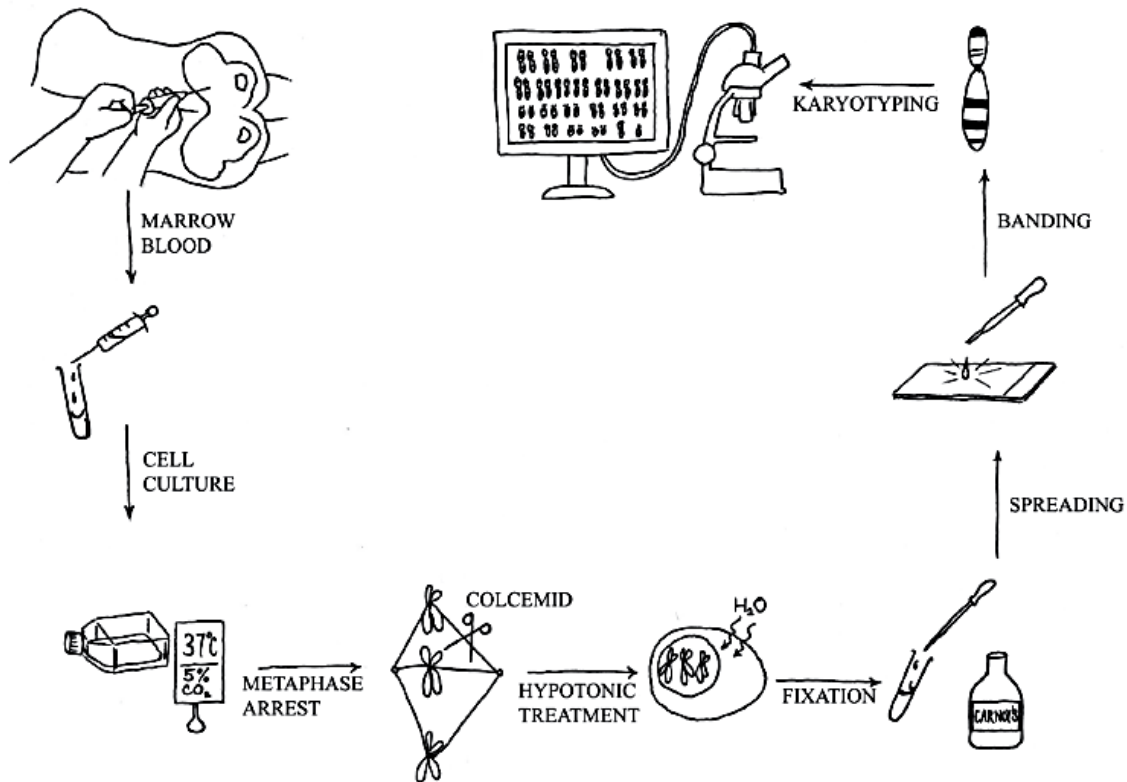
El cariotipo es ahora obligatorio para las neoplasias hematológicas recientemente diagnosticadas, especialmente la leucemia. El cariotipo es también ampliamente aceptado para el análisis genético, ya que es el método más completo para la caracterización cromosómica de hoy en día. Los cromosomas se analizan en metafase mediante el reconocimiento de los patrones de bandas. Una banda se define como la parte de un cromosoma que es claramente distinguible de segmentos adyacentes que se oscurece o aclara después de las técnicas de bandeo. Una banda que aparece oscuras con el método de banda G pueden aclararse con el método de bandeo R. Las técnicas de bandeo pueden dividirse en dos tipos principales: (1) los que generan bandas distribuidas a lo largo de todo el cromosoma, como las técnicas de bandeo G y R, y (2) las tinciones específicas de las estructuras cromosómicas con un número limitado de bandas, tales como bandas C.<sup>24</sup>

Las bandas G y R son las técnicas de cariotipo más utilizado para la identificación del número de cromosomas, translocaciones, supresiones, inversiones o amplificaciones de segmentos cromosómicos. La técnica de Bandas G implica la tinción de los cromosomas con Giemsa. Las regiones ricas en AT aparecerán oscuras mientras que las regiones ricas en GC parecen claras. La técnica de bandeo R implica la desnaturalización de cromosomas en solución salina ácida caliente seguida de tinción con Giemsa. Este método desnaturaliza preferentemente el DNA rico en AT, por lo tanto, mancha las regiones ricas en GC no

desnaturalizadas. Las bandas G y las bandas R son en gran parte complementarias. La técnica de bandeo G es más ampliamente utilizada hoy en día, mientras que la técnica de bandeo R es preferida en algunos países europeos. Aunque la morfología cromosómica no es tan bien visualizada en la técnica de bandeo R, puede identificar anomalías en los cromosomas que a menudo están presentes en la leucemia. El número total de bandas o "resolución" en el cariotipo humano depende de la condensación de los cromosomas y de la etapa de la mitosis. Una resolución de 350-500 bandas corresponde a cromosomas en la metafase tardía y de alta resolución (alrededor de 850 bandas) corresponde a los cromosomas en la profase media.<sup>24, 23</sup>

Dado que la morfología de las metafases obtenidas a partir de células es generalmente ambigua y compleja, plantea un desafío adicional a los citogenéticos del cáncer en el reconocimiento de los cromosomas, cuando la calidad metafásica es inferior. La morfología, longitud y resolución de las bandas del cromosoma, de las células cancerosas presenta alta diversidad. Es importante analizar un amplio espectro de células en metafases de distintas cualidades cromosómicas para evitar la detección del clon o subclones anormales así como células metafásicas normales con mejor resolución cromosómica ya que pueden coexistir.<sup>24</sup>

Los estudios cromosómicos de las neoplasias presentan un desafío técnico particular. Como los resultados son tan impredecibles, no hay una sola técnica que se puede garantizar que funcione de manera consistente y confiable. Por lo tanto, cada laboratorio debe adoptar una ligera variación del protocolo básico. Uno de los factores más significativos para obtener un resultado exitoso es el establecimiento de múltiples cultivos para maximizar las posibilidades de obtener divisiones óptimas de células malignas: 1) cosecha directa de células de médula ósea, 2) cultivo nocturno y 3) cultivo nocturno con sincronización (Mediante el bloqueo en la fase S del ciclo celular). La banda de alta resolución de cromosomas largos con buena morfología se puede lograr mediante la aplicación de técnicas de sincronización. Permite la identificación de aberraciones cromosómicas estructurales sutiles que se encuentran comúnmente en las células malignas. LAL es una enfermedad frustrante para la mayoría de los citogenetistas, ya que tiene varios desafíos técnicos, incluyendo la morfología de los cromosomas pobres frecuentes, bajo índice mitótico y muestras que tienen una marcada tendencia a coagular durante la cosecha.<sup>25</sup>



**Figura 14.** Protocolo para la preparación de una muestra del paciente con Leucemia.<sup>82</sup>

La sangre periférica es el tejido más fácil de obtener. Actualmente, el estudio del cariotipo constitucional de una persona se realiza sobre un cultivo de células blancas de la sangre: basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos. Se trata de células nucleadas capaces de sufrir división celular cuando se agrega un agente mitógeno. Se suele utilizar sangre total en lugar de sólo células blancas, ya que los eritrocitos y los demás componentes celulares de la sangre no interfieren por lo general en la división de los linfocitos en cultivo. El agente mitógeno de uso común en el laboratorio de citogenética para el cultivo de linfocitos T es la fitohemaglutinina; se trata de una mucoproteína que se encuentra naturalmente en el guisante rojo (*Phaseolus vulgaris*). Se comporta como un antígeno extraño, estimula la división de los linfocitos mediante el aumento de la síntesis de DNA. Después de la obtención de la muestra se realiza el cultivo celular y el medio generalmente utilizado para el cultivo de linfocitos humanos es el RPMI 1640. Se trata de un medio de pH 7.4 y una concentración de sales osmóticamente balanceada que contiene agua, sales, glucosa, vitaminas y nutrientes. El medio RPMI puede obtenerse con o sin glutamina. La glutamina es generalmente el factor limitante del crecimiento celular debido a que es inestable en el medio de cultivo. Por ello el medio comercial debe enriquecerse

con glutamina cuando se realiza el cultivo celular. Por lo tanto podemos decir que al medio RPMI se le añaden complementos como L-glutamina, fitohemaglutinina, antibióticos, como penicilina y estreptomina, HEPES (regulador del pH) o atmosfera de CO<sub>2</sub> con un indicador de pH que es el rojo de fenol y suero bovino fetal (FCS) que aporta factores de crecimiento. Al cabo de 72 horas en cultivo, se alcanza el mayor índice mitótico; llegado este momento es necesario parar la división celular en esta etapa de metafase, antes de que los cromosomas vuelvan a entrar en estado de interfase, en el que se encuentran de nuevo descondensados. El proceso de parada de los cultivo se denomina en terminología citogenética como “cosecha” o “sacrificio de cultivo”. Para ellos utilizan inhibidores del huso acromático, de modo que se bloquee el ciclo celular en la etapa de metafase. Existen carios productos químicos que previenen la formación de las fibras del huso que se insertan en el centrómero de cada cromosoma antes de la división mitótica y tiran de las cromátidas separándolas en la anafase. Estos productos químicos incluyen vinblastina, colchicina (análogo del colcemid). El colcemid es el nombre comercial de Ciba-Geigy para deacetilmetilcolchicina.<sup>141,105, 24</sup>

Una vez paradas las células en el estado de metafase, se someten a un tratamiento con una solución hipotónica que origina en hinchamiento de los cromosomas. Una solución hipotónica es una disolución con una concentración salina menor que en el citoplasma de las células, por la ley de osmosis habrá un movimiento de H<sub>2</sub>O desde la solución hipotónica al interior de la célula a través de la membrana celular. Esto origina que las células se hinchen y estallen muchos de los eritrocitos (la solución celular adquiere un tono marrón debido a la lisis de eritrocitos, la hemoglobina que da el color rojo al cultivo se convierte en hematina, que es de color marrón oscuro). Tras el tratamiento con el choque hipotónico las células deben tratarse suavemente, sin movimientos bruscos que den lugar a metafases incompletas. Hay que evitar pasar el pellet a través de pipetas con puntas estrechas. Por lo tanto el tratamiento hipotónico es una etapa crítica que requiere un control exacto de su duración. Este procedimiento sirve para complementar el tratamiento con colcemid y ayuda a la dispersión de los cromosomas. Estas células obtenidas deben ser fijadas y esto se hace habitualmente (Carnoy) para preparaciones de cromosomas y se realiza con una mezcla recién hecha de 3 partes de alcohol (etanol absoluto o metanol) y una parte de ácido acético glacial. Este tratamiento precipita ácidos nucleicos, por lo tanto los cromosomas son fijados al material circundante y ayuda a la eliminación de citoplasma y restos celulares. Y para poder estudiar los cromosomas al microscopio el pelle se extiende sobre un portaobjetos por el método de flameado o el método húmedo.<sup>141, 105</sup>

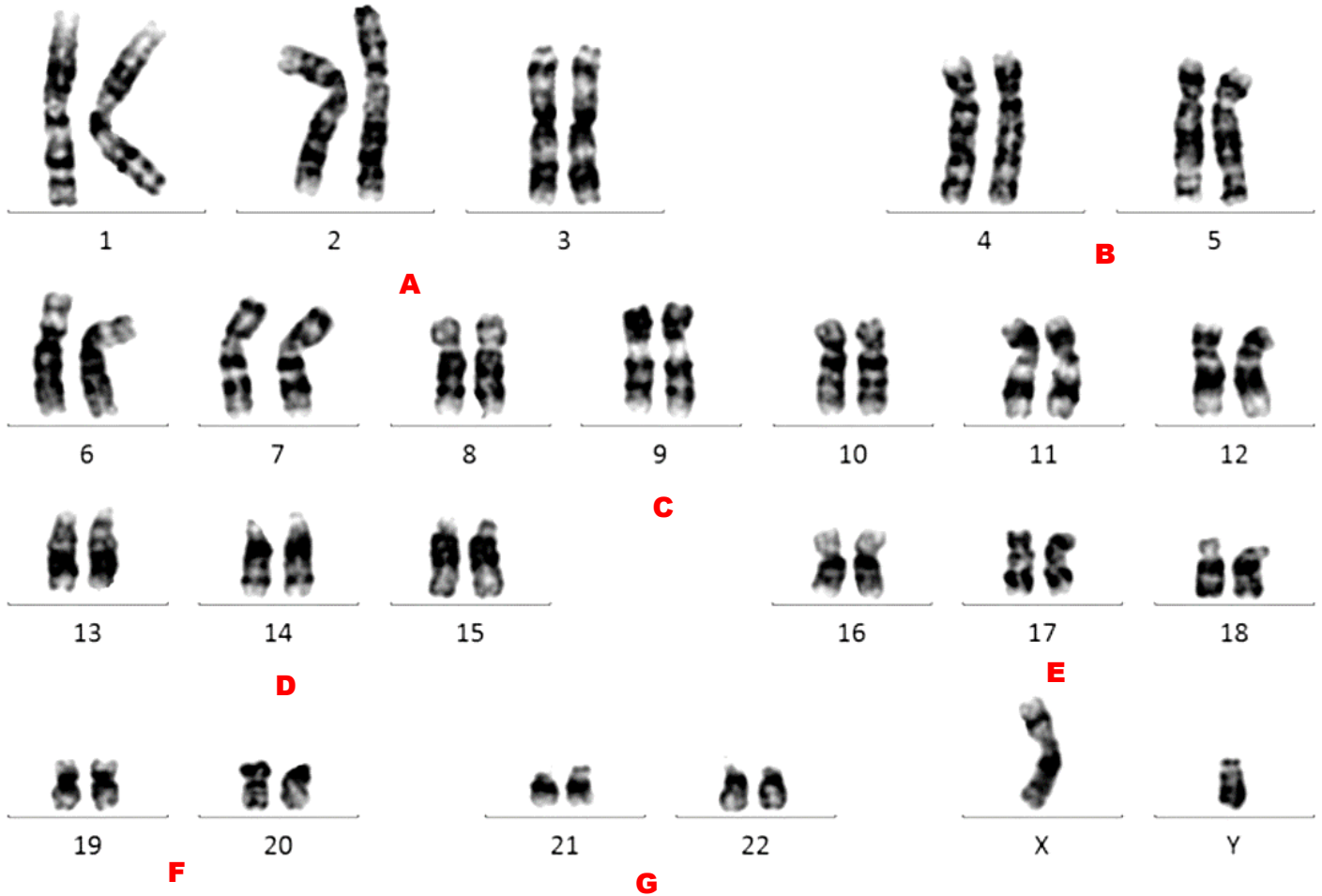


Las extensiones una vez secas pueden teñirse con una disolución de Giemsa al 2% en buffer de fosfatos. Para ello se cubre el porta con la solución de tinción, se deja 10 minutos, se lava con agua destilada y se deja secar. Con este proceso se obtienen metafases en las que todos los cromosomas están teñidos uniformemente. Con esta técnica podemos contar el número de cromosomas y la morfología de cada uno, pero no es útil para identificar cada cromosoma. Mediante la tinción con Giemsa solo es posible detectar alteraciones en el número total o por grupos de los cromosomas pero permite saber que cromosoma está en exceso o en defecto.<sup>141</sup>

Las técnicas de bandeado originan una serie de marcas en forma de bandas y subbandas a lo largo de cada cromosoma (blancas, negras, grises) características para cada cromosoma que permiten su identificación individual y el estudio de su estructura para determinar la presencia de anomalías cromosómicas en su estructura. Hay descritas muchas técnicas pero las más utilizadas en citogenética son las bandas GTG, CGB y NOR.<sup>25</sup>

### **Bandas GTG**

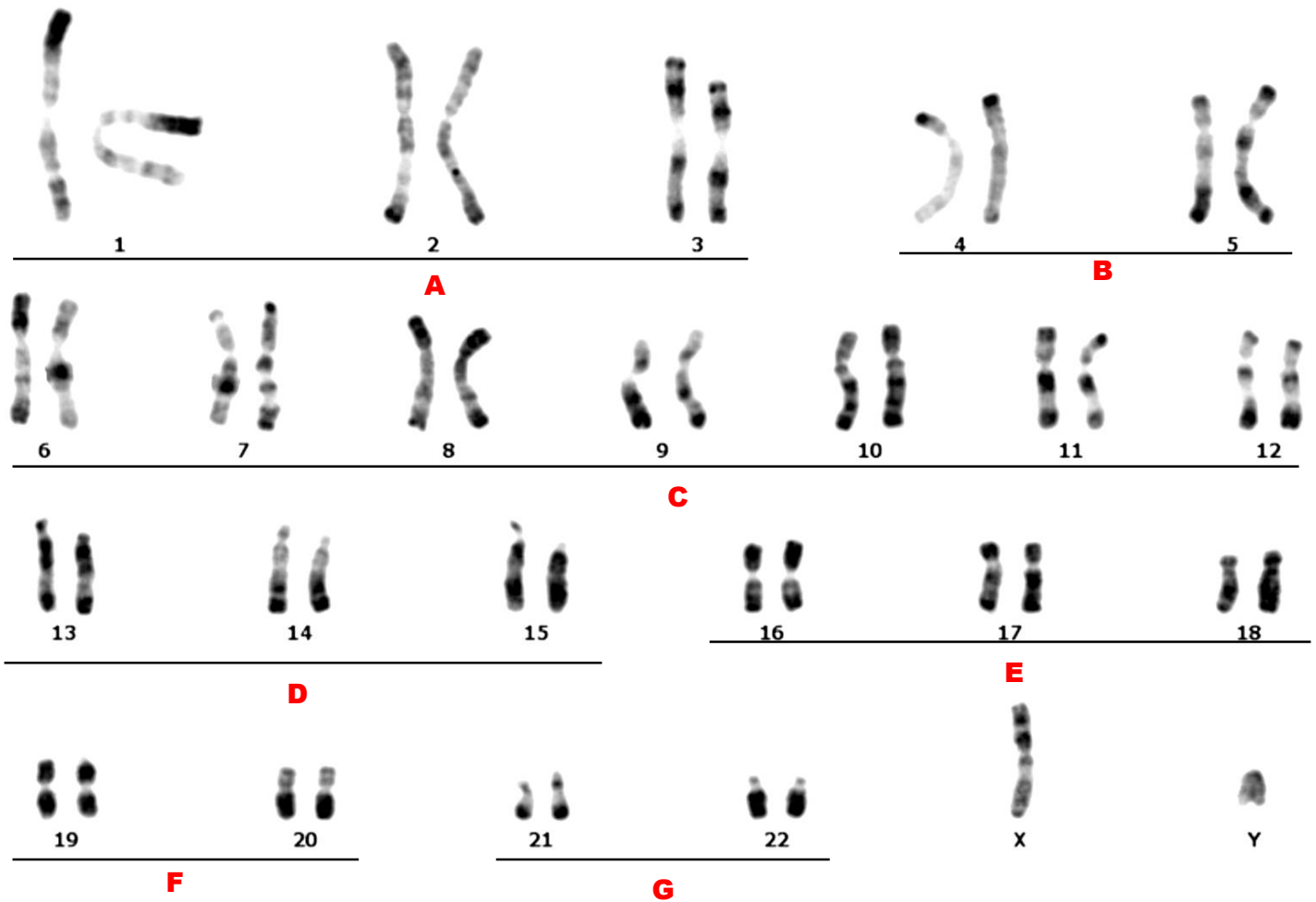
Las bandas G por tripsina (utilizando Giemsa) es la técnica que se utiliza habitualmente para la obtención del cariotipo. Consiste en un tratamiento con tripsina antes de la tinción con Giemsa o Wright. La tripsina digiere las proteínas; en las zonas de mayor condensación de los cromosomas la digestión será peor, se observarán zonas transversales oscuras, que contienen DN rico en bases A-T que replica tardíamente y son pobres en genes constitutivos. Las regiones menos condensadas aparecerán más claras; contienen DBNA rico en G-C, que replica tempranamente y tienen muchos constitutivos. Cada cromosoma posee bandas claras y oscuras características que permiten su identificación. Dependiendo del grado de condensación de los cromosomas, estos pueden aparecer más largos o más cortos. A mayor longitud de los cromosomas, mayor será el número de bandas que se podrán observar por tanto será mayor la resolución del cariotipo. La resolución necesaria es de un mínimo de 450-550 bandas (suma de todas las bandas de los 46 cromosomas). A medida que los cromosomas están menos condensados, cada banda a su vez se subdivide en subbandas. El tiempo de tratamiento con tripsina es un punto clave para conseguir metafases de buena calidad. Un tratamiento escaso de tripsina provoca que no aparezcan bandas en los cromosomas mientras que un tratamiento excesivo origina una digestión de todo el cromosoma, apareciendo hinchado.<sup>25, 24, 141</sup>



**Figura 15.** Cariograma por la técnica de bandeo G (GTG), mostrando 22 pares de autosomas y los cromosomas sexuales. 46 XY.<sup>82</sup>

### Bandas R

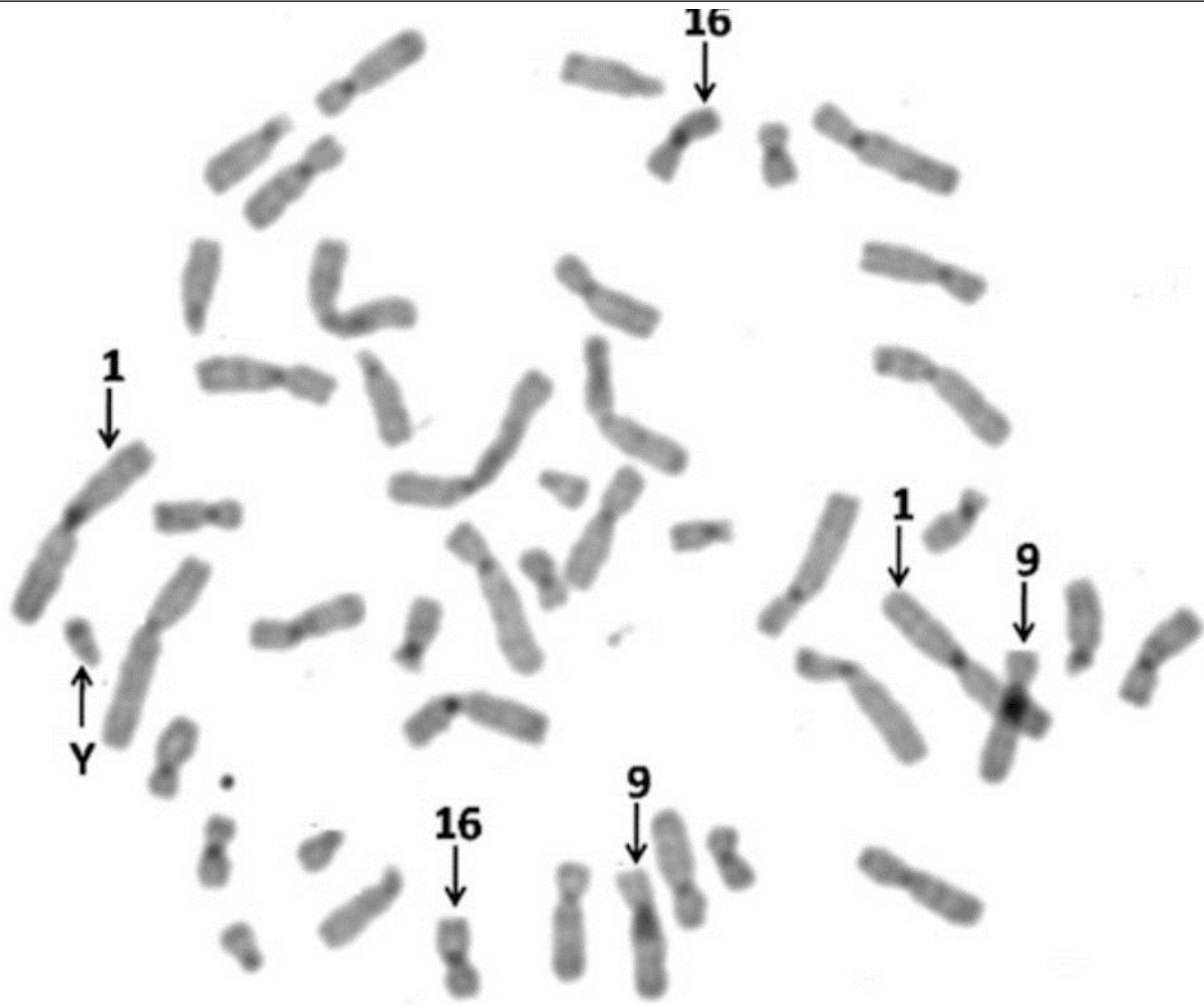
La técnica de bandeo R, es reverso al bandeo G y previo a la tinción con Giemsa se realiza un tratamiento con calor. Este método es muy útil si se quieren teñir los extremos distales de los cromosomas. Otras técnicas de tinción incluyen bandeo-C y tinción de la zona del organizador nucleolar (tinción NOR).<sup>141, 25</sup>



**Figura 16.** Cariograma por la técnica de bandeo R, mostrando 22 pares de autosomas y los cromosomas sexuales. 46 XY.<sup>82</sup>

### **Bandas CBG**

Las bandas CBG consisten en un tratamiento con ácido clorhídrico, hidróxido de bario y tinción con Giemsa, de ahí su nombre. Se utilizan para observar la heterocromatina constitutiva de los cromosomas. Esta se encuentra en todos los centrómeros y en la región subcentromérica de los cromosomas 1, 9, 16 y el extremo final del brazo corto del cromosoma Y. Para su observación se realiza un tratamiento con HCL y Ba (OH)<sup>2</sup> que digiere todo el cromosoma excepto las regiones más condensadas que corresponden a la heterocromatina constitutiva. Posteriormente se tiñe con Giemsa durante 45 minutos.



**Figura 17.** Cariograma con la técnica de bandeo C (CBG), mostrando las regiones heterocromáticas constitutivas las regiones de los cromosomas 1, 9, 16 y Y que están teñidas de forma oscura.<sup>82</sup>

En México, el Registro de Cáncer basado en la población coloca a las enfermedades hematológicas malignas en los primeros cinco lugares. Los estudio citogenético en hematopatías malignas y benignas es importante para la caracterización de la enfermedad, ya que contribuye al diagnóstico y es un factor pronóstico bien definido. En más del 50% de las neoplasias hematológicas malignas, se han caracterizado alteraciones cromosómicas clonales basado en el número de cromosomas (hiperdiploidia, trisomías o monosomías) o la estructura de los cromosomas (translocaciones, inversiones, deleciones). El primer reordenamiento cromosómico descrito en el cáncer, y actualmente mejor caracterizado en pacientes con LMC, es  $t(9;22) (q34;q11)$ , también conocido como el cromosoma de Filadelfia (Ph +). Los genes implicados en el rearreglo de Ph + son ABL y BCR, que, cuando se fusionan, causan una oncoproteína BCR/ABL con actividad tirosina quinasa. Esta

proteína es el objetivo del tratamiento de la CML utilizando inhibidores de la tirosina quinasa. El estudio citogenético del marcador Ph + es una forma de evaluar el efecto de los inhibidores de la tirosina quinasa en la leucemia durante el seguimiento de pacientes con LMC. En pacientes con AML-M3 o leucemia promielocítica aguda (APL), el ácido transretinoico (ATRA) es otra objetivo en la terapia dirigida contra un gen de fusión, PML/RARa, causado por la t (15;17) (q22; q21). La presencia de t(15; 17) en pacientes con sospecha clínica de M3 es un diagnóstico que indica un candidato para el tratamiento con ATRA. En LLA, las alteraciones citogenéticas que presentan una alto riesgo es t(9;22) (q34;q11), t (4;11) (q21; q23) e hipodiploidia con 30-39 cromosomas (baja hipodiploidia). Las alteraciones con mejor pronóstico en LLA son t(12; 1) (p13 q22) e hiperdiploidia con más de 50 cromosomas. En AML, las alteraciones de bajo riesgo son: t(8; 1) (q22; q22), t (15;17) (q22;q21), inv(16)(p13q13), rearr(11q23) por el contrario de alto riesgo son: reordenamientos 3q, monosomía 7 y t (1;22) (q10; p10).<sup>114</sup>

En diciembre de 2016 el Hospital General de México público un artículo de un estudio retrospectivo que afirma que las neoplasias hematológicas son generadas por alteraciones en células progenitoras hematopoyéticas y presentan rearrreglos cromosómicos en >50% de los pacientes que son de utilidad como factores de diagnóstico y pronóstico. En su estudio incluyeron a los pacientes que se diagnosticaron con algún tipo de leucemia de 2000-2014, con algunos criterios de exclusión. El cariotipo fue normal en 66.7% de las muestras, el resto 33.3% presentó alteraciones cromosómicas: 65% estructurales y 35% numéricas. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia fueron la t(9;22)(q34;q11) 26%, hiperdiploidía y poliploidía 19.3%, translocaciones variadas 8.4%, hipodiploidía 8%; t(15;17)(q22;q12) 7.8%; alteraciones relacionadas con SMD (del5q/-5/-7/+8) 7.7%. En menor proporción (<7%) se observaron diferentes deleciones, trisomías, monosomías y/o cariotipo complejo. El cariotipo sigue siendo de utilidad para confirmar diagnósticos como en los casos con t(9;22) en LMC o t(15;17) en M3 siendo muy útil como auxiliar para establecer pronósticos y clasificar con base en el riesgo a los pacientes.<sup>117</sup>

**Tabla 13.** Pruebas genéticas de diagnóstico a pacientes con leucemia en función del tiempo (Modificada de Raygoza, 2017)

	Panel	Muestra	Observaciones
<b>Diagnóstico</b>	Cariotipo	MO	Siempre. SP si aspirado seco
	FISH	MO	Aconsejable. Obligado si cariotipo no adecuado
	RT-nested	SP	Siempre
	RQ-PCR (IS)	SP	Opcional
	Mutación	SP	En fase acelerada o blástica
<b>Seguimiento</b>	Cariotipo	MO	Mes 3, 6 y cada 6 meses hasta la RCgC confirmada en 2 estudios. Luego según evolución
	FISH	MO/SP	Cuando la RQ-bcr-abl no es posible
	RQ-BCR-ABL	SP	Cada 3 meses hasta RMolM. Luego cada 6 m.
	Mutación	SP	Si criterios de fallo o respuesta subóptima o previo a cambio de ITK
Muestra: Cariotipo y FISH en heparina (verde), generalmente MO (2-5 ml). PCR y mutación en EDTA (malva), generalmente SP (5-10 ml)			

### 5.3 Alteraciones citogenéticas en pacientes con Leucemia

En las neoplasias, las alteraciones moleculares suelen afectar a genes claves implicados en el control del ciclo celular, o en los mecanismos de apoptosis. También pueden ser secundarias a la fusión de genes normales y a la formación de genes nuevos que dan lugar a proteínas oncogénicas. 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.<sup>102</sup>

Los parámetros comúnmente utilizados que se asocian con peores resultados, por ejemplo, en la LLC son el sexo masculino,  $\geq 65$  años de edad, el mal estado de rendimiento debido a comorbilidades médicas, ciertas características de las células CLL, como la expresión de IGHV1,2 no mutado, ZAP70, CD49d (también conocida como integrina  $\alpha 4$ ) o CD38. La presencia de del(17p) o del(11q), cariotipo complejo (es decir, la presencia de tres o más aberraciones cromosómicas observadas en un test cariotipo) o un recuento alto de linfocitos absolutos ( $> 50.000$  células por  $\mu\text{l}$ ) y/o enfermedad de etapa tardía en la presentación inicial. Del (17p) se asocia a menudo con la inactivación de mutaciones en TP53 y es un predictor de mal resultado para el tratamiento con regímenes que implican la quimioterapia convencional. Para los pacientes que necesitan tratamiento, la presencia de del(17p) o TP53 mutada son las características más importantes que están dirigiendo actualmente la elección del tratamiento. A continuación, la edad avanzada  $> 65$  años, la presencia de comorbilidades médicas y los objetivos del tratamiento tienen una influencia sustancial en

la elección de la terapia. Cada vez más, el estado mutacional de IGHV, por ejemplo, se considera como un parámetro para determinar el tipo de terapia; por ejemplo, los regímenes basados en quimioterapia se reservan para los pacientes con CLL e IGHV mutado. Por los ejemplos citados anteriormente, es importante conocer las alteraciones cromosómicas más comunes en pacientes con leucemia, además de conocer las posibles nuevas alteraciones halladas en los mismos, pues estas pueden conducir a la elección de un mejor tratamiento por ejemplo, como a la investigación de nuevas terapias para los pacientes con leucemia y además la caracterización completa del tipo de leucemia que se presenta.<sup>82</sup>

#### **4.5.1 Cromosoma Filadelfia**

El cromosoma de Filadelfia fue la primera anomalía cromosómica descubierta en el cáncer mediante técnicas citogenéticas en 1960, y se asoció constantemente con la leucemia mieloide crónica. Los avances técnicos innovadores en el campo de la citogenética del cáncer han ayudado a la detección de alteraciones cromosómicas, y han facilitado la investigación y el potencial de estudios cromosómicos en neoplasias. El análisis cromosómico de la célula es la forma más fácil de comprender la relación entre la evolución clonal y la progresión de la enfermedad de las células cancerosas. El uso de técnicas avanzadas de hibridación in situ (FISH) por ejemplo, permite la identificación de alteraciones cromosómicas que no están resueltas por el cariotipo. La técnica de FISH superó muchos de los inconvenientes de evaluar las alteraciones genéticas en las células cancerosas mediante el cariotipo. Posteriormente, el desarrollo de tecnologías de microarrays de DNA proporciona una visión de alta resolución de todo el genoma, que puede agregar cantidades masivas de nueva información y abre el campo del citogenómica del cáncer. Sorprendentemente, la citogenética del cáncer no sólo proporciona información clave para mejorar el cuidado de los pacientes con neoplasias malignas, sino que también sirve de guía para identificar los genes responsables del desarrollo de estos estados neoplásicos y ha conducido a la aparición de terapias molecularmente dirigidas en el campo de medicina personalizada.<sup>24</sup>

El cromosoma de Filadelfia se asoció constantemente con la leucemia mieloide crónica, inaugurando una nueva era en el campo del diagnóstico genético del cáncer. Como sabemos, la identificación de las anomalías cromosómicas es crucial no sólo para el

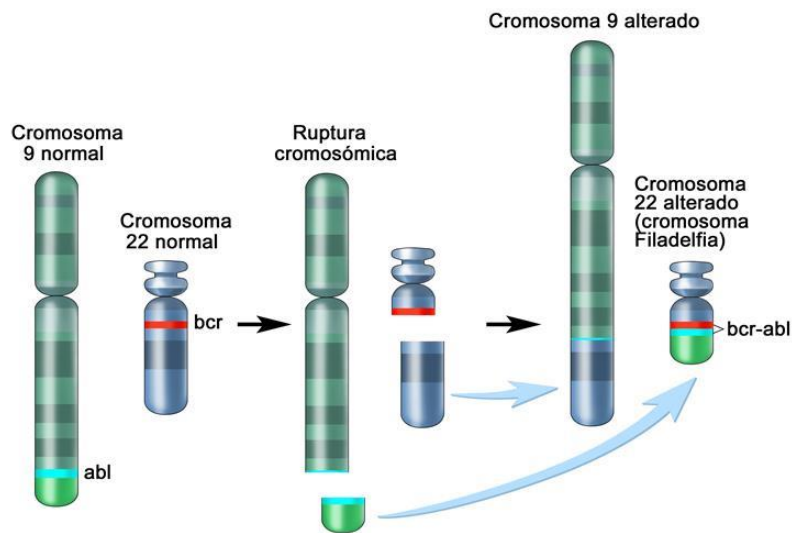
diagnóstico y el pronóstico en diferentes tipos de cáncer, sino también para el seguimiento de enfermedad mínima residual y/o recaída.

Las anomalías moleculares relacionadas con el cromosoma Filadelfia (Ph) han sido asociadas con la fisiopatología y el desarrollo de la leucemia. Estas fueron las anomalías moleculares descritas por primera vez. En 1960, Nowell y Hungerford detectaron una anomalía cromosómica conocida como cromosoma Filadelfia, en pacientes con leucemia; la misma fue identificada como 22q-. Más adelante, en 1973, Rowley describió que el cromosoma Ph resultaba de la translocación recíproca que implica también al cromosoma 9, y la anomalía fue designada t(9,22)(q34;q11). Hasta hace poco se consideraba que la adquisición del cromosoma Ph por las células progenitoras hematopoyéticas les confería a estas una ventaja proliferativa del clon leucémico sobre la hematopoyesis residual normal, la cual era suprimida indefinidamente. Recientemente se han publicado evidencias clínicas y de laboratorio que han demostrado la persistencia de la hematopoyesis Ph negativa en numerosos pacientes. Varios marcadores de clonalidad han sido utilizados para mostrar que al menos algunas células no pertenecen al clon leucémico y son aparentemente normales. No se conoce exactamente cómo se forma el cromosoma Ph ni qué tiempo debe transcurrir para que ocurra la progresión de la enfermedad. Se señala que las deleciones del material cromosómico en el q+ derivado, que ocurre en el 20 % de los pacientes con LMC, están relacionadas con una disminución de la supervivencia. Se considera que el clon Ph positivo tiene una susceptibilidad aumentada a los cambios moleculares adicionales en relación con la progresión de la enfermedad. El cromosoma Ph está presente en el 95 % de los pacientes con LMC y cerca de un tercio de los pacientes que aparentan tener un cariotipo normal lo tienen citogenéticamente oculto, pues expresan el BCR-ABL que representa la expresión molecular del Ph. La translocación t(9,22) existe como única anomalía cromosómica a través de la fase crónica de la enfermedad y se mantiene también durante las fases avanzadas, pero entre el 50 y 80 % de los pacientes adquieren anomalías cromosómicas adicionales con el avance de la enfermedad.<sup>41</sup>

Esta translocación que da lugar a un gen de fusión, produce un punto de ruptura en alguna parte de la ABL en la dirección opuesta al exón 2 y simultáneamente en el punto mayor de ruptura en el gen BCR. Como resultado, la porción 5' de la BCR y la porción 3' del gen ABL se yuxtaponen sobre un cromosoma 22 acortado (el cromosoma derivado 22q- o Ph). Ahora sabemos que este gen es responsable de los mecanismos fisiopatológicos de la LMC y su



actividad tirosina quinasa desempeña un papel importante en la transformación de los tumores malignos. Al reconocer este papel clave del gen BCR-ABL en el desarrollo de la LMC, se ha podido concebir inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), que bloquean la fijación de ATP, inhibiendo así la actividad de esta enzima. En 1998, el primer TKI introducido en la práctica clínica fue imatinib (IM, Glivec, Novartis Pharmaceuticals) debido a su alta eficacia y baja toxicidad, esta terapia se convirtió en la primera opción para los pacientes con LMC. La introducción de imatinib cambió sustancialmente el curso del pronóstico en CML y marcó el comienzo de la era de la terapia molecular en tumores malignos.<sup>89, 100</sup>



**Figura 18.** Formación del cromosoma Filadelfia por translocación de los cromosomas 9 y 22. (NIH, 2017)

Mientras la translocación es observada en el 100 % de las metafases al diagnóstico, el porcentaje de las células Ph positivas disminuye con el tratamiento, por lo que la respuesta a un agente terapéutico determinado puede ser evaluada mediante el seguimiento de las metafases Ph positivas. Se ha demostrado una estrecha relación entre la evolución citogenética y la progresión de la enfermedad. Este hecho está dado por la evidencia de que los cambios citogenéticos adicionales al cromosoma Ph, acompañan, y en ocasiones preceden a la transformación aguda.<sup>41</sup>

**Tabla 14.** Alteraciones citogenéticas y moleculares más comunes de las Leucemias.  
(Información recopilada de diferentes fuentes, tabla de elaboración propia)

ALTERACIÓN CROMOSOMICA	GEN	TIPO DE LEUCEMIA	PRONÓSTICO
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL	LGC, LLA	x
del13(q14)		LLC	✓
del17(p13)	TP53	LLC	x
del11q22	ATM	LLC	x
t(4;11)(q21;q23)	AF4-MLL1	LLA	
t(1;19)(q23;p13.)	E2A-PBX1	LLA	x
t(8;14)(q24;q32)	MYC-IGH	LLA	
del(11q23)	MLL	LLA, LAM	x
del6q, 9p y 12p		LLA	
t(11;14)(q13;q23)	IGH/CCND1	LLA	
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	LLA	
t(17;19) (q22;p13.3)	E2A-HLF	LAL	x
t(18;21) (q21;q22)	RUNX1	LAM-M2	✓
t(8;21)(q22.1;q22.3)	AML1/ETO	LAM-M2	✓
t(15;17)(q22;q11.2)	PML/RAR	LAM-M3	✓
t(6;9) (p23;q34)	DEK/ AN/NUP214	LAM	x
t(4;11)(q21;q23)	KMT2A/AFF1	LLA-B	
t(9;11), t(6;11) y t(8;16)		LAM	
T(1;22)(p13;q13)		LAM	✓
Inv16		LAM	
dup(6)(q22-q23)	MYB	LLA	

Aproximadamente el 80% de los pacientes con LLC llevan al menos una de cuatro alteraciones cromosómicas comunes: del(13q), del (11q), del (17p) y trisomía 12. Del (13q) es la alteración cromosómica más frecuente, evidente en > 50% de los pacientes, y se asocia con pronóstico favorable. Dentro de esta región suprimida se encuentra el grupo DLEU2-mir-15-16, que regula la expresión de proteínas que pueden inhibir la apoptosis o

que están implicadas en la progresión del ciclo celular. del(17p) se encuentra en el 7% de los pacientes y se asocia con la pérdida del gen supresor tumoral TP53, mientras que del(11q) se encuentra en el 18% de los pacientes y suele asociarse con alteraciones en ATM (codifica una proteína implicada en la reparación del ADN); cada una de estas alteraciones cromosómicas se asocia con resultado clínico adverso, aunque esto ha mejorado en los últimos años. La trisomía 12 se encuentra en el 16% de los pacientes con LLC y se asocia con un pronóstico intermedio.<sup>82, 15</sup>

Las anomalías genéticas recurrentes asociadas con un pronóstico deficiente en LLA, incluyen BCR-ABL1 que se genera a partir de la t(9;22) (q34;q11.2), conocida también como cromosoma Filadelfia (Ph+), reordenamientos de MLL como del11(q23), y la hipodiploidia. Los reordenamientos MLL se encuentran en alrededor del 75% de los pacientes con LLA infantil y predicen un mal pronóstico para este grupo de pacientes. Los reordenamientos del gen MLL están presentes en la mayoría de los casos de leucemia aguda (LA) infantil y están asociados con variables biológicas específicas y con pobres resultados clínicos. La mayoría de los pacientes con LLA hipodiploide tienen 45 cromosomas y su resultado se ha reportado que es similar a aquellos con ALT no hipodiploide. Por el contrario, los pacientes con LLA hipodiploide con  $\leq 44$  cromosomas, incluyendo aquellos con hipodiploidia baja (32-39 cromosomas) y haploides (24-31 cromosomas), tienen significativamente peor pronóstico de supervivencia. Un estudio reciente encontró que el 91,2% de los pacientes con hipodiploidia baja tienen mutaciones TP53, muchos de los cuales también mostraron mutaciones en células no tumorales, lo que indica que todos los pacientes con hipodiploidia baja pueden tener el síndrome de Li-Fraumeni subyacente. Por lo tanto, la prueba para las mutaciones TP53 en pacientes con hipodiploidia baja puede permitir el asesoramiento genético para aquellos con mutaciones en la línea germinal. Los pacientes con E2A-PBX1 generada por t(1;19)(q23;p13.3) se habían considerado anteriormente como de mal pronóstico. Sin embargo, los pacientes tratados recientemente tuvieron un resultado favorable, y esta anomalía genética ya no es considerada un factor de riesgo con cierto tratamiento. Por el contrario, los pacientes con reordenamiento E2A-HLF provocado por t(17;19) (q22;p13.3) tienen resultados extremadamente pobres.<sup>83, 92</sup>

Muchos casos de neoplasias mieloides se asocian con aberraciones citogenéticas recurrentes. El análisis cromosómico puede ayudar en el diagnóstico, predecir el pronóstico y revelar la evolución clonal subsiguiente. En muchos casos de LMA se han encontrado anomalías genéticas recurrentes que afectan a las vías de las células mieloides. En 2008,

la OMS revisó la clasificación de neoplasias mieloides para proporcionar una versión actualizada, con datos recientes. Los reordenamientos cromosómicos adicionales son la categoría más actualizada de LMA con anomalías genéticas recurrentes en la revisión de 2016 (Tabla 11) El análisis citogenético de células de médula ósea es importante durante la evaluación diagnóstico y predicción del pronóstico. Por ejemplo los pacientes con LMA que albergan t(15;17) (q22; q21), t (8; 21) (q22; q22) e inv (16) (p13.1q22)/t(16;16) (p13.1; q22) están asociados con resultados favorables, mientras que aquellos con inv(3) (q21q26.2)/ t(3; 3)(q21; q26.2), del5q, monosomías del cromosoma 5 y/o 7, o cariotipos complejo están asociados con peores pronósticos.<sup>24, 85</sup>

**Tabla 15.** Clasificación actualizada de leucemia mieloides aguda con anomalías genéticas recurrentes (Modificada de WHO, 2016)

<b>LAM con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1</b>
<b>LAM con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11</b>
<b>LAM con PML-RARA</b>
<b>LAM con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A</b>
<b>LAM con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214</b>
<b>LAM con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM</b>
<b>LAM (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1</b>
<b>LAM con BCR-ABL1 (entidad provisional)</b>
<b>LAM con el gen NPM1 mutado</b>
<b>LAM con mutaciones bialelicas de CEBPA</b>
<b>LAM con el gen RUNX1 mutado (entidad provisional)</b>

Por otro lado la LLA, que es una malignidad de los linfoblastos; puede observarse a cualquier edad, pero es predominantemente enfermedad infantil. La LLA de linaje de células B se identifica en aproximadamente el 80-85% de los casos, mientras que el 15% proviene de precursores de células T. La base genética de LLA es diversa; sin embargo, se han definido múltiples categorías recurrentes de anomalías citogenéticas. Junto con la edad, el recuento de leucocitos y el inmunofenotipo, la citogenética proporciona un indicador pronóstico clave en pacientes con LLA. La dificultad de obtener suficientes células metafásicas de calidad para el análisis del aspirado de médula ósea y muestras de sangre periférica de todos los pacientes es bien conocida. Aunque las técnicas genómicas y moleculares, tales como microarray, transcripción reversa-PCR (RT-PCR), y la

secuenciación también puede ser herramientas valiosas para la investigación de estas muestras, el análisis citogenético proporciona una visión rápida de la genética de todos los pacientes, y sigue siendo un componente integral de la elaboración diagnóstica.<sup>24</sup>

Las aberraciones cromosómicas son el sello de LLA, pero no son suficientes para generar leucemia. Las translocaciones características incluyen t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(1;19) [TCF3-PBX1], t (9;22) [BCR-ABL1]. Más recientemente, una variante con un gen similar al perfil de expresión al cromosoma Filadelfia, LLA Ph-positivo pero sin haber identificado el reordenamiento BCR-ABL. En más del 80% de los casos de esta LLA denominada tipo Ph, la variante posee deleciones en los principales factores de transcripción involucrados en el desarrollo de células B incluyendo IKAROS de la familia de zinc (IKZF1), el factor transcripción 3 (E2A), factor de células B temprana 1 (EBF1) y PAX5. De manera similar, las mutaciones activadoras de quinasa se observan en el 90% de la LLA tipo Ph. Las más comunes incluyen reordenamientos involucrando ABL1, JAK2, PDGFRB, CRLF2 y EPOR, activando mutaciones de IL7R y FLT3 y la deleción de SH2B3, que codifica el regulador negativo JAK2 LNK. Esto tiene implicaciones significativas en el efecto terapéutico, ya que sugiere que la LLA tipo Ph, que tiende a peor pronóstico, pueda responder a inhibidores de quinasa.<sup>83</sup>

En el caso de la leucemia linfocítica crónica (LLC) y otros linfomas no Hodgkin que afectan principalmente a los pacientes mayores, se definen como un grupo heterogéneo de neoplasias malignas del sistema linfático de muchas condiciones diferentes, y pueden clasificarse por la agresividad o el origen de los linfocitos leucémicos. Recientemente la Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasificó en grupos, no solo en tejidos linfoides y hematopoyéticos sino también por características fenotípicas, moleculares o citogenéticas. Las aberraciones cromosómicas son los factores pronósticos independientes, que permiten la estratificación de los pacientes con LLC con respecto al curso clínico, el tiempo hasta el primer tratamiento (TTT) y la supervivencia global (OS). Los métodos estándar utilizados para la detección de alteraciones cromosómicas implican citogenética convencional, es decir, análisis de cromosomas por bandeo (CBA) e hibridación in situ por fluorescencia (FISH). CBA identifica aneuploidias cromosómicas, deleciones, adiciones, así como translocaciones y cariotipos complejos ( $\geq 3$  alteraciones). Las técnicas rutinarias de citogenética clásica son ineficaces en pacientes con LLC, debido a la baja actividad proliferativa de Linfocitos in vitro, incluso en cultivos suplementados. Los

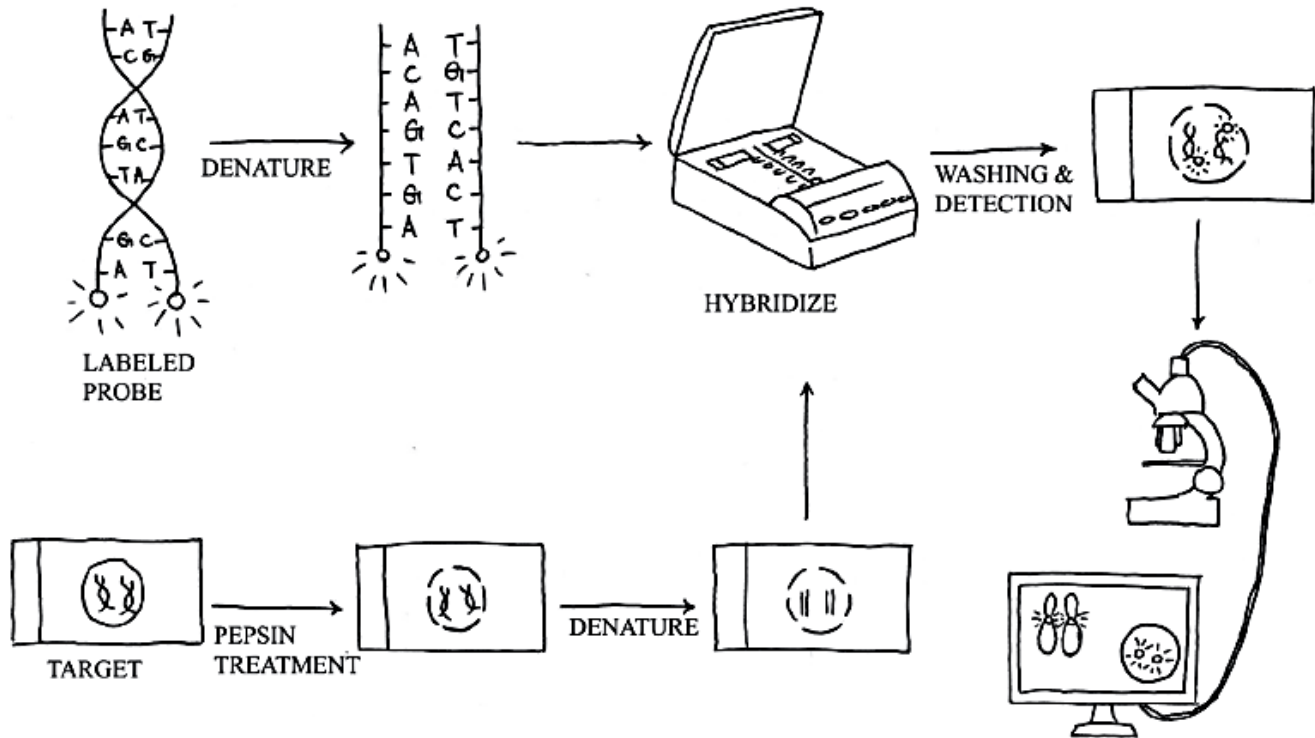
cromosomas en metafase son frecuentemente de mala calidad, o las células que se dividen se encuentran como linfocitos T normales.<sup>24</sup>

#### **5.4 Diagnóstico Citogenético Molecular de la Leucemias**

El diagnóstico citogenético molecular consiste en la combinación de biología molecular y citogenética. Por lo general, esto incluye la utilización de una serie de técnicas del estilo de hibridación por fluorescencia in situ (FISH), en la cual las muestras de DNA están marcadas con diferentes colorantes que emiten fluorescencia para así poder visualizar mejor las regiones específicas del genoma que se quiera. FISH también puede emplearse para observar directamente los cromosomas metafásicos o los núcleos interfásicos. A parte, se puede tomar un método indirecto en el que el genoma completo es evaluado en cuanto a cambios en el número de copias utilizando un cariotipo virtual. Los cariotipos virtuales se generan a partir de matrices compuestas de miles de millones de muestras, y se usan herramientas computacionales con el fin de hacer una “simulación por ordenador” del genoma. El ensayo de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) se basa en la capacidad del DNA de una sola hebra para hibridarse con otra secuencia de DNA. Es aplicable a los loci del gen del mapa en cromosomas específicos, y sirve para detectar anomalías cromosómicas tanto estructurales como numéricas. Ha superado muchos de los inconvenientes del análisis cromosómico, como la mala calidad de las células en metafases, bajo índice mitótico, muestras de bajo rendimiento y otras dificultades técnicas impredecibles. FISH es una herramienta indispensable y poderosa en los laboratorios. Es ampliamente utilizado para la detección de reordenamientos estructurales tales como translocaciones, inversiones, inserciones y microdeleciones, y para la delineación de los cromosomas y las regiones de ruptura de las anomalías cromosómicas. Cabe destacar que FISH ha mejorado considerablemente la eficacia y exactitud del análisis de cariotipos complementando las técnicas de cariotipado y genética molecular. La detección in situ provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas que es crucial para dilucidar la organización y función génica, por lo que el método de hibridación in situ se ha convertido en una técnica importante en diversos campos, incluyendo diagnóstico de rearrreglos cromosomales, detección de infecciones virales y análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario. Este campo relativamente nuevo de la citogenética, que hace uso de una variedad de secuencias de ácido nucleico como sondas

dianas de ADN celular, ayudó a salvar la brecha entre la genética molecular y los análisis citogenéticos clásicos.<sup>24, 23</sup>

El descubrimiento del cromosoma de Filadelfia en la LMC seguida de la caracterización de la t(9; 22)(q34; q11) con las fusiones de los genes ABL1 / BCR subyacentes son la causa del estudio de las anomalías cromosómicas en carcinogénesis y establecen las bases para la citogenética del cáncer. El cáncer se considera una enfermedad genética a nivel celular resultante de un proceso progresivo o un evento catastrófico de una sola vez. Las dos principales vías patogénicas para las características del desarrollo del cáncer son la inactivación del tumor supresor de genes por deleciones, mutaciones, miRNA sobre regulado, o mecanismos epigenéticos, y la activación o desregulación de oncogenes como consecuencia de mutaciones puntuales, amplificación o anomalías citogenéticas equilibradas. Se han caracterizado las anomalías cromosómicas recurrentes que incluyen translocaciones, deleciones, duplicaciones, y amplificaciones génicas asociadas con distintas entidades tumorales; los paneles para FISH diseñados de manera específica han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico y seguimiento de anormalidades cromosómicas en tumores hematológicos y sólidos.<sup>110, 133</sup>



**Figura 19.** Protocolo para realizar FISH. Incluye el pretratamiento de una muestra, desnaturación de la sonda y la muestra, hibridación, lavado post-hibridación y detección de la señal fluorescente.<sup>82</sup>

### 5.4.1 FISH

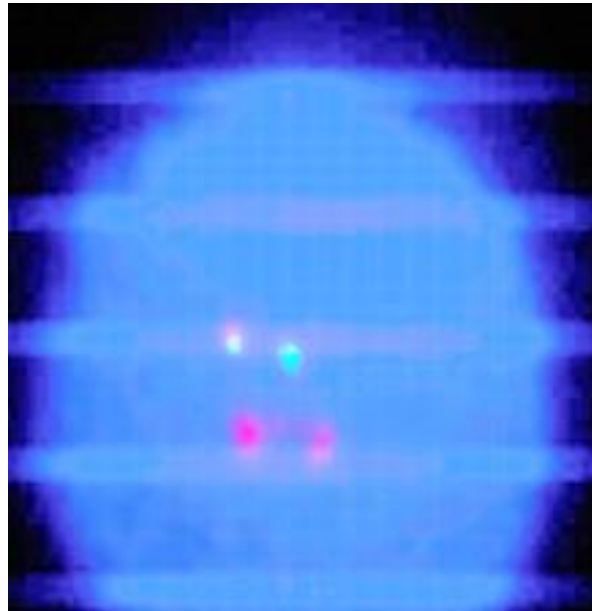
La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) es una tecnología de reconocimiento de macromoléculas basada en la naturaleza complementaria de las cadenas dobles de DNA o RNA. Las cadenas de DNA seleccionadas incorporadas con nucleótidos acoplados con un fluoróforo pueden usarse como sondas para hibridarse sobre las secuencias complementarias en células y tejidos y luego visualizarse a través de un microscopio de fluorescencia o un sistema de formación de imágenes. Esta tecnología se desarrolló inicialmente como una herramienta de mapeo físico para delinear los genes dentro de los cromosomas. Su alta resolución analítica y alta sensibilidad y especificidad permitió una aplicación inmediata para el diagnóstico genético de aneuploidías comunes constitucionales, síndromes de microdelección microduplicación y reordenamientos subtroméricos. Las pruebas de FISH utilizan paneles de sondas específicas de genes para pérdidas, ganancias y translocaciones somáticas recurrentes y se han aplicado rutinariamente para tumores hematológicos y sólidos y son una de las áreas de mayor crecimiento en el diagnóstico de cáncer. FISH también se ha utilizado para detectar



infecciones bacterianas y parásitarias como la malaria en las células sanguíneas humanas. Los recientes avances en la tecnología FISH implican varios métodos para mejorar la eficiencia de etiquetado de la sonda y el uso de sistemas de imágenes de súper resolución para la visualización directa de la organización cromosómica intranuclear y el perfil de la transcripción de RNA en células individuales.<sup>133</sup>

La citogenética molecular implica el uso de una serie de técnicas denominadas FISH, en las que las sondas de ADN están marcadas con marcadores fluorescentes de diferentes colores para visualizar una o más regiones específicas del genoma. Se utiliza como una prueba rápida y sensible para la detección de cambios cromosómicos crípticos o sutiles. El protocolo FISH incluye cinco etapas: 1) pretratamiento de la muestra, 2) desnaturalización de la sonda y muestra, 3) hibridación de la sonda a las células diana o extendidos en metafase (recocido), 4) Lavado de hibridación, y 5) detección usando un microscopio de epifluorescencia simple con conjuntos de filtros apropiados. Cuando se implementa inicialmente una prueba FISH, las características de rendimiento del ensayo evaluadas deben incluir sensibilidad, precisión y especificidad. La nomenclatura estándar FISH se ha simplificado y ampliado en la última edición del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana, ISCN 2013. Sin embargo, dado que es probable que el uso del ISCN FISH completo dificulte la comprensión de los médicos, no es recomendada por la European Myeloma Network.<sup>25</sup>

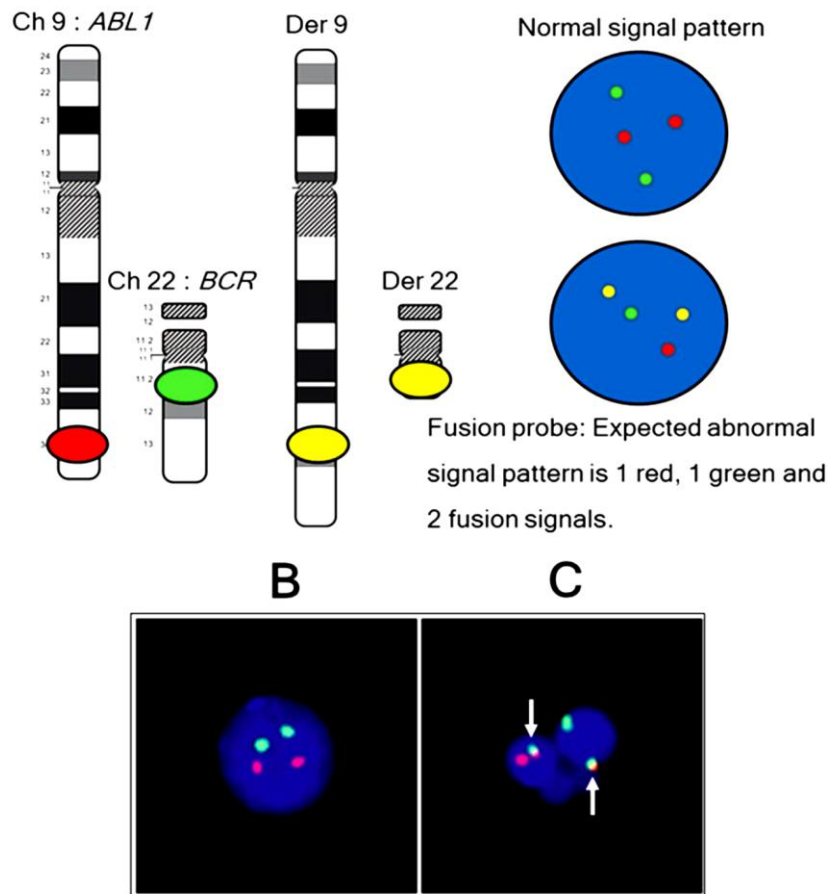
FISH es una técnica de diagnóstico molecular que utiliza sondas de DNA para detectar o confirmar genes o anomalías cromosómicas, se utiliza a menudo tanto para la investigación como para el diagnóstico de malignidades hematológicas y tumores sólidos. La mayor ventaja de FISH es que la técnica se puede realizar en células en división (metafase) en las que se pueden distinguir cromosomas individuales o en células que no se dividen (interfase). Esta característica de FISH permite obtener resultados de manera más expedita que otras como cariotipo. Las sondas FISH se preparan comúnmente a partir de clones artificiales de cromosomas bacterianos (BAC).<sup>24</sup>



**Figura 20.** FISH patrones atípicos de fusión BCR-ABL en interfase, en el paciente con LMC (1F1G2R); Hibridación in situ por fluorescencia, BCR; región clúster de punto de interrupción, ABL; Abelson, SP; Sangre periférica y LMC; Mieloides crónica leucemia.<sup>132</sup>

Las translocaciones cromosómicas recurrentes y específicas pueden ser identificadas en las células por medio de sondas genómicas que se derivan de dos puntos de interrupción genéticos. Por ejemplo, la señal de fusión FISH se diseñó inicialmente como una técnica para la identificación de la t(9; 22), en células de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) para detectar la enfermedad residual mínima después del trasplante de médula ósea. Una sonda de especificación de locus para la región de agrupación de punto de interrupción (BCR) en 22q11.2 marcado con un fluorocromo verde y una sonda locus-específico para el oncogén homólogo viral de la leucemia murina de Abelson 1 (ABL1) en 9q34 marcado con un fluorocromo rojo que aparecerá como un punto amarillo brillante (señal de fusión única, combinación de fluorocromos verdes y rojos) en el cromosoma derivado 22 en células leucémicas vistas por microscopía de fluorescencia, indicando la presencia del gen de fusión BCR-ABL1 como resultado de t (9; 22) (q34; q11,2). FISH en interfase puede utilizarse para detectar cualquier anomalía cromosómica para la cual está disponible una sonda apropiada. La desventaja de la técnica FISH para genes fusión es una tasa de falsos positivos intrínsecamente alta que se produce como resultado de colocación de dos señales, que en realidad consiste de dos señales separadas en un núcleo tridimensional, pero se consideran una única señal colocada debido al análisis bidimensional de la núcleo.<sup>24</sup>

Translocation probe: *BCR/ABL 1* dual fusion probe

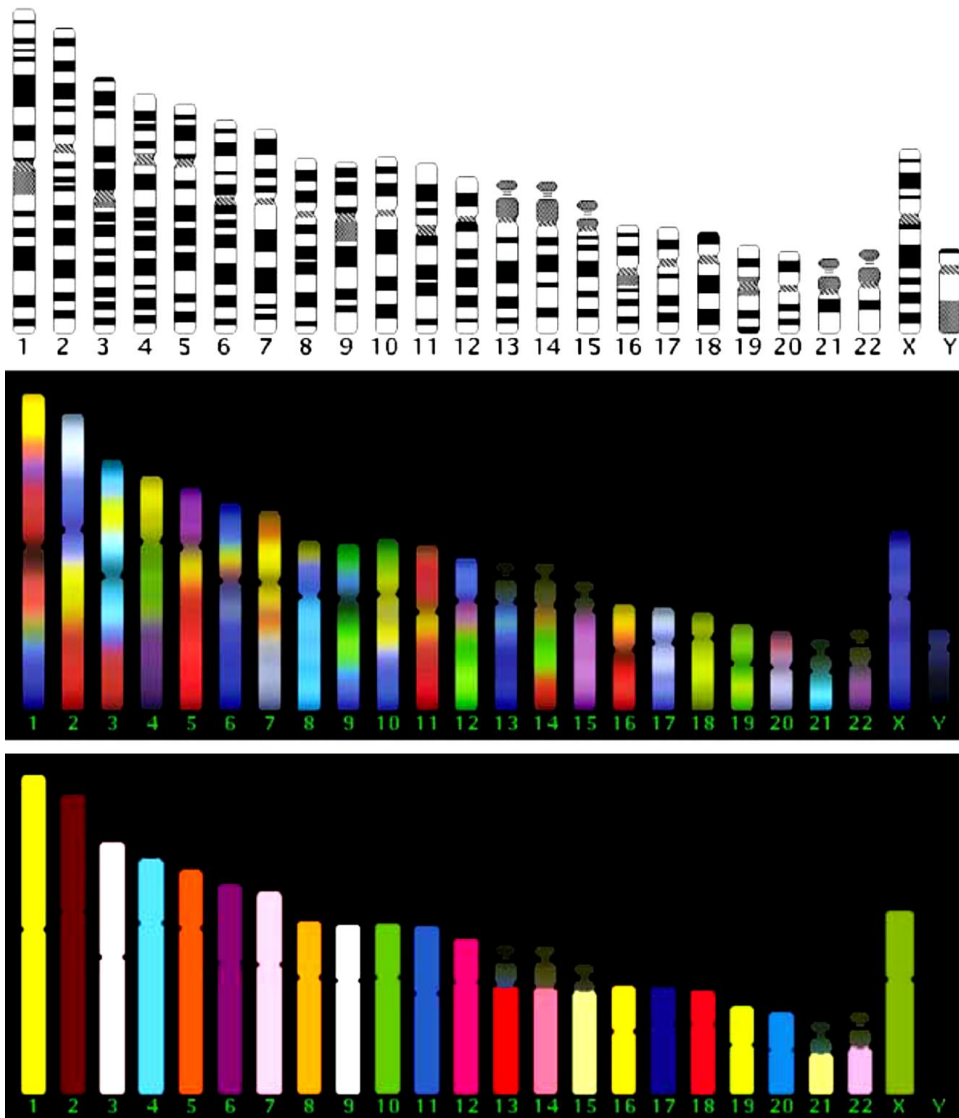


**Figura 21.** Ilustración esquemática de la sonda de doble fusión BCR-ABL1 de doble color diseñada para detectar la translocación del gen ABL1 en el cromosoma 9q34 y el gen BCR en el cromosoma 22q11.2 por hibridación in situ de fluorescencia (FISH). (b) sonda de doble fusión de doble color BCR - ABL1 hibridada a normal interphase células como se indica por dos naranja y dos señales verdes en cada núcleo. (c) Las células interfásicas con translocación que afecta a la BCR y ABL1 loci como se indica por una señal naranja, una señal verde, y dos naranja / verde (amarillo) señales de fusión (flechas).<sup>82</sup>

Desde su introducción hace más de 30 años y hasta hace poco tiempo, las técnicas estándar de bandeado cromosómico eran las únicas con capacidad para examinar cambios a nivel cromosómico en un solo experimento el genoma entero de células. Aunque FISH con sondas es hoy en día una técnica bien establecida que puede ayudar al análisis citogenético, la selección de sondas requería una presunción de lo que la aberración puede ser, un enfoque que es propenso a errores y puede requerir múltiples experimentos que consumen mucho tiempo. En los últimos años, hemos sido testigos de la aparición de diversas técnicas basadas en FISH capaces de generar imágenes de todo el genoma de las células neoplásicas.<sup>23</sup>

La larga búsqueda de obtener cariotipaje multicolor fue posible gracias a la disponibilidad de varios fluorocromos espectralmente discretos y el uso de sondas. Para identificar cada cromosoma humano con un color individual utilizando sondas de colores, son necesarios 24 conjuntos de sondas diferentes (22 pares de autosomas más los dos cromosomas sexuales). Multicolor-FISH (m-FISH) es una variante de FISH convencional y es muy útil para detectar y describir reordenamientos crípticos y cromosomas frecuentemente encontrados en cariotipos complejos, aunque es algo limitado en la identificación de cambios intracromosómicos y en la determinación del breakpoint. Sin embargo, la combinación del análisis de bandas cromosómicas con m-FISH tiene el potencial de identificar y describir la mayoría de los cambios cariotípicos de las células cancerosas. Varios métodos parcialmente diferentes para m-FISH ahora han sido descritos.<sup>23</sup>

Aunque en alrededor del 95% de todos los casos de LMC, el estándar de referencia para el diagnóstico es la citogenética convencional, el otro 5%, incluyendo translocaciones variantes, reordenamientos BCR-ABL o Ph enmascarado, sólo son detectables por citogenética molecular. Se utiliza la hibridación in situ fluorescente (FISH) como una técnica citogenética molecular rápida y fiable tanto en el diagnóstico como en el posterior seguimiento de LMC. Por otro lado, FISH se aplica a analizar las células de interfase y metafase. Por lo tanto, cuando no hay metafases adecuadas, FISH es un método confiable para ser usado.<sup>132</sup>



**Figura 22.** Ideogramas de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) técnicas de detección que son capaces de analizar todos los cromosomas en el mismo tiempo, proporcionando una visión general de los cambios cariotípicos de las células cancerosas. Arriba: bandas cromosómicas estándar (G-bandas); medio: especies cruzadas bandas de color (R FISH); parte inferior: multicolour-FISH (m-FISH).<sup>23</sup>

Los estudios citogenéticos convencionales se utilizan ampliamente hoy en día para diagnosticar y manejar pacientes con neoplasias hematológicas malignas. La aplicación de hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas de DNA específicas de cromosomas ayuda a definir adicionalmente subclases moleculares y categorías de riesgo citogenético para pacientes con estos trastornos. Además, FISH permite el análisis de células proliferantes (células metafásicas) y no proliferantes (núcleos interfásicos), y es útil para establecer el porcentaje de células neoplásicas antes y después del tratamiento

(enfermedad residual mínima). Para los pacientes con mielodisplasia o leucemia mieloide aguda, estas técnicas cromosómicas son importantes para el diagnóstico preciso y la clasificación de la enfermedad y para ayudar a decidir el tratamiento y controlar la respuesta a la terapia. Los estudios citogenéticos convencionales han sido problemáticos en la leucemia linfocítica crónica porque las células neoplásicas se dividen con poca frecuencia. Además, los estudios FISH de interfase permiten ahora la detección de anomalías cromosómicas con significado pronóstico en la leucemia linfocítica crónica. La Organización Mundial de la Salud reconoce que las anomalías genéticas son uno de los criterios más fiables para la clasificación de los linfomas malignos.<sup>131</sup>

En un estudio realizado en 2014 por la Universidad Ahar Branch, afirmaron que en comparación con FISH y las técnicas de cariotipo común en SP y MO, los resultados fueron similares, pero en pacientes con la terapia con imatinib, FISH pudo detectar BCR-ABL en el 30% de las células sanguíneas interfásicas, mientras que la técnica de bandeado G, no se observó ningún cromosoma filadelfia en metafases. Por otra parte, FISH fue capaz de detectar los patrones atípicos de BCR-ABL en este paciente en el momento del diagnóstico. Estos hallazgos se ajustan a los resultados de otros estudios, que muestran que FISH podía detectar la variante o el cromosoma filadelfia enmascarado que no fue detectable por citogenética convencional. Además en su estudio demostraron que los resultados obtenidos comparando la FISH en interfase (I-FISH) en SP y la citogenética en la MO en cinco pacientes mostró que la MO-citogenética es más confiable que SP-I-FISH en la detección de Ph. Sin embargo, en los estudios de Buno et Alabama, han demostrado una gran capacidad de aplicación de FISH para analizar SP con el fin de monitorear la respuesta a la terapia en pacientes con LMC. También se ha indicado que en los exámenes clínicos, los estudios citogenéticos de la MO deben ser diagnóstico inicial para detectar Ph + y otras anomalías cromosómicas en los pacientes. También mencionan que la fusión dual FISH (D-FISH) puede ser utilizado en SP, en lugar de MO, para evaluar la eficacia de la terapia.<sup>132</sup>

Los hallazgos de esta investigación revelaron que FISH es una técnica rápida, fiable y potente con la que podemos detectar al menos 200 células en un periodo corto de tiempo. Por otra parte, utilizando esta técnica, los resultados se obtienen en dos días. En adición, se ha demostrado el importante papel de FISH en la detección de otras señales atípicas de fusión de BCR-ABL. Sin embargo, estos hallazgos deben ser evaluados con otras sondas para FISH disponibles. Mientras tanto, FISH es capaz de detectar reordenamientos cromosómicos submicroscópicos que participan en la LMC y otras leucemias que no son

detectables por citogenética convencional, y también tienen un papel importante en el diagnóstico de fase y pronóstico de la enfermedad. Con base en los datos presentados en ese estudio, las muestras de MO demostraron ser más sensibles y fiables que las muestras SP; además, el análisis de FISH en SP no puede ser reemplazado por análisis convencional en MO. De hecho, cuando las muestras de MO son evaluados por FISH, esta sensibilidad aumenta. El uso de FISH para la detección de señales atípicas y típicas relacionadas con leucemias y considerando que estas señales desempeñan un papel específico en el pronóstico y la gravedad de la enfermedad, provistos de diferentes tipos de sondas específicas de los genes implicados en las enfermedades hematológicas malignas, la aplicación de esta técnica en el laboratorio genético es muy recomendable.<sup>132, 131</sup>

En general, tanto el cariotipo tradicional y la prueba FISH se utilizan para la diagnóstico y seguimiento de las anomalías clonales. Los resultados de un panel FISH ofrece una rápida evaluación de patrones anómalos y su porcentaje dentro de las células de la médula ósea o leucocitos. El análisis cromosómico revelará entonces las anomalías clonales y la evolución clonal. Para las leucemias que requieren tratamiento urgente, como la leucemia promielocítica aguda (APL) causada por la t(15; 17) (q24; q21) con fusiones PML/RARa subyacentes. El resultado de FISH es obligatorio para la administración de ácido retinoico (ATRA). Terapia dirigida contra la proteína de fusión ABL1 / BCR por pequeños inhibidores de la tirosina molécula como imatinib mesilato (Gleevec), dasatinib (Sprycel) y nilotinib (Tasigna) ha aumentado la supervivencia global a 10 años de 20 a 80-90%. Para muchos reordenamientos crípticos indetectables por análisis rutinario de cromosomas, tales como t(12; 21) (p13; q22) con fusiones de genes ETV6 / RUNX1, t (4; 14) (p16.3; q32) con fusiones de genes FGFR3/IGH, deleciones de 12p13 (ETV6), 13q14(RB1), y 17p13 (TP53), las pruebas FISH se consideran ensayos autónomos de diagnóstico. Además el uso complementario de las sondas FISH para definir anomalías cromosómicas ambiguas u ocultas es necesaria para muchos casos. Teniendo en cuenta que algunos tumores hematológicos pueden ser morfológicamente similares y las anomalías no son detectadas por cariotipaje de baja resolución y / o porcentaje de células leucémicas, FISH podría ser una técnica importante de diagnóstico diferencial entre estas enfermedades.<sup>133</sup>

Las pruebas FISH son ampliamente utilizadas en varios tipos de tumores sólidos, por ejemplo, FISH puede definir reordenamientos de genes en el fibrosarcoma congénito con una nueva translocación compleja y validar los marcadores subclónicos en biopsias heterogéneas de melanoma. Además los resultados de FISH pueden usarse para guiar el

tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la terapia dirigida por Herceptin es eficaz contra HER2 sobre-expresado cáncer de mama. También algunos casos de t(15; 17) pueden ser pasados por alto en los estudios de CC (citogenética convencional), y ser sólo detectado por FISH (o RT-PCR). Además, hay también algunas pruebas que FISH puede tener valor predictivo en el diagnóstico en la LMA. Por ejemplo, las deleciones de TP53 identificados por FISH dan una mala respuesta a la quimioterapia. En general, FISH en interfase se correlaciona muy bien con las anomalías detectadas por CC. Hay algunas pruebas de un gran número de estudios prospectivo en una serie de pacientes con LMA con algunos reordenamientos comunes [inv (16), reordenamientos MLL] que se pierden en los estudios de CC pero que son fácilmente identificados por FISH.<sup>125, 133</sup>



**Tabla 16.** Lista de paneles y sondas usados en FISH para los tumores hematopoyéticos y linfoides.<sup>133</sup>

Gene (G-band)	Probe Design	Myeloid leukemia			Lymphocytic leukemia			Lymphoma
		CML	MDS	AML	CLL	B-ALL	T-ALL	
CKS1B (1q21), CDKN2C (1p32)	DCE							
PBX1 (1q23.3), TCF3 (19p13.3)	DCDF					t(1;19)		t(1;19)
ALK (2p23)	DCBAP							ALK
MECOM (3q26)	DCBAP			inv(3)				
BCL6 (3q27)	DCBAP							BCL6
D4Z1 (4cen), D10Z1 (10cen), D17Z1 (17cen)	TCE					+4/10/17		
PDGFRA (4q12)	DCBAP							
FGFR3 (4p16.3), IGH (14q32)	DCDF							
TAS2R1 (5p15.31), EGR1 (5q31)	DCE		5q-/-5					
PDGFRB (5q33)	DCBAP					PDGFRB		
MYB (6q23), D6Z1 (6cen)	DCE							
RELN (7q22), TES (7q31)	DCE		7q-/-7					
TCRB (7q34)	DCBAP						TCRB	
FGFR1 (8p11)	DCBAP							
RUNX1T1 (8q21), RUNX1 (21q22)	DCDF			t(8;21)				
cMYC (8q24)	DCBAP							cMYC
cMYC (8q24), D20S108 (20q12)	DCE		+8/20q-					
PAX5 (9p13.2)	DCBAP					PAX5		
CDKN2A (9p21), D9Z3 (9cen)	DCE					9p-	9p-	
ABL (9q34), BCR (22q11)	DCDF	t(9;22)				t(9;22)	t(9;22)	
CCND1 (11q13), IGH (14q32)	DCDF							t(11;14)
ATM (11q22), TP53 (17p13)	DCE				11q-/-17p-			
KMT2A (11q23)	DCBAP			KMT2A		KMT2A	KMT2A	
ETV6 (12p13), RUNX1 (21q22)	DCDF					t(12;21)		
DLEU1 (13q14), D13S25 (13q34)	DCE							
DLEU1 (13q14), D13S25 (13q34), D12Z3 (12cen)	TCE				13q-/+12			
TCRA/D (14q11)	DCE						TCRA	
IGH (14q32)	DCBAP				IGH			IGH
IGH (14q32), BCL2 (18q21)	DCDF							t(14;18)
SNRPN (15q11.2), TP53 (17p13)	DCE							
PML (15q24), RARA (17q21)	DCDF			t(15;17)				

FISH utiliza sondas para pruebas específicas de translocaciones recurrentes en diferentes tumores sólidos que podrían guiar terapia dirigida. Las pruebas de FISH también se utilizan para evaluar aneuploidía en los espermatozoides antes y después de la quimioterapia en pacientes con cáncer testicular y linfoma de Hodgkin; se recomienda que el asesoramiento genético aumente sobre del riesgo de reproducción debido a la quimioterapia en los pacientes con cáncer.<sup>133</sup>

#### 4.9.2 CISH

Desde los años 1990 se vienen realizando ISH con métodos de detección cromogénica y la primera publicación aparece en el año 2000 (oncogene HER-2). En los 3 últimos años, al método CISH se le prestó más atención, debido a que puede evaluar simultáneamente la amplificación génica/delección, la aneuploidía y translocación cromosómica, con la morfología del tejido, utilizando un microscopio común. Por lo tanto, una amplia sección del tejido puede ser explorada rápidamente debido al contrateñido con hematoxilina y el detalle morfológico es fácilmente visible utilizando objetivos 10 x, 20 x o 40 x. Distintos estudios han demostrado que el CISH es un método seguro, económico y práctico para evaluar el status del gene HER-2 en muestras archivadas de tumor de mama. El CISH, es de utilidad para el diagnóstico oncológico y sobre todo en el pronóstico y tratamiento del paciente. La hibridación cromogénica in situ (CISH) es un método alternativo de hibridación in situ para analizar la amplificación de un gen. CISH permite la detección de amplificación de genes y examinación histológica simultáneamente por microscopía de campo brillante. Además, varios estudios han demostrado buena correlación entre los resultados de CISH y FISH. La metodología puede ser utilizada para evaluar amplificación de genes, delección de genes, translocaciones cromosómicas y número de cromosomas. Es muy parecido a la técnica FISH, concuerda 86%-96% con el FISH, pero en este caso se usa una sonda de color visible y no fluorescente, como es el caso del FISH.<sup>140,138</sup>

La hibridización cromogénica in situ se realiza sobre cortes tisulares (4 – 5 um de espesor) fijados en formalina e infiltrados en parafina (FFPE). Estos cortes tisulares se desparafinan en xileno, alcohol, agua destilada y luego se calientan a 98° C durante 15´ con solución de pretratamiento para calor. A continuación se realiza la digestión enzimática a temperatura ambiente, se deshidratan en una serie graduada de alcoholes, se secan al aire y se le agrega la sonda específica al tejido en estudio, se cubre con cubreobjeto y se desnaturaliza a 94° C . La hibridización se realiza durante toda la noche a 37° C. Se retira el cubreobjetos y se trata el preparado con solución tampón SSC. Luego se realiza la inmunodetección con

CAS-block, HRP-estreptovidina, diaminobencidina (DAB) y contrateñido con hematoxilina. Se examinan los resultados de la hibridación utilizando un microscopio de campo luminoso con objetivo 40 x.<sup>140</sup>

## **5.5 Diagnóstico Molecular de las Leucemias**

La genética estudia la herencia y todo sobre ella. La genética ha tenido progresos sustanciales en los últimos años. La serie de herramientas moleculares descubiertas han hecho posible conocer de manera precisa las causas de una gran variedad de enfermedades, especialmente de origen hereditario. El comienzo de la genética se remonta a 1865 cuando las leyes de Mendel se publican. En estas leyes, se establecen las reglas elementales sobre la transmisión de rasgos de generación en generación. En 1900, comienzan a realizar los primeros estudios en *Drosophila*. En 1909, Wilhelm Johannsen acuñó el término gen y en 1905 William Bateson la genética. En 1956, Tjio identifica el número correcto de cromosomas en la especie humana, siendo 46 en lugar de 48 como en la propuesta inicial. En 1959, los franceses, Jérôme Lejeune, describió la causa de la primera enfermedad cromosómica, Síndrome de Down. En la década de 1940, Rosalind Franklin describe las formas de DNA A y B y recordando los datos de Franklin y las bases de Chargaff, Watson y Crick describen en 1953 la estructura de doble hélice de DNA. Pero no es hasta los años 80 que Kary Mullis desarrolla la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica para la amplificación de secuencias de DNA específicas; esta herramienta revoluciona la metodología molecular. Para 1986, se describe el primer gen que causa una enfermedad humana, la enfermedad granulomatosa crónica, y en los primeros años de la década de los 90s, comenzó el Proyecto Genoma Humano, y en 2003 la secuencia del DNA humano se completa.<sup>119</sup>

### **5.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El desarrollo de la tecnología molecular ha permitido un avance en la medicina para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de algunas enfermedades. Uno de los más importantes es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante PCR podemos: detectar mutaciones de DNA para el diagnóstico de las enfermedades hereditarias y los portadores de estas, diagnóstico prenatal de amniocentesis y diagnóstico genético de preimplantación, genotipo de agentes infecciosos como el VIH o hepatitis, o personalizar terapias en pacientes con ciertos tipos de cáncer, entre otras cosas. Derivado de la PCR tenemos la MLPA (Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) que tiene

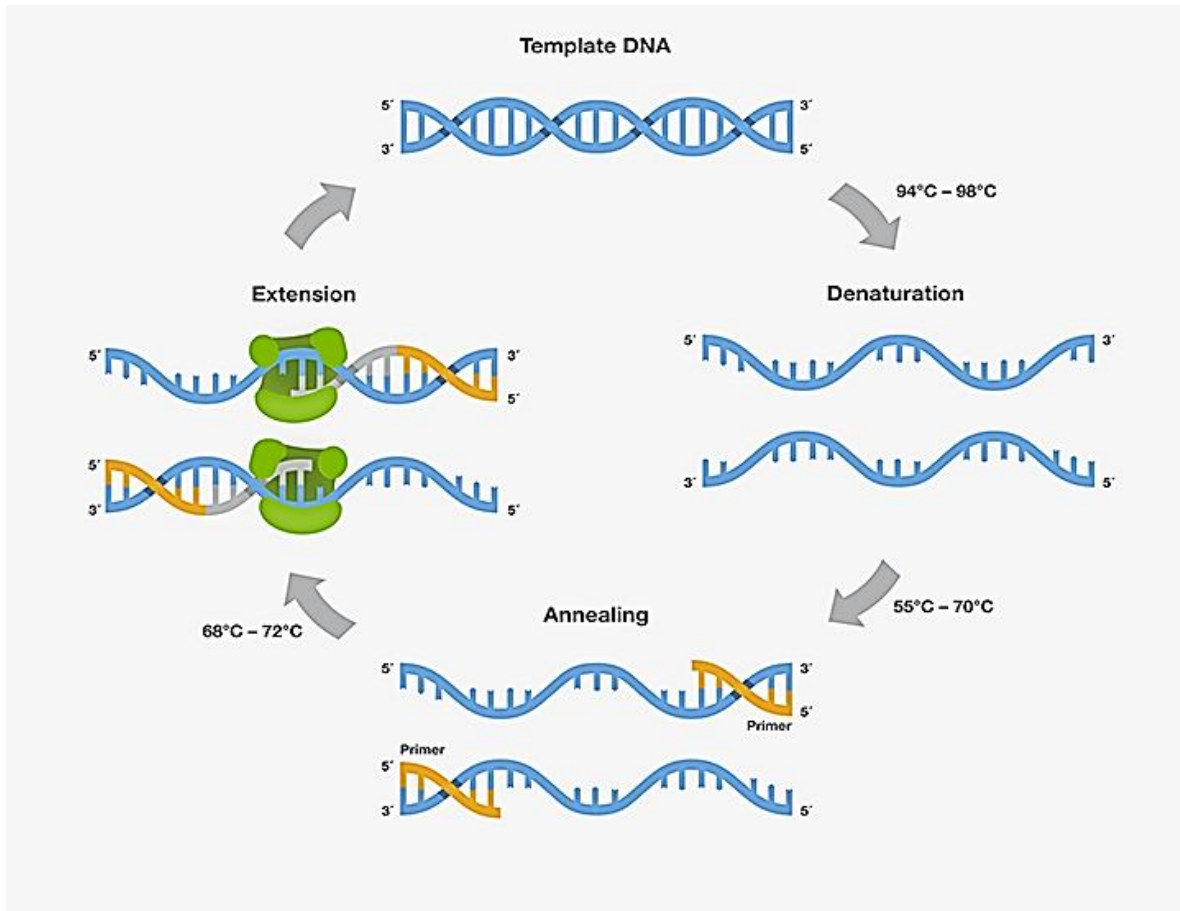
una diversidad de aplicaciones como la identificación de mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido, estudio de la metilación del DNA, cuantificación relativa de ARNm, caracterización de duplicaciones y deleciones de genes, detección de predisposición genética en cáncer humano tal como BRCA1, BRCA2, hMLH1 y hMSH2. La ventaja de esta técnica es su bajo costo. Recientemente, la secuenciación de próxima generación (NGS: Next Generation Sequencing) se utiliza para el diagnóstico molecular en la detección de patógenos, polimorfismos, diagnóstico de cáncer, etc. En general, a través de NGS, el DNA puede secuenciarse en horas, superando los métodos tradicionales que tardan días (Sanger). NGS se utiliza para el diagnóstico de enfermedades genéticas, enfermedades infecciosas y cáncer. Una dificultad es la gran cantidad de información generada que tiene que ser analizada a través de un software especializado, además del costo que representa. Estas son las técnicas de vanguardia que ofrecen diagnóstico molecular a un gran número de pacientes con diferentes enfermedades hereditarias que además permiten establecer el diagnóstico prenatal dentro de unas pocas semanas del embarazo. La metodología molecular avanza y se espera que en pocos años podamos identificar correctamente las poblaciones de riesgo, especialmente para las enfermedades que representan un problema como diabetes, obesidad, hipertensión y cáncer.<sup>119</sup>

Durante varias décadas la detección y estudio de anomalías citogenéticas se ha realizado mediante el análisis o mapeo cromosómico. La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato DNA genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos DNA complementario (DNAc) proveniente del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés).<sup>119, 120</sup>

Actualmente técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido identificar más de 50 translocaciones cromosómicas, muchas de las cuales han demostrado ser específicas para distintos subtipos de leucemias. Una de las técnicas más usadas, es la PCR con transcripción reversa (RT-PCR), mediante la cual a partir de secuencias del RNA mensajero es posible detectar transcriptos de fusión, por ejemplo, del gen BCR-ABL e identificar diferentes reordenamientos según el punto de

ruptura dentro del gen BCR con una mayor sensibilidad y especificidad que con el estudio citogenético. De este modo, el uso de la técnica de RT-PCR entrega mayor información para el diagnóstico y pronóstico de las leucemias, como también es de gran utilidad en la detección de la enfermedad residual mínima (ERM) durante la remisión clínica.<sup>120</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), es una variante de la PCR, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) la cual, como se mencionó antes, fue descrita por primera vez en 1983 por Kary B. Mullis. Su objetivo y función es la de obtener mediante amplificación in vitro cantidades masivas de DNA incluso a partir de muestras muy pequeñas. Es una técnica que se basa en la replicación enzimática del DNA, que se lleva a cabo por la DNA polimerasa, en este caso durante un ciclo térmico. Los componentes de un reacción de PCR son: el templado o molde de DNA, un par de oligonucleótidos que se utilizan como primers, la taq DNA polimerasa, desoxinucleotidos (dNTPs), cationes divalentes y el buffer en donde se llevara a cabo la reacción. La PCR se desarrolla en tres pasos, el primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de DNA que se quiere amplificar. Cada una de estas cadenas actúa como molde para fabricar sus complementarias. Se baja la temperatura hasta la temperatura de alineamiento para conseguir que cada primer se una de forma específica a su región complementaria dentro de la cadena de DNA. El último paso consiste en la generación de la cadena de DNA complementaria por acción de la DNA polimerasa, a partir de la extensión del extremo 3' de cada primer.<sup>106</sup>



**Figura 23.** Ilustración de los principales pasos en PCR. Desnaturalización, alineación, extensión - para amplificar la secuencia objetivo de una plantilla de DNA.<sup>113</sup>

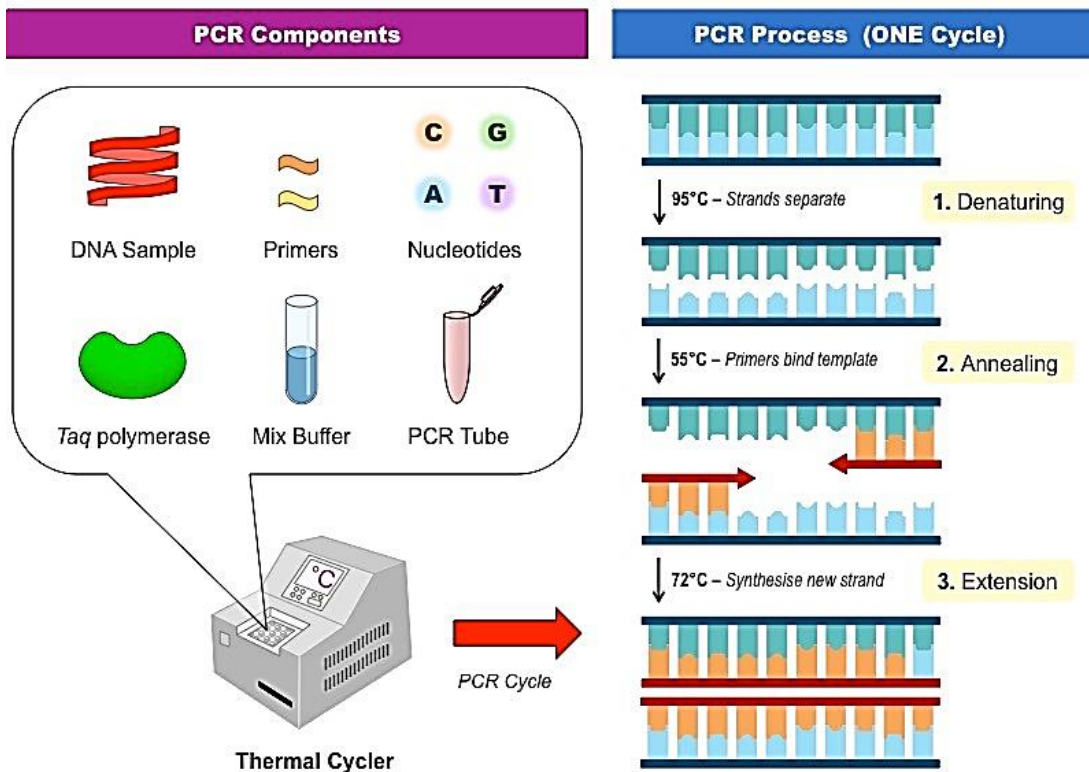
Es una técnica de laboratorio comúnmente usada en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de DNA proceso llamado "amplificación". En la RT-PCR, se retrotranscribe una hebra de RNA en DNA complementario (DNAc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa o transcriptasa reversa, y el resultado se amplifica mediante una PCR tradicional. La amplificación exponencial mediante PCR en transcripción reversa supone una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de RNA muy bajo. Los principales usos de la RT-PCR están relacionados con la cuantificación de la expresión génica, mediante la combinación de esta técnica con el análisis de Northern blot, por ejemplo. Una de las características más importantes es que en el proceso de RT-PCR, el ADNc generado ya no lleva los intrones que sí tendría el ADN original. De este modo, al expresar el ADNc producto de la RT-PCR, se generará un ARNm formado exclusivamente por exones, que son los fragmentos codificantes.<sup>5</sup>

El diagnóstico de las leucemias se basa generalmente en repetidos conteos sanguíneos completos y un examen de médula ósea tras los síntomas observados. Una vez diagnosticada la enfermedad, una química sanguínea puede utilizarse para determinar el grado de daño al hígado y a los riñones o los efectos de la quimioterapia en el paciente. Para observar los posibles daños visibles debidos a la leucemia, se pueden utilizar radiografías (en huesos), resonancia magnética (cerebro) o ultrasonidos (riñón, bazo e hígado). Además se deben realizar estudios de PCR para los marcadores moleculares más conocidos en las Leucemias, tales como BCR/ABL rompimiento menor en leucemia linfoblástica aguda (LAL), BCR/ABL rompimiento mayor en leucemia mieloide crónica (LMC) y PML/RAR en leucemia mieloide aguda (LAM), los cuales fortalecen el diagnóstico y pronóstico para la terapia y el seguimiento de estos padecimientos.<sup>7</sup>

Un marcador genético o marcador molecular es un segmento de DNA con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del DNA sin función conocida. Dado que los segmentos del DNA que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce. Se ha demostrado que los genes de fusión BCR/ABL mayor y menor, así como PML/RAR, están asociados a un mal pronóstico en las leucemias.<sup>105</sup>

En todos los organismos el contenido del DNA de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Exceptuando a los genes constitutivos (genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para su funcionamiento general) todos los demás genes se expresan o no dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. Por ejemplo, genes que codifican proteínas responsables del transporte axonal se expresan en neuronas pero no en linfocitos en donde se expresan genes responsables de la respuesta inmune. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de estos. El gen en sí mismo es típicamente un largo tramo de ADN y no realiza un papel activo. Sin embargo el mRNA es encargado de la transferencia de este código genético, éste determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la

síntesis de dicha proteína. Existen alteraciones moleculares específicas en las leucemias, que se detectan por medio de RT-PCR a nivel de expresión génica. Es necesario recurrir a la detección de los productos de transcripción provenientes del punto de fusión de los dos brazos cromosómicos y copiar primero el mRNA en cDNA antes de amplificarlo. La caracterización molecular de las aberraciones cromosómicas que ocurren con frecuencia en los pacientes con leucemias permite el diagnóstico preciso de los subtipos de leucemias, la medición de la respuesta terapéutica y la determinación de la enfermedad residual mínima.<sup>6, 49, 39</sup>

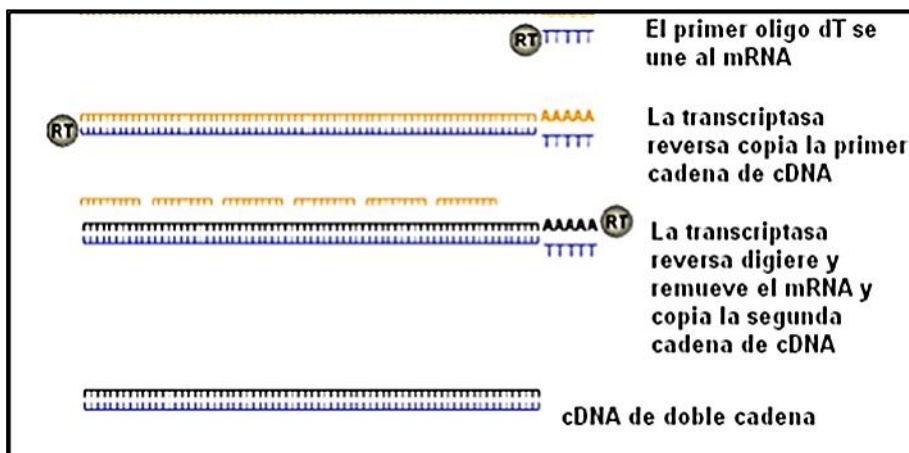


**Figura 24.** Ilustración de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.<sup>116</sup>

Un DNA complementario (cDNA) puede ser sintetizado in vitro a partir de mRNA o de RNA total utilizando la enzima transcriptasa reversa (RT), la cual es una DNA polimerasa dependiente de RNA, que utiliza como partidor un oligonucleotido poly(dT). Luego de desnaturalizar el RNA, mediante calor, el oligonucleotido poly(dT) es alineado con el extremo poly(dA) de éste y actúa como partidor para la síntesis 5`-3` de una molécula complementaria al RNA, la cual es un cDNA de hebra simple. El cDNA obtenido corresponde a la totalidad de la población de RNA presente al inicio de la síntesis. El cDNA se amplifica mediante una PCR tradicional.<sup>5</sup>



Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR. Los pasos de la RT-PCR son: (1) Transcripción reversa: Unión del primer a la secuencia de RNA objetivo. (2) Transcripción reversa: La polimerasa rTth cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios. (3) Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del cDNA complementario al RNA. (4) PCR. El mRNA es copiado a cDNA por la transcriptasa reversa usando un primer dT (los primers al azar se pueden también utilizar).<sup>64</sup>



**Figura 25.** Conversión de mRNA a cDNA por acción de la transcriptasa reversa.<sup>121</sup>

Posterior a la síntesis de cDNA se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. Todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que

favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los primers que definen los extremos (primer forward y primer reverse) de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico.<sup>4</sup>

El gen de la LMC es el resultado de la fusión de partes de 2 genes normales: el ABL en el cromosoma 9 y el BCR en el cromosoma 22. Ambos genes son expresados en los tejidos normales. En la translocación que da lugar al gen de fusión, la ruptura ocurre en alguna parte del ABL en sentido contrario al exon 2 y simultáneamente en el punto de ruptura mayor del BCR. Como resultado, la porción 5' del BCR y la porción 3' del ABL están yuxtapuestas en un cromosoma 22 acortado (el derivado 22q- o cromosoma Ph). El reciente desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido reconocer que la translocación entre los cromosomas 22 y 9 es recíproca, ya que el cromosoma 9 transfiere a su vez una pequeña porción de sus brazos largos al cromosoma 22. Este material constituye el protooncogen ABL, que al unirse a la región BCR (breakpoint cluster region) del cromosoma 22, da origen al oncogen BCR-ABL. Dependiendo del sitio de ruptura en el gen BCR, se pueden formar 3 tipos de BCR-ABL; el gen híbrido predominante en la LMC clásica es derivado de la disrupción en el punto de ruptura mayor (M-BCR). El producto final de este gen es una proteína de fusión citoplasmática de 210 kd, la cual es responsable de la mayoría de las anormalidades fenotípicas de la fase crónica; puede ser b3a2, en el 55 % de los casos ó b2a2 en el 40 %. Esta proteína es la que se observa en más del 95 % de los pacientes con LMC y en el 20 % de los pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA). Mucho menos frecuente, la LMC puede resultar del gen híbrido derivado del punto de ruptura menor (m BCR) transcripciones (e1a2); el resultado es la proteína de 190kd que se observa en el 10 % de las LLA del adulto y en el 5 % de las LLA pediátricas.<sup>3, 62, 64</sup>

En la proteína híbrida BCR-ABL se mantienen los dominios que corresponden a los fragmentos de las proteínas BCR y ABL que los conforman. En la mitad ABL se encuentra

la región con actividad tirosincinasa que contiene un sitio de auto fosforilación y en la BCR existe una tirosina en la posición. A diferencia de lo que ocurre en la proteína ABL normal, en la BCR ABL la función se ejerce de una forma constantemente descontrolada. La producción continua de esta enzima induce múltiples interacciones proteicas que intervienen en diferentes vías de transmisión de señales intracelulares, cuyas activaciones conducen a la transformación maligna celular, le confieren a las células de la LMC ventajas de crecimiento e interfieren con los procesos celulares básicos como el control de la proliferación, la adherencia y la apoptosis. La enzima BCR ABL estimula la transmisión de señales mediante la liberación de ATP de un grupo fosfato que se une con las diferentes proteínas que le sirven de sustrato. Debido al proceso de autofosforilación, existe un gran aumento de fosfotirosina en la proteína BCR ABL, que crea sitios de unión para otras proteínas. La llegada de un ligando a la membrana citoplasmática permite, al nivel de esta, la creación de un dímero que a su vez transmite señales hacia el interior del citoplasma, y como consecuencia hay una cascada de señales. La activación de ese sistema de señales permite llevar el mensaje a los factores de transcripción dentro del núcleo, los que a su vez lo llevan a la región promotora del gen y determinan la síntesis del RNA con la información de la proteína a sintetizar, según la señal recibida. El gen híbrido codifica una proteína con actividad constitutiva, es decir, que tiene la característica de que siempre está activada y no necesita de la presencia del ligando para la formación de dímeros y la transmisión de señales. De modo que esto es lo que ocurre en el caso del BCR-ABL: la formación de dímeros y la fosforilación de sustratos ocurre constantemente y esto a su vez, activa los sistemas de señales que llegan al núcleo y activan los sistemas de transcripción.<sup>64</sup>

Una de las más notables diferencias entre la proteína ABL normal y el BCR-ABL está dada por sus contrastantes localizaciones en la célula. La proteína ABL aparece tanto en el núcleo como en el citoplasma y puede ir de un lado a otro entre esos 2 compartimentos bajo la influencia de las señales de localización nuclear y los dominios de señales de salida del núcleo, mientras que el BCR-ABL es exclusivamente citoplasmático. El ABL nuclear es esencialmente una proteína proapoptótica, que tiene una función clave en la respuesta celular al estrés genotóxico. El BCR-ABL, en contraste, es intensamente antiapoptótico, a pesar de que retiene la zona de localización del ABL nuclear y las secuencias de salida del núcleo están incapacitadas para entrar al mismo. La principal razón por la cual el BCR-ABL es retenido en el citoplasma es su actividad tirosincinasa activada constitutivamente. Se cree que la LMC se desarrolla cuando una única célula progenitora hematopoyética adquiere el cromosoma Ph que lleva consigo el gen de fusión BCR-ABL, el cual confiere

una ventaja proliferativa sobre los elementos hematopoyéticos normales. El fundamento de esta ventaja proliferativa no está bien definido, pero puede estar relacionada en parte con la expresión constitutiva de los progenitores leucémicos y de los factores estimulantes de crecimiento, fundamentalmente la interleucina 3 y el factor estimulante de colonias granulocíticas. Numerosos sustratos han sido encontrados unidos al BCR-ABL y que son fosforilados por él.<sup>64, 2, 30</sup>

Durante la remisión hematológica hay una cantidad de células leucémicas que no son detectables por microscopía óptica. Su interpretación define el término de enfermedad mínima residual. En el momento del diagnóstico, los pacientes con LMC en fase crónica tienen un estimado mínimo de  $1 \times 10^{12}$  células leucémicas. En remisión citogenética completa este número desciende a  $1 \times 10^{10}$  células leucémicas o menos. Si una PCR extraordinariamente sensitiva puede detectar una simple célula leucémica en 20 mL de una muestra de sangre de un paciente con un conteo de leucocitos normal, el muestreo sería aún el límite de la detección de la carga residual aproximadamente de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células leucémicas. La transcripción del BCR-ABL es la clave de la monitorización molecular, porque el crecimiento de las células leucémicas es usualmente dependiente de la expresión del BCR-ABL. La sensibilidad de cualquier método de PCR está limitado por el número de células analizadas. Normalmente solo es evaluada una porción del DNA complementario, pero el análisis de múltiples porciones de DNA en reacciones replicadas incrementa la sensibilidad. Actualmente el método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es el más sensible para la detección de bajos números de transcritos del BCR ABL. En la práctica, estos resultados pueden ser difíciles de interpretar porque aún si la prueba es negativa, puede haber todavía un millón o más de células residuales Ph positivas en el organismo. En otros casos, la prueba puede ser persistentemente positiva a un bajo nivel por muchos años. El método cualitativo es útil para determinar el punto de ruptura del BCR-ABL y para el monitoreo de la enfermedad mínima residual, sobre todo cuando los otros métodos indican la ausencia del BCR-ABL. Este método tiene el inconveniente de que aunque detecta niveles muy bajos de transcritos de BCR ABL, no detecta otras translocaciones que pueden aparecer en fases avanzadas de la enfermedad y además, no puede cuantificar los niveles de transcritos, lo que constituye una limitación para la evaluación de la respuesta una vez lograda la respuesta citogenética completa. Tiene una sensibilidad de  $1:10^5$ - $1:10^6$  y es muy útil después de lograda la remisión molecular. Es el método más sensible para detectar un pequeño número de transcritos BCRABL en un paciente después de un trasplante aparentemente exitoso. El

método cuantitativo en tiempo real tiene una sensibilidad de una célula BCR-ABL positiva en 104-105 células, y es muy importante para el seguimiento evolutivo, ya que permite trazar estrategias de tratamiento por la posibilidad de realizar un monitoreo cuantitativo. Este método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo en tiempo real, se ha convertido en el método estándar del monitoreo molecular de la enfermedad mínima residual en las hemopatías malignas, y específicamente en la LMC. Los estudios recientes realizados después de la introducción del imatinib han demostrado que es necesaria la monitorización molecular por estudios cuantitativos una vez alcanzada la remisión citogenética completa, para poder estratificar la respuesta al tratamiento y detectar una pérdida temprana de la respuesta lograda. Los métodos cuantitativos han traído discusiones sobre cómo establecer la relación entre la clínica y el monitoreo molecular.<sup>3, 64,</sup>  
62

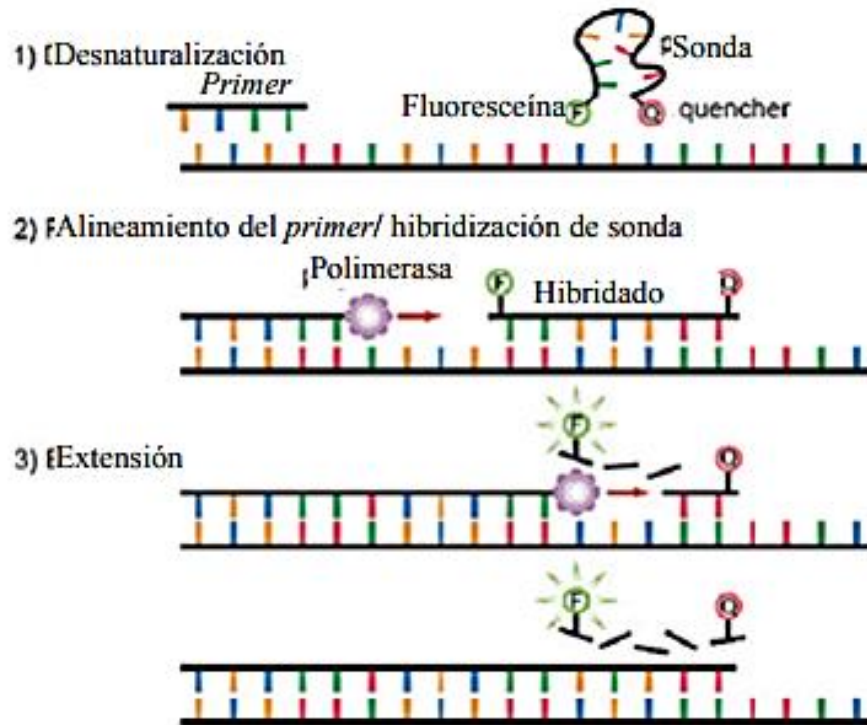
A pesar de la utilidad de las técnicas citogenéticas convencionales, estas tiene limitaciones, por lo que en la actualidad se utilizan métodos más complejos como el de hibridación in situ por fluorescencia (FISH), método capaz de detectar las alteraciones cromosómicas al nivel del DNA, aún cuando las células estén en interfase, y que es parte de lo que hoy se conoce como citogenética molecular. El método del FISH ha adquirido gran importancia en el monitoreo molecular por las ventajas que ofrece. Tiene la ventaja de detectar el BCR-ABL en el 95 % de los casos de LMC y aproximadamente en la mitad de los casos que se concluyen como Ph negativos mediante la citogenética convencional. Puede detectar una célula leucémica entre 200 a 500 células normales, lo cual lo hace una herramienta más sensible que los métodos citogenéticos convencionales para evaluar la enfermedad mínima residual. Tiene la desventaja de no identificar otras translocaciones que pueden aparecer en fases avanzadas de la enfermedad. Los avances en el campo de la biología molecular y la citogenética de la LMC, así como el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos para su correcta evaluación, permiten un conocimiento más profundo de la enfermedad y la posibilidad de proporcionar un manejo más adecuado al paciente en cualquier momento de su evolución. Asimismo, constituyen un modelo para profundizar en el conocimiento de estas alteraciones y para el desarrollo de métodos de diagnóstico de estas en otros tipos de leucemia y enfermedades malignas no hematológicas.<sup>64</sup>

Por otro lado actualmente las guías clínicas para el manejo de pacientes con leucemia mieloide crónica incluyen el monitoreo molecular de BCR-ABL1 por PCR cuantitativa en tiempo real; esta metodología permite definir la respuesta molecular. La PCR cuantitativa

en tiempo real (qRT-PCR) es una variante de la PCR que tiene el objetivo de medir, con una sensibilidad superior (hasta 10 000 veces más sensible), los niveles de transcripto quimérico BCR-ABL1 en leucocitos de sangre periférica, de aquellos pacientes que alcanzaban la RCC. Es interesante destacar que tanto la guía Americana para el cáncer (NCCN, National Comprehensive Cancer Network), como la Europea (ELN, European Leukemia Net), consideran al monitoreo molecular por qRT-PCR la mejor opción para definir respuesta terapéutica y el seguimiento del paciente. La NCCN recomienda hacerlo al diagnóstico y luego cada 3 meses (o cada 6 una vez alcanzada la RCC) durante 3 años. Lo importante es entender que un monitoreo molecular frecuente posibilita al médico: 1) determinar con precisión y rapidez qué nivel de respuesta alcanzó su paciente y si puede mantenerla en el tiempo; esto permite identificar rápidamente los casos con menor probabilidad de una respuesta óptima; 2) detectar tempranamente aumentos en los niveles de BCR-ABL1, posibilitando tomar rápidamente decisiones que pueden tener impacto en la evolución a largo plazo. Hay evidencias que indican que un aumento significativo en los niveles de BCR-ABL1 (>1 Log) durante el tratamiento anticipa con cierta precisión la posible recaída. 3) La disponibilidad de estudios moleculares seriados y a intervalos regulares permite conocer que, a pesar de la remisión molecular alcanzada, la batalla contra el clon leucémico está todavía en curso, y que cualquier reducción prematura en la “intensidad” del tratamiento podría favorecer el crecimiento del clon leucémico, con el consecuente aumento de los niveles de BCR-ABL1. A pesar de que la suspensión temporaria del tratamiento a veces responde a una decisión clínica (p.ej. toxicidad de la dosis utilizada) muchas veces es el resultado de una baja adherencia del paciente. Por lo tanto, realizar tests regularmente facilita identificar los períodos de baja adherencia. 4) El incremento en los niveles del BCR-ABL1 podría también representar una señal de selección de algún clon mutado que confiera resistencia a los inhibidores; sin embargo, cabe aclarar que las mutaciones explican en promedio solo un 50% de los casos resistentes, con un porcentaje muy variable (entre 19 y 91%), que depende del método de detección, la población en estudio y el estadio de la enfermedad. Por lo tanto otras causas de resistencia, tanto dependientes como independientes del BCR-ABL1 pueden estar dificultando una buena respuesta al tratamiento.<sup>121</sup>

Como herramienta de investigación, la principal aplicación de la RT-PCR es la rápida y precisa valoración de cambios en la expresión de genes como resultado de la fisiología, la fisiopatología o la evolución de una patología. En el campo del diagnóstico clínico de tipo molecular, la RT-PCR puede ser usada para medir cargas virales o bacterianas, o en

evaluación del estado de enfermedades como el cáncer. La principal meta del RT-PCR es distinguir y cuantificar de manera específica una secuencia de ácido nucleico en una muestra incluso cuando ésta se presenta en pequeñas cantidades. Durante la amplificación, la velocidad en que se llega a un nivel determinado de fluorescencia (umbral) correlaciona con la cantidad de DNA que tenemos al inicio.<sup>130</sup>



**Figura 26.** Representación esquemática de un ensayo de RT-PCR usando el método de Taqman.<sup>130</sup>

La qRT-PCR es una metodología particularmente poderosa pero al mismo tiempo muy compleja; involucra muchos pasos y su éxito depende fundamentalmente de la cantidad y calidad del RNA total que se obtiene a partir de la muestra biológica. Una baja cantidad de RNA total reducirá la sensibilidad del ensayo, perjudicando la posibilidad de detectar una respuesta molecular profunda, mientras que una baja calidad afectará además la comparabilidad de los resultados con estudios anteriores, generando posiblemente toma de conductas terapéuticas sub-óptimas. La qPCR se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. El

termociclador tiene la capacidad de calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas de la DNA polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten, llamados ciclos, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas: la primero, en torno a los 95 °C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; el segundo, a una temperatura entre los 50-60 °C, que permite el alineamiento de los cebadores al DNA molde; el tercero, va de 68-72 °C, y facilita la polimerización por parte de la DNA polimerasa. Algunos termocicladores añaden a cada ciclo unos segundos a otra temperatura, por ejemplo 80 °C, a fin de reducir el ruido por la presencia de dímeros de cebadores cuando se emplea un colorante inespecífico. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, como: la enzima usada para la síntesis de DNA, la concentración de iones divalentes y dNTPs en la reacción y la temperatura de unión de los cebadores. La qRT-PCR tiene ventajas significativas: (i) utilizan moléculas fluorescentes para monitorear los productos de amplificación durante cada ciclo de la PCR y la combinación de pasos de amplificación y detección de DNA en un ensayo homogéneo elimina el requisito para el procesamiento posterior a la PCR; (ii) hay poca variación entre ensayos, lo que ayuda a generar resultados reproducibles; y (iii) la qRT-PCR con fluorescencia tiene la capacidad cuantitativa, lo que lo diferencia de un ensayo cualitativo convencional de RT-PCR.<sup>121, 2, 126</sup>

Mediante la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de DNA de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de DNA que existe si la reacción ocurre con máxima eficiencia. La realidad es que las reacciones de PCR alcanzan un plateau o meseta debido al agotamiento de los reactantes luego de numerosos ciclos. Además, la autohibridación de los productos cada vez más numerosos contribuye al efecto de meseta, por lo que se hace imposible calcular la cantidad de DNA de partida midiendo la cantidad de producto final. Es esta característica de la PCR convencional la que impone la necesidad del PCR en tiempo real. Dado que la reacción de PCR en sus inicios amplifica el DNA de manera eficiente, y existe una correlación entre el DNA de partida y el DNA formado durante la fase exponencial, es posible cuantificar la cantidad de DNA de partida. Otra de las ventajas importantes de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación de RNA. Esto es posible gracias al uso de las transcriptasas reversas, enzimas que generan DNA complementario (cDNA) a partir de un templado de RNA. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de cDNA generado por reversotranscripción es proporcional al número de moléculas de RNA presente en una muestra dada. Entonces este DNAC puede



ser el templado para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes. Esta técnica se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de RNA mensajero. Todo esto demuestra que la técnica de PCR en tiempo real permite cuantificar con alta precisión tanto los niveles de DNA como los de RNA.<sup>130</sup>

## 6. Conclusiones

Este trabajo presenta información actualizada sobre las técnicas existentes de diagnóstico citogenético y molecular en las Leucemias, y muestra datos sobre las alteraciones cromosómicas observadas con más frecuencia en pacientes con Leucemias y los hallazgos más recientes.

Se confirmó que las técnicas de citogenética y biología molecular permiten el diagnóstico preciso del tipo de leucemia y generan datos importantes para clasificar los subtipos y el probable resultado clínico que tendrá el paciente, además la detección de genes específicamente involucrados en la leucemogénesis podrían considerarse como biomarcadores pronósticos en la clasificación de la enfermedad generando un nuevo protocolo terapéutico en la leucemia.

Se realizó la recopilación de la información más actualizada sobre los métodos de diagnóstico de las Leucemias y esto permitió observar cómo ha avanzado el campo de la biología molecular y como es que se han relacionado las técnicas de diagnóstico para brindar mejores resultados en los pacientes, sin dejar atrás los métodos de diagnóstico clásico, ya que arrojan datos iniciales que dan la pauta para los demás, como lo es, por ejemplo, una biometría hemática, pero las técnicas más actualizadas ofrecen esperanza para obtener mejores resultados en los pacientes. Además abre la brecha al estudio de posibles paneles de marcadores moleculares preestablecidos para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento en pacientes con Leucemia.

No hubo hallazgos sobre técnicas de diagnóstico emergentes para el diagnóstico de la Leucemia sin embargo se muestra que las técnicas ya existentes generan resultados confiables y precisos que fortalecen el diagnóstico.

## 7. Referencias

1. Arribas J, Vallina E. (2005). *Hematología clínica*. Temas de Patología médica. Universidad de Oviedo.
2. Cerón, R. (2016). *Detección y análisis de marcadores moleculares, como fortalecimiento en el diagnóstico de Leucemias Agudas y Leucemia Mieloide Crónica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Cerón R, Martínez A, Ramos C, et. Al. (2015). *Detection and Analysis of tumour biomarkers to strengthen the diagnosis of acute and chronic leukemias*. Rev Med Hospital General de México
4. Ruíz, G. (2009). *Fundamentos de Hematología*. (4 ed.) Argentina: Medica Panamericana.
5. Olarte I, Ramos CO, Miranda E, et. Al. (2015). *Frequency of the minor BCR-ABL (e1;a2) transcript oncogene in a Mexican population with adult acute lymphoblastic leukaemia*. Rev Med Hospital General de México.
6. Guy, B. (2001). *Hematologic Malignancies. Methods and Techniques*. España: Humana Press.
7. Ruíz, G. (1998). *Actualización en Leucemias*. México: Medica Panamericana.
8. Settin M, Al Haggat T, Al Dosoky R, et. Al. (2006). *Prognostic Cytogenetic Markers in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Original Article*. Genetic Unit, Hematology-Oncology Unit, Mansoura University Children's Hospital Mansoura.
9. Rodak, B. (2005). *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas*. (2 ed.) Buenos Aires: Medica Panamericana.
10. Gotlib, J. (2015). *CME Information World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2015 update on diagnosis, risk stratification and management*. Wiley Periodicals, Inc.
11. Copelan, E., Grumwald, M., Druhan, L., Avalos, B. (2015). *Use of molecular markers to determine postremission treatment in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics*. Review. Levine Cancer Institute, Carolinas Healthcare System, University of North Carolina School of Medicine, Charlotte, USA.
12. Hande, P. (2017). *Review. Taking Bad Turn: Compromised DNA damage response in Leukemia*. Cells: Institute for Molecular Biology and Medicine. Université Libre de Bruxelles.
13. Medinger, M., Lengerke, C. and Passweg, J. (2016) *Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in acute myeloid Leukemia*. Cancer Genomics and Proteomics. Divisions of Hematology and Internal Medicine, Department of Medicine, University Hospital Basel, Basel Switzerland.
14. Moorman, A. (2016). *New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Review. Hematológica Vol. 101 (4): 407-416. Leukemia Research Cytogenetic Group, Northern Institute for Cancer Research, New Castle University.

15. Plass, C., Byrd, J., Raval, A., Tanner, S. and De la Chapelle, A. (2007). *Molecular profiling of Chronic lymphocytic leukemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes*. British Journal of Haematology 139, 744-752.
16. Popescu, N. and Zimonjic, D. (1997). *Molecular Cytogenetic characterization of Cancer cell alterations. New Genetic Techniques in Cancer Analysis*. Elsevier 93:10-21.
17. Hack, H., Astanina, K. and Wieser, R. (2017). *Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia*. Journal of Hematology and Oncology.
18. Tonnies, H. (2002). *Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics*. Trends in molecular medicine. Vol.8 No. 6
19. Brian A, and Greenberg, P. (2015). *MDS prognostic scoring systems-past, present and future*. Best practice and research clinical Haematology. Elsevier.
20. Falini, B. and Martelli, M. (2015). *Impact of Genomics in the clinical management of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Best practice and research clinical Haematology. Elsevier.
21. Delgado, J., Villamor, N., López, A. y Campo, E. (2016) *Genetic Evolution in chronic lymphocytic leukaemia*. Best practice and research clinical Haematology. Elsevier.
22. Grimwade, D. and Freeman, S. (2017). *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"*. Review article. London School of Medicine. United Kingdom.
23. Teixeira, M. (2002) *Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer*. European Journal of Cancer 28. Department of Genetics Portuguese Oncology Institute. 1580-1584.
24. Thomas S.K. (2017) *Cancer Cytogenetics. Methods and Protocols*. Shatin, Hong Kong, China: Human Press.
25. Thomas S. K. (2014) *Cancer Cytogenetics: Methodology Revisited: Review Article*. University of Hong Kong, Hong Kong. Diagnostic Genetics Anals of Laboratory Medicine. 34: 413-425.
26. Buga, C., Gluck, A. and Arion, C. (2014) *Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children*. Jorunal of medicine and life. Vol. 7. 291-295.
27. Granada, I. (2007). *Citogenética de la Leucemia Linfoblástica del Adulto*. Barcelona, España: Med Clin. Servicio Laboratorio- Hematología.
28. Karp, G. (2014). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos*. (7 ed). México, DF: McGrawHill. Pp 664-698.
29. Torres, I. (2010). *Cuidados enfermeros al paciente hematológico*. Malaga, España: Publicaciones Vertice.
30. Ortega, M., Osnaya, M. y Rosas, J. (2007) "*Leucemia Linfoblástica Aguda*" Artículo de Revisión. Medicina Interna. México: Mediagraphic Artemisa.
31. Fuensanta, M. (2006). *Programa Científico. Casos clínicos citológicos. Hematológica*. Barcelona España: Edición Española.

32. Senra, A. (2002). *El Cáncer. Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención*. Madrid, España: Elsevier
33. *Generalidades en Oncología*. (2012). Fundación para la excelencia y la calidad de la Oncología.
34. Salmero, J., Franco, F., Salazar, E. y Lazcano, E. (1997) *Panorama epidemiológico de la mortalidad por Cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991-1995*.
35. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) "*Estadísticas a propósito del día mundial contra el Cáncer (4 de Febrero)*" Datos nacionales. A 1 de Febrero de 2017. Recuperado el 23 de julio de 2017, de: [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017\\_Nal.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf)
36. Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad. (25 de agosto de 2016). *Registro de supervivientes de cáncer*. Recuperado el 5 de enero de 2017, de: <https://www.gob.mx/insalud/articulos/registro-desupervivientes-de-cancer>
37. Khosravi, P. (2005) *Plasma cell leukaemia: a rare variant of multiple myeloma. A case report*. Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. AN. MED. INTERNA (Madrid) Vol. 22, N.º 11, pp. 532-534.
38. Lassaletta A. (2016). *Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda*. Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica. Hospital Universitario Niño Jesús. Madrid. Pediatría Integral. Volumen XX. Número 6.
39. Artigas, C., Melo, A., Roa, J., Páez, E., [et. al.] (2002). *Detection of BCR-ABL gene sequences using polymerase chain reaction reverse transcriptase (RT-PCR) in patients with leukemia*. Chile: Rev Méd; 130: 623-630.
40. Quesada, M., Pantaleón, G., Bello, D., Casanueva, K. y Carnot, J. (2011). *Cytogenetic results in patients with chronic myeloid leukemia*. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.. Revista Cubana de Medicina; 50(4):341-347.
41. Pavón, M, Hernández, P., Martínez, G., Agramonte, O., Fagundo, J., y Bravo, J. (2005). *Leucemia mieloide crónica. Actualización en Citogenética y Biología Molecular*. Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba: Revista Cubana de Medicina.
42. Ruiz, G. y Sosa, R. (2005) *Un caso de leucemia aguda linfoblástica*. México, D.F: Médica Sur. Vol. 12, núm. 1.
43. Cervera, E. (2002). *Biología molecular y tratamiento de la leucemia mieloide crónica*. Departamento de Laboratorio Clínico, Instituto Nacional de Cancerología, México DF. Gac Méd Méx Vol.138 Suplemento No. 1.
44. Alonso, C., Gallego, M., Alfaro, El., Rossi, J. y Felice, M. (2006) *Caracterización molecular en leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria*. Hematología, Vol. 10. Nº 1: 8-12.
45. Elli Papaemmanuil, Ph.D., Moritz Gerstung, Ph.D., Lars Bullinger, M.D., Verena I. Gaidzik, M.D., Peter Paschka, M.D., Nicola D. Roberts, B.Sc., Nicola E. Potter, Ph.D., [et. al.] (2016) *Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia*. The new England journal of Medicine. Vol. 374 No. 23.

46. Sanchez, S. y Ayala, A. (2015) *Molecular detection and quantification of the bcr-abl1 transcript in patients with chronic myeloid leukemia*. Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Molecular y Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la UNA. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
47. Carreño, F. (2008) *Estudio molecular del oncogen BCR/ABL t (9:22) en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica*. Tesis Doctoral. Sertenejas, Venezuela: Universidad Simón Bolívar.
48. Van Dongen, J, Macintyre, A. Gabert, J. Delabesse, E. [et al.] (2000). *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease*. *Leukemia*. [citado 3 de diciembre de 2012];13(12). Recuperado a partir de: <http://www.nature.com/leu/journal/v13/n12/abs/2401592a.html>
49. Carranza, C. (2011). *Detección por PCR Multiplex de los transcritos quiméricos BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, ETV6-AML1; y su utilidad como factor pronóstico en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda*. Proyecto FODECYT No. 48-2009. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.
50. Steegmann, J.L.; Gómez, M.T.; Pérez Encinas, M. (2014) *Manual para el control y el tratamiento de los pacientes con LMC*. Barcelona, España:Euromedice
51. Ortiza, C; Álvarez, Y; Dongo-Pfluckerc K; Valdiviad E; Mendoza J; Dávila S y Mora-Alféreze P. (2017). *Mutaciones en el gen BCR-ABL1 en un paciente con leucemia linfoblástica aguda resistente a terapia*. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*; 74(2):162-166.
52. Casanueva, K; Pantaleón, G; Ruiz, Y; Mato, J; Quesada, M; Carnot, J; (2011) *Estudio del reordenamiento molecular BCR-ABL en pacientes con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica*. *Rev Hematol Mex*; 12 (4):243-248
53. Gómez, D; Tarín, L. (2011) *Tratamiento de la leucemia mieloide crónica en fase crónica: una perspectiva mexicana*. *Rev Hematol Mex*; 12 (4):267-275
54. Junco, J; Montañó, A. y Aguayo, A. (2006) *Molecular Basis of Cancer*. Departamento de Oncología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Revista de Investigación Clínica*. Vol. 58. No. 1. Pp: 56-70.
55. Maldonado, L. (2008) *Neoplasias: Bases moleculares. Biología del crecimiento*.
56. Santoyo, A; Ramos, C; Saavedra, A; González, L; Martínez, A; Olarte, I. y Collazo, J. (2017) *Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia en dos centros de referencia del Valle de México*. Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. *Gac Med Mex.*; 153:44-8.
57. Estey E. (2014) *Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management*. *Am J Hematol*; 89 (11):1063-81.
58. Appelbaum F, Gundacker H, Head D, [et al.] (2006) *Age and acute myeloid leukemia*. *Blood*; 107(9):3481-5.
59. Goodarz, D; VanderHoorn, A; López, A; Murray, C; (2005) *Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors*. Harvard School of Public Health, Boston, MA. *Lancet*; 366: 1784–93.

60. Fernández, C; Manzur, J; Goldman, A. (2012) *Manual de Oncología*. Instituto Nacional del Cáncer. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud.
61. Lodish, H. [et. Al.] (2016) *Biología celular y molecular*. (7ª ed). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
62. De la Cruz, A. (2016) *Caracterización molecular de los genes B7, MDR y ATCs como factor pronóstico en mieloma múltiple*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
63. Consejo de Salubridad General. (2016) *Diagnóstico temprano y oportuno de leucemia aguda en la infancia y adolescencia en el primer nivel de atención*. Guía de referencia rápida.
64. Raygoza, C. (2017) *Respuesta molecular temprana a 3 meses, como predictor de respuesta citogenética completa a 6 meses en pacientes con leucemia mieloide crónica*. Tesis para obtener el grado de Especialista en Medicina (Hematología). Universidad Nacional Autónoma de México.
65. Solias, M; De los Angeles, M; Ruiz, E; Carrillo, J; Navarrete, M; Sanchez, G. y Jiménez, E. (2000) *Citogenética y citoquímica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales*. International Journal of Tropical Biology and Conservation. Rev. biol. trop vol.48 n.2-3 San José Jun.
66. Pavón, V; Hernández, P; Martínez, G; Agramonte, O; Jaime, J. y Bravo, J. (2005) *Leucemia mieloide crónica. Actualización en Citogenética y Biología Molecular*. Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba: Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter v.21 n.2.
67. Fernández, E. (2017) *Descripción de características clínicas y hematológicas de los pacientes con leucemia aguda linfóide de células B entre 1 y 10 años de edad en el Instituto Nacional de Pediatría: experiencia en 10 años*. Tesis para obtener el grado de Especialista en Medicina (Hematología Pediátrica). Universidad Nacional Autónoma de México.
68. Velásquez, J; Arcos, D; Chávez, M; De la Paz, M; Sánchez, D; Galicia, S; Espinoza, R; Cervera, E. (2013) *Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica*. Rev Esp Méd Quir; 18: 253-259.
69. Lomanto, L; Ortiz, O; Bretón, C; Gómez, A y Mesa, V. (2003) *El ciclo celular*. Artículo estudiantil. Med. UNAB.
70. Lagunas, M; Valle, A. y Soto, I. (2014) *Cell cycle: regulation mechanism*. Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 17(2):98-107.
71. Quezada, M. (2007) *El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias*. Art. UAM-I. Para obtener el título de Biólogo experimental.
72. Morgan, D. (2007) *The Cell Cycle*. Principles of Control. Oxford University Press.
73. Rubín, P. y Williams, J. (2003) *Oncología Clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. (8ª ed). Madrid, España: Elsevier.
74. Manjarrez, A. (2003) *Oncogenes*. Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 1(2):41-45.

75. Branda, N. (2014) *Genética del cáncer. Protooncogenes y genes supresores de tumores*. Universidad Nacional del Noreste, Facultad de Medicina. Cátedra de Bioquímica.
76. Jaime, J. y Gómez, D. (2012) *Hematología. La sangre y sus enfermedades*. (3ª ed.) México, D.F: McGraw Hill.
77. Wognum, A; Szilvassy, S. (2015) *Mini review. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells*. STEMCELL Technologies.
78. Rodak, B. (2004) *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. (2ª ed.) Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
79. Jiménez, M. (2001) *Biología molecular en Medicina*. Limusa: México, D.F.
80. Francianne, A. Montibeller, F. Gonçalves, L. Santos, T. Conceição, B. [et. Al.] (2017). *RAS mutations in early age leukaemia modulated by NQO1 rs1800566 (C609T) are associated with second-hand smoking exposures*. BioMed Central. Paediatric Haematology-Oncology Program, Research Centre.
81. Wojciech, L. Papiez, A. Polanski, A. Polanska, J. (2017). *Comprehensive Analysis of MILE Gene Expression Data Set Advances Discovery of Leukaemia Type and Subtype Biomarkers*. Interdiscip Sci Comput Life Sci. 9:24–35.
82. Thomas J. Kipps, Freda K. Stevenson, Catherine J. Wu, Carlo M. Croce. [et. Al.] (2017). *Chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Rev Dis Primers. Author manuscript.
83. Terwilliger, T and Abdul-Hay, M. (2017). *Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update*. Blood Cancer Journal.
84. Nazanin, H. Saeid, A. Bertacchini, J. Vosoughi, T. Rahim, F. Najmaldin, S. (2017). *Significance of Inactivated Genes in Leukemia: Pathogenesis and Prognosis*. Cell Journal (Yakhteh), Vol 19, Suppl 1, Pages: 9-26.
85. Basilico, S. y Göttgens, B. (2017). *Dysregulation of haematopoietic stem cell regulatory programs in acute myeloid leukaemia*. J Mol Med 95:719–727.
86. Mengning Wang, Chuanwei Yang, Le Zhang, and Dale G. Schaar. (2017). *Molecular Mutations and Their Cooccurrences in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia*. Stem Cells International. Article ID 6962379.
87. Cassie J. y Tessa L. (2017). *Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems*. Exp Hematol. Mar; 47: 13–23.
88. Alikiana, M. Galea, R. Apperleya, J. Foronia, L. (2017). *Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia*. Biomolecular Detection and Quantification. Elsevier. 4–20.
89. Chin-Hin Ng and Wee-Joo Chng. (2017). *Recent advances in acute promyelocytic leukaemia*. National University Cancer Institute, Singapore, Singapore.
90. Shiyong Zhou, Pengfei liu and Huilai Zhang (2017). *Bioinformatic analysis of the effects and mechanisms of decitabine and cytarabine on acute myeloid leukemia*. Molecular medicine reports. 16: 281-287.
91. S Reckel, R Hamelin, S Georgeon, F Armand2, Q Jolliet, D Chiappe, M Moniatte and O Hantschel. (2017). *Differential signaling networks of Bcr–Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics*. Leukemia 31, 1502–1512.



92. Jae Wook Lee and Bin Cho. (2017). *Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia*. Review article. Korean J Pediatr; 60(5):129-137.
93. Hubert, H, Ksenia, A. and Rotraud, W. [et. Al.] (2017). *Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia*. Journal of Hematology & Oncology 10:51.
94. Aliasghar K, Alireza A, Mohammad E, Maryam M, Alireza M, Narjes M, Neda M, Mortazavi T. y Abolfazl M. (2017). *Genomic Profiling of Chronic Myelogenous Leukemia: Basic and Clinical Approach*. Journal of Cancer Prevention. Vol. 22, No. 2.
95. Tiziana, G. Carmen, V. Cools, J. y Keersmaecker, K. (2017). *The genetics and molecular biology of T-ALL*. Blood. March 02; 129(9): 1113–1123.
96. Islam, M. Mohamed, Z. y Assenov, Y. (2017). *Differential Analysis of Genetic, Epigenetic, and Cytogenetic Abnormalities in AML*. International Journal of Genomics. Article ID 2913648, 13 pages
97. Hyang-Min, B. Eshaghian, B., Trent, J. Bhatia, R. Siegmund, K. y Yang, A. (2017). *Impact of chromosomal rearrangement upon DNA methylation patterns in leukemia*. Open Med; 12:76-85.
98. Pavón, V. Gómez, R. Arencibia, A. [et. Al.] (2013). *Introduction of Imatinib as First-line Therapy for Chronic Myeloid Leukemia in Cuba*. Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal. MEDICC Review, vol. 13, núm. 1, pp. 35-40.
99. Jingke Yang, Xiaodong Iyu, Xinghu Zhu, Xiangguang Meng, Wenli Zuo, Hao Ai and Mei Deng. (2017). *Chromosome t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia coexisting with multilineage dyspoiesis and mutations in NRAS and WT1: A case report and literature review*. Oncology letters 13: 3066-3070, 2017 Department of Hematology, Central Laboratory, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University.
100. Rychter, A. Jerzmanowski, P. Hołub, A. Specht-Szwoch, S. [et. Al.] (2017). *Treatment adherence in chronic myeloid leukaemia patients receiving tyrosine kinase inhibitors*. Med Oncol 34:104.
101. Coombs, C. Tallman, M. y Levine, R. (2016). *Molecular therapy for acute myeloid leukaemia*. Nat Rev Clin Oncol. May; 13(5): 305–318.
102. Yang dai, Xiao Shuai, Pu Kuang, Lin Wang, Ting Liu and Ting Niu. (2017). *Philadelphia chromosome with acute myeloid leukemia and concurrent large B cell lymphoma of different origins: A case report*. Oncology letters 13: 1189-1193.
103. Merino, A. (2013). *Clasificación de las leucemias agudas mieloides*. Rev Lab Clin;3(3):139–147. Elsevier.
104. Stanganelli, C y Slavutsky, I. (2013). *Rearreglos de IGHV en leucemia linfocítica crónica. Su influencia en la evolución clínica de los pacientes*. Hematología, Vol.17 Número Extraordinario XXI.
105. Curtis, H. [et. Al.] (2008). *Biología*. (7 ed). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
106. Domínguez, M., Flores, G., Rojas, A., [et. Al.] (2015) “*Manual de prácticas. Genética Molecular*” México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

107. Tapia, M. (2008) [figura] recuperado de <http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/14mtapia.html>
108. Catrina, J. (2015) [figura] recuperado de <https://www.tes.com/lessons/sIWJmjprvRjEoQ/cell-cycle-m-phase>
109. Hanahan, D y Weinberg, R. (2000) *The Hallmarks of Cancer Review*. Cell, Vol. 100, 57–70, January 7, Cell Press.
110. Hanahan, D y Weinberg, R. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell 144, March 4. Elsevier Inc.
111. Horne, S., Pollick S and Heng, H. (2014). *Evolutionary Mechanism Unifies the Hallmarks of Cancer*. International Journal of Cancer. 136, 2012–2021.
112. Rangel, N., Forero-Castro, M y Rondón-Lagos, M. (2017). *New Insights in the Cytogenetic Practice: Karyotypic Chaos, Non-Clonal Chromosomal Alterations and Chromosomal Instability in Human Cancer and Therapy Response*. Genes, 8.
113. ThermoFisher Scientific. (2017) [figura] recuperado de <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
114. Annunziata, [et. Al.], (2016) [figura] recuperado de <https://www.tocris.com/cell-biology/cell-cycle>
115. Howlader, N. Noone, AM. [et. Al.] (2017) [figura] recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/pro/tratamiento-lla-infantil-pdq>
116. Biostang, N. (2017) Overview of a Polymerase Chain Reaction Cycle [figura] recuperado de <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>
117. Trejo, A., del Castillo, A., Alcalá, L., [et. Al.] (2017) *Chromosomal abnormalities in patients with haematologic malignancies in the General Hospital of Mexico*. Rev Med Hosp Gen Méx;80(2):87---91.
118. Aparicio, A. (2017) Biología. Las mutaciones.
119. Covarrubias, C. (2017). Somethig about genetics. Rev Med Hosp Gen Méx;80(2):71-72
120. Ladines, W., Barragán, G., Luna, M. [et. Al.] (2016). Morphology of leukaemias. Rev Med Hosp Gen Méx; 79(2):107-113
121. Bianchini, M. [et. Al.] (2017). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. Buenos Aires, Argentina: Medicina; 77: 61-72.
122. Cavallo, F. De Giovanni, C. Nanni, P. [et. Al.] (2011). 2011: the immune hallmarks of cancer. Cancer Immunol Immunother. 60:319–326
123. Sonnenschein, C and Soto, A. (2013). The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A critique. NIH Public Access. J Biosci. September; 38(3): 651–663.
124. Wafik, S. El-Deiry. (2003). Methods in Molecular Biology. Tumor Suppressor Genes. Volume 1. Pathways and Isolation Strategies. Totowa, New Jersey: Humana Press.

125. Morrissette, J. y Bagg, A. (2011). Acute Myeloid Leukemia: Conventional Cytogenetics, FISH, and Moleculocentric Methodologies. *Clin Lab Med* 31. 659–686.
126. Sambrook, J. and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3 ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
127. UCSM. *Biología Genética Molecular*. (2009). Apoptosis y Ciclo celular. [figura] recuperado de <https://es.slideshare.net/guest18ad09/apoptosis-y-ciclo-celular>
128. Augstburger, [et. Al.] (2004). Angiogénesis. [figura] Tomada de <http://www.mundoreishilevante.com/reishi-y-cancer/angiogenesis.html>
129. Levan, A, Frega, K. y Sandberg A. (2011). *Nomenclature For Centromeric Position On Chromosomes. Chromosomes as Vehicle in Organization and Transmission of Characters*. *Acta biol. Colomb.*, Volumen 16, Número 3, p. 43-60.
130. Stock, R. (2006) *PCR en Tiempo Real. Métodos Físicoquímicos en Biotecnología*. IBT-UNAM.
131. Dewald, G. W. (2002). *Cytogenetic and FISH studies in myelodysplasia, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia and lymphoma*. *Int J Hematol*. Aug; 76 Suppl 2:65-74.
132. Manafloyan, S. y Ali Rahmani, S. [et. Al.] (2015). *Reliability Evaluation of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and G-Banding on Bone Marrow and Peripheral Blood Cells in Chronic Myelogenous Leukemia Patients*. *Cell Journal* (Yakhteh), Vol 17, No 1.
133. Cui C, Shu W and Li P (2016). *Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications*. *Front. Cell Dev. Biol*. 4:89. Volume 4, Article 89.
134. Otzen, F. Sasivarevic, D. y Hadi Sohi, S. [et. Al.] (2015). *BloodSpot: a database of gene expression profiles and transcriptional programs for healthy and malignant haematopoiesis*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, Database issue.
135. Lee, E. y Mulle, W. (2017) *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Inst de Investigaciones.
136. Shortt, J y Johnstone, R. (2017). *Oncogenes in Cell Survival and Cell Death*. Inst de Investigaciones.
137. Kavianpour, M. Ahmadzadeh, A. Shahrab, S y Saki, N. (2016). *Significance of oncogenes and tumor suppressor genes in AML prognosis*. *Tumor Biol*; 37:10041–10052
138. Poulsen, T. (2013). *Comparision of Fluorescence In situ Hybridation and Chromogenic In situ Hybridation for low and high Throughput HER2 genetic test*. University of Copenhagen, Denmark.
139. Tabarestani, S. y Hossein, S. (2015). *Detection of Gene Amplification by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Comparison with In Situ Hybridization and Immunohistochemistry*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 16.
140. Lerda, D. Pelliccioni, P. Guidi, A. Theaux, R. [et. Al.] (2017) *La hibridacion cromogenica in situ (CISH) en el diagnostico Oncológico*. Laboratorio de Genética. Facultad de Medicina. Universidad Católica de Córdoba.
141. Aguilar, M. S. (2017). *Biología molecular y citogenética*. España: Editorial Sintesis