

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISIÓN ESTUDIOS DE POSGRADO

**HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD “PEMEX”
CLASIFICACION DE LEUCEMIAS AGUDAS POR MORFOLOGIA,
INMUNOFENOTIPO Y SCREENING DE TRANSLOCACIONES**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUIMICA CLINICA**

P R E S E N T A

Q. C. JOSE LEONARDO ENRIQUE FLORES GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO ARTURO ZARATE RODRIGUEZ

MÉXICO D. F.

ENERO 2008



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.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Juan Labardini Méndez (IN Canc)

Dr. José Pérez Jáuregui (Medica Sur)

Esp. B. C. Lina Teresa Romero Gúman (INP)

M. C. Rodolfo Pastelin (FQ)

Dra. Rebeca Franco y Bourland (CNR)

ESTA TESIS ESTA DEDICADA PARA:

Mi familia, mi esposa Ma. Leticia Gutiérrez Márquez, mi hijo Leonardo Daniel Flores Gutiérrez, quienes han sido para lo más importante, para establecer mis metas y poder realizarlas sin detenerme hasta poder lograrlas, este quizás sea un paso muy pequeño que he logrado dar, pero para mí es muy importante el haberlo realizado con el apoyo de ambos, a ti esposa que me das la confianza, amistad y amor, y a quien yo amo, a ti hijo que eres lo más bello que nos pudo pasar en esta vida.

A mis padres Sra. Josefina García Hernández y José Enrique del Carmen Flores Salazar (finado) quienes hicieron posible que yo esté aquí, a mi hermanos Rodolfo, Isabel, Hilda, Isidro.

A mi tutor Dr. Pedro A. Zarate Rodríguez, por brindarme la confianza, apoyo y los conocimientos que del aprendí, para la realización de este trabajo en el laboratorio del HCSAE PEMEX.

A los miembros de mi jurado por darme parte de su tiempo, DR. Juan Labardini Méndez, Dr. José Pérez Jáuregui. E.B.C. Lina Teresa Romero Guzmán, Dr. Rodolfo Pastelin, Dra. Rebeca Franco Bourland.

A la Dra. Norma A. Salgado Galicia mis más sinceros agradecimientos por brindarme sus conocimientos y experiencia para la realización de este trabajo.

Al Químico René Guevara, por su ayuda en el laboratorio y hacer posible la toma de fotografías de los casos aquí presentados.

A mi amiga Elizabeth Juárez Silva quien siempre tiene palabras de aliento para mí en momentos difíciles.

Y para todos aquellos que por alguna razón se me olvide mencionar, les doy las gracias por apoyarme en lo que yo les haya solicitado.

Resumen

Las enfermedades sanguíneas son la expresión de un trastorno en el metabolismo normal, y abarca todas las enfermedades hematológicas, como anemias y leucemias.

La leucemia es una neoplasia de los leucocitos se presenta a cualquier edad y puede ser de cualquier variante, tomando en cuenta que las leucemias se clasifican en: Leucemias crónicas y leucemias agudas, aquí nos enfocaremos a las leucemias agudas, se describirá en un primer término la morfología tomando una muestra sanguínea o bien realizando un aspirado de médula ósea y se clasificara con los criterios del grupo de la FAB en la que se incluyen tablas para realizar la clasificación. La sintomatología es muy importante, para el diagnóstico de la leucemia aguda en el laboratorio clínico así como los resultados de una biometría hemática, el realizar más análisis específicos para llegar a un mejor diagnóstico, es muy importante para establecer un buen tratamiento al paciente. En otros estudios de laboratorio que se pueden realizar y específicamente en el Hospital Central Sur Alta Especialidad de PEMEX, son el inmunofenotipo y el Screening de Translocaciones, ya que estos estudios no los realizan todos los laboratorios y son pocos los que cuentan con ellos. Por tanto el inmunofenotipo se realizara utilizando anticuerpos monoclonales específicos de clona ya descritos en la literatura, utilizando la citometria de flujo llegaremos a una clasificación más detallada de una leucemia aguda. Las translocaciones cromosómicas en las leucemias agudas juegan un papel crítico, puesto que la presencia o ausencia de ellas son determinantes para establecer un pronóstico y dar inicio a un tratamiento, por ejemplo si está presente la translocación $t(15;17)$ se inicia primero tratamiento con ácido retinoico para madurar la clona y posteriormente a esto iniciar la quimioterapia. Las translocaciones se analizaran por el método de RTPCR de Hema Vision prueba que detecta 28 diferentes translocaciones y rearrreglos cromosómicos en la que incluye más de 80 puntos de ruptura o variantes específicos de algún subtipo de leucemia.

INDICE

PÁGINAS

RESUMEN	I
COMPOSICION DE LA SANGRE Y MORFOLOGIA CELULAR	1
VALORES DE LOS PARAMETROS DE LA SANGRE	2-3
DATOS CLINICOS Y HEMATOLOGICOS	4-6
CLASIFICACION DE LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS	6-11
LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTICAS	11-13
METODOS MOLECULARES EN EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA HEMATOPOYETICO	13
TECNICAS DE ANALISIS GENETICO	14-15
OTROS ANALISIS A NIVEL MOLECULAR	15-17
ANALISIS DE LOS REORDENAMIENTOS CROMOSOMICOS Y OTROS ANALISIS A NIVEL MOLECULAR	17-18
INTRODUCCION DE INMUNOFENOTIPO	18-20
CELULAS B	20-22
CELULAS T	22- 24
CELULAS MIELOIDES Y MONOCITOS	24
CELULAS MEGACARIOCITICAS Y ERITTROIDE	24-25
INMUNOGLOBULINAS Y REORDENACION DE GENES RECEPTORES DE CELULAS T	25-26
USO DE LA CITOMETRIA DE FLUJO	26
ANTICUERPOS MONOCLONALES	27
CITOGENETICA DE LEUCEMIAS AGUDAS	27
CONSECUENCIA DE LAS ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN EL DESARROLLO DE UN TUMOR	27
GENETICA MOLECULAR DE UNA LEUCEMIA	27-28
EL PAPEL CRITICO DE LAS TRANSLOCACIONES CROMOSOMICAS EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS	28
GENETICA MOLECULAR EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS LINFOIDE	29
ACTIVACION DE PROTO-ONCOGENES	30
TABLAS DE LEUCEMIAS LINFOIDES	31
t(9;22)	32-33
t(1;19)	34-35
t(17;19)	35-36
11q23	36
t(12 ;21)	37-38
t(15;17)	39-43
t(8;21)	43-45
t(16;21), t(3;21), INV 16, t(16;16)	45-46
t(X;11), t(17;19)	47-48
t(5;12)	48

t(16;21), TAL 1, MDR	49-50
MATERIALES	51
TINISION DE LA MEMBRANA CELULAR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FLUORESCENTES	
51-52	
METODOS	53
TECNICA DE EXTRACCION DE mRNA	53
SINTESIS DE cDNA	54
AMPLIFICACION	54-61
INTERPRETACION DE RESULTADOS	61-62
LISTA DE TRANSLOCACIONES	63
FOTOGRAFIA DEL GEL Y SU INTERPRETACION	64
TABLAS DE TRANSLOCACIONES	65-69
RESULTADOS DEL ANALISIS DE MORFOLOGIA INMUNOFENOTIPO Y LAS TRANSLOCACIONES IDENTIFICADAS EN LOS PACIENTES CON LAM Y LAL	70-107
CONCLUSIONES	107-108
GLOSARIO	109-114
BIBLIOGRAFIA	115-129

Resumen

Las enfermedades sanguíneas son la expresión de un trastorno en el metabolismo normal, y abarca todas las enfermedades hematológicas, como anemias y leucemias.

La leucemia es una neoplasia de los leucocitos se presenta a cualquier edad y puede ser de cualquier variante, tomando en cuenta que las leucemias se clasifican en: Leucemias crónicas y leucemias agudas, aquí nos enfocaremos a las leucemias agudas, se describirá en un primer término la morfología tomando una muestra sanguínea o bien realizando un aspirado de medula ósea y se clasificara con los criterios del grupo de la FAB en la que se incluyen tablas para realizar la clasificación. La sintomatología es muy importante, para el diagnóstico de la leucemia aguda en el laboratorio clínico así como los resultados de una biometría hemática, el realizar más análisis específicos para llegar a un mejor diagnóstico, es muy importante para establecer un buen tratamiento al paciente. En otros estudios de laboratorio que se pueden realizar y específicamente en el Hospital Central Sur Alta Especialidad de PEMEX, son el inmunofenotipo y el Screening de Translocaciones, ya que estos estudios no los realizan todos los laboratorios y son pocos los que cuentan con ellos. Por tanto el inmunofenotipo se realizara utilizando anticuerpos monoclonales específicos de clona ya descritos en la literatura, utilizando la citometria de flujo llegaremos a una clasificación más detallada de una leucemia aguda. Las translocaciones cromosómicas en las leucemias agudas juegan un papel crítico, puesto que la presencia o ausencia de ellas son determinantes para establecer un pronóstico y dar inicio a un tratamiento, por ejemplo si está presente la translocación $t(15;17)$ se inicia primero tratamiento con ácido retinoico para madurar la clona y posteriormente a esto iniciar la quimioterapia. Las translocaciones se analizaran por el método de RTPCR de Hema Vision prueba que detecta 28 diferentes translocaciones y rearrreglos cromosómicos en la que incluye más de 80 puntos de ruptura o variantes específicos de algún subtipo de leucemia.

INTRODUCCION

El estudio de los elementos formes de la sangre data de hace varios siglos, en donde era considerada esencia de la vida. Uno de los escritos hipocráticos que datan del siglo IV A. C. describen al cuerpo como un compuesto por cuatro humores: bilis negra, sangre, moco ó flema y bilis amarilla. Fahraeus, médico sueco del siglo XII, sugirió que la teoría de los cuatro humores podía hacer su origen en la observación de las cuatro capas que se definen de la sangre coagulada. En el proceso de la coagulación de la sangre se separa en un coagulo gelatinoso rojo oscuro, casi negro, una capa delgada de eritrocitos oxigenados, una capa de leucocitos y plaquetas y una capa de suero amarillento. Se pensaba que la salud y la enfermedad eran resultado de una alteración en el equilibrio de estos humores. Este concepto ayuda explicar porque la sangría para purgar al cuerpo de sus líquidos contaminados se practico desde el tiempo de Hipócrates hasta el siglo decimonoveno.

La composición celular de la sangre no se conoció hasta la invención del microscopio. Con la ayuda de un dispositivo burdo que consistía en una lente biconvexa. Leeuwenhoek (1632-1723) describió y midió con precisión los corpúsculos rojos (eritrocitos). El descubrimiento de los glóbulos blancos (leucocitos) y las plaquetas se logro cuando mejoraron los lentes del microscopio. (1)

La primera descripción de un paciente con leucemia fue publicada en 1827,(2) fue hasta 1845 que Virchow en Alemania y Bennett (3) y Craigie (4) en Scotland reportaron sus casos por separado reconociendo a esta como una enfermedad distinta "White Blood" dos años más tarde Virchow introdujo el termino leucemia para esta entidad y precedió una serie de investigaciones que fueron resumidas en 1856.(5) children.

Como un complemento a sus categóricas observaciones, Kart Vierordt publicó en 1852, los primeros resultados cuantitativos del análisis de las células sanguíneas. Sus procedimientos para la cuantificación eran tediosos y prolongados. Más tarde cada vez mejores métodos para el examen sanguíneo en la década de 1920 y el adelanto en los conocimientos de la fisiología sanguínea y los órganos productores de sangre en la década de 1930, permitieron las anemias y otros trastornos sanguíneos se estudiaron en una base racional. En algunos casos, la fisiopatología de las enfermedades sanguíneas se comprendió sólo después que el paciente respondía al tratamiento experimental. Por ejemplo, se observo mejoría sintomática de pacientes con ciertas anemias macrocíticas cuando se incluía hígado, rico en vitamina B12, en la dieta del enfermo.

Los hematólogos modernos reconocen que las alteraciones en los componentes de la sangre son un resultado de la enfermedad, no su causa primaria, como se creía en el siglo XIX. En condiciones normales, la producción, liberación y supervivencia de los eritrocitos está bajo control estricto para conservar un equilibrio de células de morfología normal. Es probable que las anomalías hematológicas cuantitativas y cualitativas se manifiesten cuando ocurre un desequilibrio entre producción, liberación y supervivencia.

JUSTIFICACION

La prevalencia de leucemias agudas en pacientes de PEMEX es un poco mayor que en la población en general.

Se detectan de 10 – 15 casos nuevos de leucemias agudas al año, tomando en cuenta que se trata de una población cerrada y otro tanto recaen con actividad intensa de la enfermedad que por uno o dos años se encontraba aparentemente controlada.

No se conocen los motivos de la recaída y posiblemente estén relacionado a su inadecuado diagnóstico en virtud de que en muchas ocasiones se había contado solamente con el diagnóstico morfológico de la clasificación de la FAB, que ya no resulta suficiente para clasificar las leucemias agudas .Actualmente se cuenta con otras técnicas para el diagnóstico como el inmunofenotipo por citometria de flujo y la determinación de anormalidades citogenéticas moleculares como la RTPCR ,que utilizadas en forma conjunta ayudan a establecer un mejor plan terapéutico y un pronóstico desde el diagnóstico de la misma .

CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO:

1 Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda

Pacientes con diagnóstico morfológico establecido de la FAB

De reciente diagnóstico

En recaída con leucemia aguda como segunda neoplasia

Que tengan adecuada muestra de aspirado de médula ósea para poder realizar los estudios de este anteproyecto

2 Criterios de exclusión

Pacientes que no tengan diagnóstico morfológico de leucemia aguda

Pacientes en recaída, pero que no hayan tenido estudio por inmunofenotipo o citogenética, cuando se diagnosticaron como leucemia aguda por primera vez

Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda que se encuentran en remisión

HIPOTESIS

Con el análisis que se realizara aplicando los tres métodos que están disponibles en el diagnóstico y manejo de leucemias agudas, en los pacientes del Hospital central Sur de Alta Especialidad de PEMEX, se pretende obtener un mejor diagnóstico y manejo del paciente que padece de una leucemia aguda.

Objetivo general

Establecer en las leucemias agudas, un protocolo a seguir para llegar a una mejor clasificación de las leucemias agudas, esto consiste en aplicar los métodos de punta para diagnosticar y clasificar las leucemias, como lo son en primer lugar la morfología, en segundo lugar el inmunofenotipo y por último las translocaciones realizadas por RTPCR.

Objetivo principal

Establecer como método diagnóstico ideal en leucemias agudas, el diagnóstico integral obtenido del análisis del diagnóstico morfológico de la leucemia de acuerdo a los criterios de la FAB, el inmunofenotipo y del diagnóstico citogenético realizado por RTPCR.

Específicos:

Conocer la sensibilidad y especificidad del inmunofenotipo en leucemias agudas.
Establecer las ventajas de la utilidad de técnicas moleculares por RTPCR para el estudio citogenético de las leucemias agudas.
Comparar los resultados obtenidos entre el diagnóstico morfológico con el inmunofenotipo.
Comparar los resultados obtenidos entre el diagnóstico por inmunofenotipo y RTPCR.

CARACTERISTICAS NORMALES DE LA SANGRE

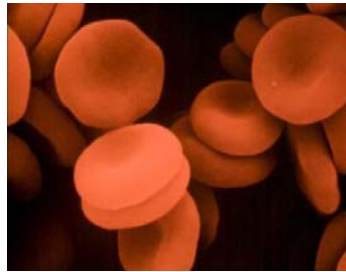
COMPOSICION DE LA SANGRE

La sangre está compuesta de un líquido, plasma y elementos celulares que incluyen leucocitos, plaquetas (trombocitos) y eritrocitos (Fig. 1) El adulto normal tiene alrededor de seis litros de este líquido vital, lo que constituye 7 a 8 % del peso corporal total. El plasma representa más o menos el 55% del volumen sanguíneo, en tanto que los eritrocitos forman el 45% y los leucocitos y plaquetas el 1%.

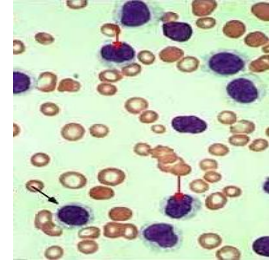
Figura 1:



PLAQUETAS



ERITROCITOS



LEUCOCITOS

Las variaciones de los elementos sanguíneos son con frecuencia el primer signo de enfermedad. Los cambios en el tejido enfermo pueden descubrirse por los análisis de laboratorio que miden las desviaciones de lo normal en los constituyentes sanguíneos. La hematología es, en principio, el estudio de los elementos celulares de la sangre.

VALORES DE REFERENCIA DE LOS PARÁMETROS HEMATOLOGICOS

Los valores normales de los elementos de la sangre pueden tener cambios fisiológicos según la edad, sexo y ubicación geográfica. En tanto que los cambios patológicos en un valor específico de las células sanguíneas pueden deberse a enfermedades o traumatismos. Es muy importante que los valores hematológicos deban ser determinados por cada laboratorio en particular para que las diferencias fisiológicas de grupo de individuos dentro de un área geográfica específica tengan validez. En el cuadro 2 observemos los valores normales sanguíneos.

MORFOLOGIA CELULAR

Para el estudio de la hematología, es esencial conocer la morfología celular, dado que numerosos trastornos hematológicos se acompañan de anomalías en la forma de los componentes celulares o subcelulares.

Una célula es una estructura compleja e intrincada, constituida por una membrana que rodea un gel acuoso de proteínas, carbohidratos, lípidos, materiales inorgánicos y ácidos nucleicos. El núcleo, rodeado a su vez por la membrana nuclear, contiene los ácidos nucleicos que controlan y dirigen el desarrollo, función y división de la célula.

Hematopoyesis (poiesis = formación) es el término usado para describir la formación y desarrollo de las células sanguíneas. Proliferación, diferenciación y maduración celulares tienen lugar en el tejido hematopoyético, que es en su mayor parte la médula ósea. Sólo células maduras pasan a la sangre periférica.

CUADRO 2: VALORES

VALORES ANGUINEOS NORMALES								
EDAD	HB (g/100 ml)	HTO (lt/lt)	ERIT (10 ¹² /lt)	RETIS (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CMCH (g/100ml)	PLAQUETAS 10 ⁹ /lt.)
Nacimiento *	19.0	0.61	5.14	3.2	119	37	32	150-350
1 semana	17.9	0.56	4.86	0.5	118	36	32	“
2 meses	10.7	0.31	3.40	1.8	93	31.5	34	“
3 meses	11.3	0.33	3.70	0.7	88	30.5	3.5	“
6 meses	12.3	0.36	4.60	1.4	78	27	34	“
1 año	11.6	0.35	4.60	0.9	77	25	33	“
4 años	12.6	0.37	4.70	1.0	80	27	34	“
6 años	12.7	0.38	4.70	1.0	80	27	33	“
8 años	12.9	0.39	4.70	1.0	80	27	33	“
12 años	13.0	0.39	4.80	1.0	80	27	33	“
Adultos * Varones	13.3- 17.7 **	0.40- 0.52	4.4-5.9	1.0	80- 100	27- 34	31-36	150-440
mujeres	11.7- 15.7	0.35- 0.47	3.8-5.2	1.0	80- 100	27- 34	31-36	“

Abreviaturas del cuadro: VCM = volumen corpuscular medio, HCM = hemoglobina corpuscular media, CMCH = concentración media corpuscular de hemoglobina.

+ Los valores del nacimiento hasta los 12 años se transcribieron de Millar y Col. Y matota y Col.

* Los valores para varones y mujeres adultos proceden de Williams.

** Los valores de la hemoglobina para individuos de raza negra de todas las edades y los dos sexos son 0.5-1.0 g/100 ml menores.

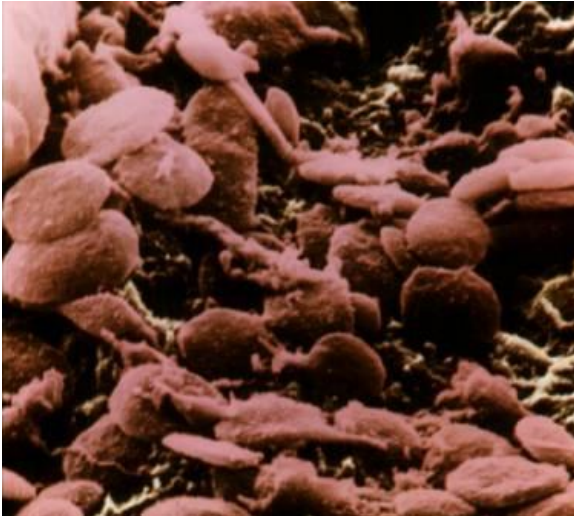
El tejido productor de sangre localizado entre las trabéculas del hueso esponjoso se conoce como médula ósea. Este tejido hematopoyético principal tiene un volumen de 30 a 50 ml/Kg. de peso corporal, del que más o menos la mitad realiza hematopoyesis activa, la médula roja. La otra mitad no tiene actividad hematopoyética; es la médula grasa o amarilla. Por lo tanto, la celularidad normal es del 50 %. La médula roja contiene los precursores eritroides y mieloides, con una proporción mieloides eritroide (M:E) de 1.5: 1 a 4:1.

La médula roja normal es capaz de responder a estímulos e incrementar su actividad varias veces su tasa normal. Como resultado, se vuelve hiperplásica y reemplaza las porciones de la

medula grasa. La hiperplasia acompaña a todos los trastornos en que hay un incremento de hematopoyesis o ésta es ineficaz. El grado de hiperplasia se relaciona con la gravedad y duración del estado patológico. En particular en este trabajo nos enfocaremos a las neoplasias conocidas como leucemias agudas (sin olvidar que se presentan otras patologías como: leucemias crónicas y linfomas) donde las células precursoras que se caracterizan por proliferación neoplásica y acumulación de células hematopoyéticas inmaduras en la medula ósea Fig. 2.(1)

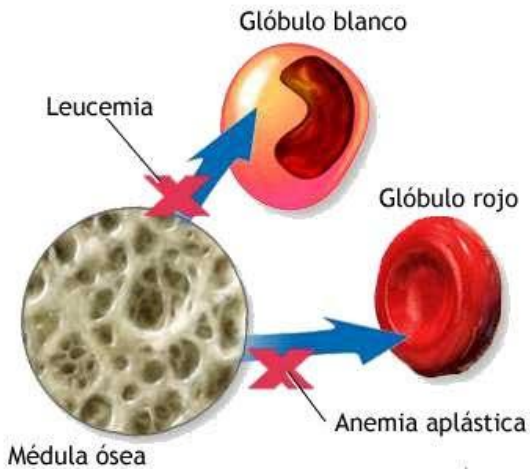
Figura 2:

MEDULA OSEA AL INICIO DE LA ENFERMEDAD



La leucemia es una enfermedad neoplásica maligna de la médula ósea y la sangre. La leucemia mieloide y linfoide aguda pueden ocurrir de diversas maneras: el Hematólogo y Químico del laboratorio son los primeros que pueden observar distintos tipos de células en la sangre o en la médula ósea. Debido a que la mayoría de los pacientes presentan uno de siete patrones diferentes según las células implicadas, estos patrones han formado una subclasificación. Hay dos categorías principales de leucemias agudas, clasificadas según el sitio de lesión primaria de la célula precursora. Si la anomalía afecta de manera primaria a la célula precursora mieloide, la leucemia se clasifica como mielocítica o mieloblástica (no linfocítica) aguda (AML). Si el defecto modifica de manera primaria a la célula precursora linfoide, la leucemia se clasifica como linfocítica aguda (ALL) Fig. 3

FIGURA 3: INHIBICION DEL DESARROLLO Y DIFERENCIACION DE LA CELULA.



LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

Los mieloblastos son células no desarrolladas. Si son las células leucémicas dominantes en la médula al momento del diagnóstico, la leucemia se denomina "mieloblástica". Si hay algunos mieloblastos pero también hay algunas células que se están desarrollando para transformarse en células sanguíneas completamente desarrolladas, se usa la designación "con maduración". Si hay células que están desarrollando características de monocitos (tipo "monocítico") o glóbulos rojos (eritroleucémica"), se usan estas designaciones y así sucesivamente. Si bien las células leucémicas se parecen a las células sanguíneas normales, su desarrollo es incompleto. Las células sanguíneas normales y sanas no son suficientes en cantidad. La subclasificación de la enfermedad es importante. Se pueden usar diferentes tipos de terapia y el curso más probable de la enfermedad puede ser diferente. Las características adicionales pueden ser importantes para guiar la selección de la terapia, incluyendo: anomalías de los *cromosomas*, el *inmunofenotipo* de la célula, la edad y la salud general del paciente, y otros factores en cuadro 4.

Cuadro 4

LEUCEMIA

- . Es un grupo de neoplasias heterogéneas
- . Se originan en la médula ósea
- . Son mortales si no se tratan
- . Hay falla de la hematopoyesis
- . Es el cáncer más frecuente en pediatría
- . No existen métodos preventivos

La leucemia si se trata a tiempo se puede curar; su curso durante la enfermedad cuadro 5.

Cuadro 5

LEUCEMIAS AGUDAS

- . Progresión rápida
- . Producción incontrolada de una clona celular inmadura (blástos) que sustituyen las células normales de la médula ósea
- . Puede presentarse como:

Pancitopenia
Mono o bicitopenias
Leucocitosis
Con o sin blástos en sangre

. *Correlación clínica*

Algunas de las manifestaciones más comunes en leucemias agudas se muestran el cuadro 6, algunos factores que pueden predisponer a una leucemia aguda.

DATOS CLINICOS

Como se muestra en los cuadros anteriores los signos y síntomas de presentación de la enfermedad, se relaciona con la depresión de la hematopoyesis normal. Palidez, fatiga y debilidad por anemia se encuentran en casi todos los pacientes. Sangrado, hematomas y hemorragias petequias causadas por trombocitopenia, son también características constantes de la enfermedad. Una infección que no responde a la terapéutica apropiada puede ser el primer signo de leucemia. Por lo general, la infección es menor, pero en ocasiones puede ser más grave (Neumonía, meningitis). Cuando hay fiebre, ésta se debe a la infección subyacente. El dolor óseo no es tan común en AML como en ALL

Cuadro:6

MANIFESTACIONES CLINICAS MÁS COMUNES EN LEUCEMIA AGUDA

CARACTERISTICAS	FRECUENCIA %
HEPATOMEGALIA	79
ESPLENOMEGALIA	69
ADENOMEGALIA	62
FIEBRE	62
PALIDEZ	55
HEMORRAGIA	52
ANOREXIA	33
ADINAMIA	30
DOLOR OSEO	25
DOLOR ARTICULAR	20
DOLOR ABDOMINAL	19
PERDIDA DE PESO	13

DATOS HEMATOLOGICOS

Dentro de los datos hematológicos pueden ser muy variados, siendo los más importantes la anemia, trombocitopenia, leucocitosis o leucopenia y la más importante de todas; es la presencia de blástos en sangre periférica y si se sospecha de leucemia se tomara una medula ósea para confirmar esta sospecha. Se dice que hay leucemia aguda si la cuenta en medula ósea es mayor a 30 % (valores normales en medula ósea es de 5-8%). Cuando los blástos contienen bastoncillos de Auer puede descartarse un diagnóstico de ALL. Los bastoncillos de Auer se encuentran en mieloblastos, monoblastos y, en ocasiones, células monocíticas y mielocíticas más diferenciadas.

ALL. La morfología de los mieloblastos que no contienen cuerpos de Auer no se distinguen de los linfoblastos. En este caso es necesario la citoquímica para definir la naturaleza mieloide de la población blástica. Ahora con la aparición de anticuerpos monoclonales (inmunofenotipo) y la citometria de flujo, se puede considerar que las técnicas de tensión especial como: negro

sudan, peroxidasa son alternativas validas más sin embargo, si se tiene alcance el inmunofenotipo y las técnicas de biología molecular para poder realizar una clasificación de la leucemia, es más confiable para el diagnóstico del paciente así como del tratamiento que este deberá recibir. (nota las tinciones especiales no se realizaron, sin embargo si se mencionaran como un complemento así como algunos de los marcadores que menciona la literatura, tampoco se utilizaron en este estudio).

En este trabajo se pretende correlacionar en base a lo anterior La morfología como primera fase diagnóstica, posteriormente la citometría de flujo y por el método de RTPCR la alteración cromosomica.

Existen factores que pueden predisponer a padecer una leucemia aguda se muestran en el cuadro 7.CUADRO: 7

ENTIDADES	OBSERVACION	ENTIDADES	OBSERVACION
ANOMALIAS CROMOSOMICAS	SINDROME DE DDOWN TRISOMIA G SINDROME DE KLINEFELTER ANEMIA DE FANCONI SINDROME DE BLOOM	EDAD MATERNA HISTORIA MATERNA REPRODUCTIVA MAYOR PESO AL NACIMIENTO	MAS DE 35 AÑOS ABORTOS MULTIPLES MAS DE 3.5 KG
ENFERMEDADES GENETICAS	ENFERMEDAD DE BRUTON ATAXIA SINDROME DE POLAND SINDROME DE SHWACHMAN	RADIACION IN- UTERO OCUPACION PATERNA OCUPACION OCUPACION MATERNA	AUMENTO X 2 LAL o L PESTICIDAS, PLASTICOS, PLOMO PINTURAS Y SOLVENTES PINTURAS Y PIGMENTOS
CONSAGUINIDAD	NORTEAMERICA		BENCENO Y GASOLINA
LEUCEMIA FAMILIAR	DEFICIENCIA DE ADENOSIN DEAMINASA	EXPOSICIÓN MATERNA	SERIE G1 ANTES DE CONCEPCION
NIVEL SOCIOECONOMICO ALTO	NORTEAMERICA CCG 1994	CAMPOS ELECTROMAGNETICOS	¿????? INFECCION VIRAL
RECIEN NACIDO	VITAMINA K	HIPÓTESIS DE GREAVES	LAL PRE B

Robinson LL, Epidemiology of childhood, University of Minnesota. Minn. ASCO 1994.

Clasificación de leucemias agudas según la FAB.

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Leucemia mieloide aguda, mínimamente diferenciada (M0)

Leucemia mieloide aguda sin maduración (M1)

Leucemia mieloide aguda con maduración (M2)

Leucemia mieloide aguda con maduración con t(8;21)

Leucemia promielocítica aguda (M3)

Tipo hipergranular

Tipo microgranular

Leucemia mielomonocítica aguda (M4)

Leucemia mielomonocítica aguda con aumento de eosinófilos en médula (M4E0)

Leucemia monocítica aguda (M5)

Leucemia monoblástica aguda (M5a)

Leucemia monocítica aguda con maduración (M5b)

Eritroleucemia

Mieloide/Eritroide (M6a)

Eritroide pura (M6b)

Leucemia megacarioblástica aguda (M7)

Leucemia megacarioblástica aguda asociada a t(1;22)

2. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Leucemia linfoblástica aguda (L1/L2)

LLA de célula precursora B

LLA de célula "precursora" T

Leucemia linfoblástica aguda de célula B (L3) (equivalente al linfoma de Burkitt en la fase leucémica)

Leucemia/Linfoma linfoblástico

De célula precursora B

De célula "precursora" T

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MÍNIMAMENTE DIFERENCIADA (LMA-M0)

DEFINICIÓN

LMA sin evidencia de diferenciación mieloide por morfología o citoquímica. La naturaleza mieloide de los blástos se demuestra mediante marcadores inmunológicos y/o estudios ultraestructurales incluyendo citoquímica ultraestructural.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

Blástos de mediano tamaño, cromatina dispersa, núcleo redondo o ligeramente indentado con uno o dos nucléolos. Citoplasma agranular con basofilia variable. Más raramente presentan morfología similar a un linfoblasto.

Mieloperoxidasa (MPO), Sudán negro B (SNB) y esterasa cloroacetato negativas.

INMUNOFENOTIPO

CD13, CD33 y/o anti-MPO +, CD3, CD22, CD79^a - ; CD34, HLA-DR +; CD11b, CD14 +/-.

GENÉTICA

Las anomalías más frecuentes son cariotipo complejo, trisomía 8 y 4.

No reordenamiento de IgH ni TCR.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Es la que peor pronóstico tiene de todas las LMA.

EQUIVALENTE NO NEOPLÁSICA

Célula hematopoyética precursora en la fase más temprana de diferenciación y maduración mielóide. (14, 15, 16, 17, 18)

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON MADURACIÓN (LMA-M1)

DEFINICIÓN

Caracterizada por un alto porcentaje de blástos en médula ósea sin evidencia de maduración. En el tipo I y II constituyen más del 90% de las células no eritroides.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

La mayoría presentan mieloblastos típicos con granulación azurofílica y/o presencia de bastones de Auer y MPO o SNB positivas. En menos casos los blástos parecen linfoblasto sin gránulos azurófilos; la MPO y el SNB están presentes al menos en más del 3% de las células.

INMUNOFENOTIPO

Al menos dos marcadores mielomonocíticos (CD13, CD33, w65 y/o CD117) y otros marcadores **sin** especificidad mielóide (HLA-DR, CD34, CD7, CD4, CD15, CD11b, CD11c).

GENÉTICA

No anomalías cromosómicas específicas conocidas.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Generalmente se presentan con pancitopenia. (14,17,19)

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON MADURACIÓN (LMA-M2)

Subtipos: LMA-M2 con t(8;21); LMA-M2-baso.

DEFINICIÓN

La LMA-M2 se define por la presencia de 30% de blástos en sangre con 10% de neutrófilos maduros. Los monocitos son 20% de las células de la médula ósea. En la médula se observan promielocitos, mielocitos y neutrófilos maduros con un grado variable de displasia.

La LMA-M2 es el tipo morfológico que se asocia predominantemente con la t(8;21) y es más frecuente en niños que en adultos; se han descrito algunos casos también con t(8;21) en la LMA-M1 o la LMA-M4.

GENÉTICA

Translocación t(8;21)(q22;q22) afectando a los genes LMA1 y ETO.

Algunos casos de LMA-M2 tienen reordenamiento para LMA1 y ETO y son citogenéticamente negativos para la translocación t(8;21).

LMA M2-baso/12p y t(6;9)(p23;q34)/M2/M4/SMD

Las deleciones y translocaciones afectando al cromosoma 12 p, banda 11-13, tales como del (12)(p11p13) se asocian a LMA-M2 o M4 con basofilia.

t(6;9)(p21--22;q34), se asocia a la LMA-M2 o M4 (o síndrome mielodisplásico SMD) con aumento de basófilos en médula ósea.

La translocación t(6;9)(q23;q24) da lugar a la formación de un gen quimérico de fusión: DEK y CAN.

INMUNOFENOTIPO

CD34, CD117 + o -, CD33, CD13 +.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Los pacientes con LMA-M2 con t(8;21) tienen porcentajes de remisión completa elevadas especialmente con dosis altas de citostáticos. Puede presentarse como sarcoma granulocítico extramedular. (6, 14, 20)

LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (LMA-M3)

DEFINICIÓN

LMA con proliferación de blástos y promielocitos anormales.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

Promielocitos hipergranulares con núcleo reniforme o bilobulado y citoplasma denso con gránulos azurófilos. El porcentaje de blástos puede ser inferior al 30%. MPO intensamente positiva.

Dos subtipos:

LMA-M3 hipergranular

LMA-M3 microgranular

LAM-M3 variante microgranular (variante hipogranular)

Caracterizada por un conteo leucocitario elevado. Los blástos y los promielocitos anormales tienen características morfológicas distintivas como gránulos finos y núcleo bilobulado y se asemejan a monocitos. Generalmente se identifican células "faggot" = (fagocíticas) (que contienen haces de bastones de Auer).

INMUNOFENOTIPO

LMA M3 con t(15;17): marcadores mieloides +, HLA-DR - (75%)

GENÉTICA

t(11;17) (q23;q21) la más frecuente; otros casos muestran t(5;17)(q32;q12) con reordenamiento del gen RARA.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Frecuentemente se asocia a CID. (7, 8, 9, 10, 11,12 ,13)

LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA AGUDA (LMA-M4)

Subtipos: LMA-M4Eo

DEFINICIÓN

Proliferación de precursores de neutrófilos y monocitos. El diagnóstico y la diferenciación de la LMA-M4 de la LMA-M2 y la LMA-M5b requieren la evaluación de sangre periférica y de aspirados medulares.

La médula ósea contiene 30% de blástos; los monocitos y precursores de los monocitos son 20%. Un elevado porcentaje de monocitos pueden estar presentes en sangre periférica $>5 \times 10^9/L$.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

No siempre pueden distinguirse los monocitos y promonocitos. El criterio citológico para determinar la diferenciación monocitoide es la presencia de actividad esterasa no específica.

INMUNOFENOTIPO

No hay marcadores específicos para diferenciación de línea monocítica. La combinación de los siguientes marcadores es un buen indicador: CD14, CD15, CD13 y CD33 +, CD4, Cd11b, CD11C + o -.

LMA-M4EO: inv/de16(q22)

Entidad diferenciada caracterizada por un componente eosinofílico anormal en la M. O. y anomalías cromosómicas específicas.

Esta misma alteración cromosómica puede encontrarse ocasionalmente en otras leucemias mieloides como la LMA-M2 o M4 sin eosinofilia, M5, síndrome mielodisplásico (SMD) y la crisis blástica de la leucemia mielógena crónica.

GENÉTICA

Clonación del 16p y 16q; genes alterados CBFb y MYH 11.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Los pacientes con LMA-M4 con inv(16) tienen un alto porcentaje de remisión completa particularmente con el uso de dosis altas de arabinosido de citosina.

LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA (LMA-M5)

DEFINICIÓN

80% o más de las células son de la línea monocítica, incluyendo monoblastos, promonocitos, monocitos. Puede haber un componente menor de neutrófilos. La LMA se divide en 2 tipos: M5A (más del 80% de monocitos o monoblastos en la M. O.) y M5B (menos del 80% son monoblastos y la célula que predomina son los promonocitos).

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

Monoblastos: células grandes, citoplasma abundante basofílico, con algunos gránulos azurofílicos y vacuolas. Núcleo redondo, cromatina laxa y uno o más nucléolos grandes.

Promonocitos: Núcleo más irregular y ligeramente convoluto; citoplasma generalmente menos basofílico; ocasionales gránulos grandes azurófilos. Los bastones de Auer son raros en la LMA5 y cuando se ven están en células que se identifican como mieloblastos.

En la mayoría de los casos los monoblastos y promonocitos muestran actividad esterasa no específica intensamente positiva. En el 10-20% de los casos, más frecuentemente en la M5A, la reacción no específica es negativa o muy débilmente positiva.

INMUNOFENOTIPO

No hay marcadores específicos para la línea monocítica. Sin embargo son indicadores de diferenciación monocítica la expresión de: CD14, CD15, CD13 y CD33 +, CD4, CD11b, CD11c y CD68 + o -.

GENÉTICA

Deleciones y translocaciones del cromosoma 11 banda q23. Casos aislados de M5B, M4, M2, M1 y LLA pueden mostrar la misma anomalía.

Subtipo LMA M5A

Translocación t(8:16)(p11;p13) en la mayoría de los casos, junto a características de hemofagocitosis por las células leucémicas, particularmente eritrofagocitosis.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Se presenta con manifestaciones cutáneas, infiltración visceral y afectación del SNC. La LMA-M5A es particularmente frecuente en niños y neonatos y se asocia con frecuencia a reordenamiento del cromosoma 11q23. Puede presentarse como un sarcoma monoblástico extramedular. (48, 55, 56, 57, 58)(14, 21)

LEUCEMIA ERITROIDE AGUDA

DEFINICIÓN

LMA M6a: presencia de más del 50% de las células en M. O. son precursores eritroides y 30% de mieloblastos en la población no eritroide.

LMA M6b: Proliferación neoplásica de células inmaduras casi exclusivamente de la línea eritroide (más del 80%) sin evidencia de componente mieloblástico significativo.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

LMA-M6a: Precusores eritroides en todos los estadios frecuentemente con tendencia a la inmadurez. Blástos similares a mieloblastos. PAS + en precusores eritroides.

LMA-M6b: Con o sin características de diferenciación eritroide. Diseritropoyesis marcada. Normoblastemia.

INMUNOFENOTIPO

LMA- M6a: CD13 +, CD33 +, anti-MPO +, CD34 +/-, HLA-DR II +/- . Glicoforina A + o - .

LMA- M6b: Los casos más diferenciados pueden mostrar glicoforina A y hemoglobina A y negatividad para marcadores mieloides. Los blástos a menudo son negativos para HLA-DR II y CD34. Las formas más inmaduras son negativas para anti-glicoforina A o débilmente positiva en una minoría de blástos.

GENÉTICA

No anomalía cromosómica descrita.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Anemia intensa y normoblastemia. La LMA-M6a puede ser primaria o secundaria a un sd. mielodisplásico.

EQUIVALENTE NO NEOPLÁSICA

LMA-M6a: Célula precursora multipotencial (stem cell) con amplio potencial mieloide.

LMA-M6b: Célula primitiva (BFU-E/CFU-E) con cierto grado de diferenciación hacia línea eritroide. . (14,21,22,23,24)

LEUCEMIA MEGACARIOBLÁSTICA AGUDA

DEFINICIÓN

30% de blástos de la línea megacariocítica en médula ósea y/o sangre.

MORFOLOGÍA Y CITOQUÍMICA

Sangre periférica: blástos de mediano a gran tamaño, con núcleo redondo, o indentado con 1-3 nucléolos. Citoplasma basofílico, a menudo agranular con pseudópodos prominentes.

Médula ósea: variable desde casos con una población uniforme de blástos pobremente diferenciados a una mezcla de blástos y megacariocitos displásicos madurando. Fibrosis reticulínica variable.

SNB y MPO son negativas. PAS, fosfatasa ácida y esterasa no específica positivas.

INMUNOFENOTIPO

Marcadores linfoides, TdT, CD34, HLA-DR II negativos.

Expresión de uno o más glicoproteínas plaquetarias: CD41, CD42, y/o CD61.

Marcadores mieloides CD13 y 33 + (33%); MPO -.

En M .O. blástos y megacariocitos son factor VIII +.

GENÉTICA

Varias anormalidades genéticas descritas en adultos, tales como inv(3)(q21; q26). En niños, particularmente en menores de 1 año, puede haber t(1;22)(p13;q13) con rasgos clínicos distintivos.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Ocurre en adultos y niños. Generalmente se presenta con trombocitopenia y en algunos casos trombocitosis. La hepatoesplenomegalia es infrecuente excepto en niños con t(1;22). Pronóstico pobre, particularmente en estos últimos casos.

EQUIVALENTE NO NEOPLÁSICA

Célula precursora hematopoyética relacionada con la línea megacariocítica y/o capaz de diferenciación hacia esa línea. (14, 25, 26, 27, 28, 29)

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (L1/L2)

DEFINICIÓN

Leucemia aguda formada por linfoblastos.

MORFOLOGÍA

Desde predominio de linfoblastos pequeños con poco citoplasma y cromatina condensada (L1) a linfoblastos grandes con más citoplasma, cromatina dispersa y nucléolos múltiples prominentes (L2).

MPO y SNB negativas. Esterasa inespecífica positividad puntiforme multifocal o patrón de tinción en el aparato de Golgi.

INMUNOFENOTIPO

Fenotipo de célula B precursora o de célula T. Ambas pueden presentar morfología de L1 o L2.

1.- LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULA B PRECURSORA.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Ocurre más frecuentemente en niños y en viejos. Pronóstico menos favorable en niños menores de un año y en los adultos.

INMUNOFENOTIPO

Tdt +, CD19, CD22, CD20, CD79, CD45 y CD10 +/- . CD22 c es específica de línea.

GENÉTICA

Diversas anormalidades citogenéticas asociadas de significado pronóstico.

En niños más del 50% de los casos tienen hiperdiploidia y t(12;21) con buen pronóstico y supervivencia del 85-90%. Otros casos se asocian a translocaciones del gen MLL en el 11q23, indicador de mal pronóstico independientemente de la edad.

En los adultos: t(9;22) en el 25% de los casos con mal pronóstico; las translocaciones 11q23 son más frecuentes; la hiperdiploidia asociada a buen pronóstico con 51-65 cromosomas y t(12;21) son infrecuentes.

2.- LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS T

INMUNOFENOTIPO

CD1a, CD2, CD3, CD5 y CD7 +variable. CD3 es el marcador T más temprano y específico.

GENÉTICA

Anormalidades genéticas sin significado pronóstico: (33%) translocaciones del TCR con genes para transcripción de diversos factores (MYC, TAL1, RBTN2, RBTN2, HOX11 y LCK); (30%) delección 9p-.

.HALLAZGOS CLÍNICOS

15% de las LLA en niños; más frecuente en adolescentes que en niños. 25% de las LLA del adulto. Mal pronóstico independientemente de los hallazgos citogenéticos. Se presentan como masa mediastínica o de otros tejidos y leucocitosis elevada en sangre.

EQUIVALENTE NO NEOPLÁSICA

Células precursoras T o células T en diferentes estadios madurativos

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA L3 (LEUCEMIA DE BURKITT)

DEFINICIÓN

Leucemia linfoblástica aguda formada por linfoblastos B (SIg+).

MORFOLOGÍA

2-3% de las LLA son L3. Blástos de tamaño intermedio a grande con citoplasma basofílico moderado y vacuolas claras. Núcleo redondo con cromatina grosera y 2-4 nucléolos llamativos.

INMUNOFENOTIPO

TdT -, Igs con restricción de cadenas. Generalmente CD19, CD20, CD22 y CD79 +.

GENÉTICA

Anormalidades citogenéticas idénticas a las del linfoma de Burkitt.

EQUIVALENTE NO NEOPLÁSICA

Célula precursora temprana B con inmunoglobulina de superficie.

HALLAZGOS CLÍNICOS

Representa la forma leucémica del linfoma de Burkitt. Se presenta con tumor grande y LDH elevada. Con tratamiento agresivo los pacientes tienen buen pronóstico, supervivencia del 80-90%.

Como en las anteriores, se utiliza la morfología del grupo FAB, que las divide en tres tipos:

L1: la más frecuente en niños.

L2: la más frecuente en adultos y de mal pronóstico.

L3: la más infrecuente y de peor pronóstico.

Según la estirpe mayoritaria de los linfoblastos (B ó T) existe otra clasificación inmunológica que las divide fenotípicamente en Pre-B precoz, Pre B, B y T.

Mediante la evaluación del cariotipo pueden subclasificarse citogenéticamente en otros cuatro grupos, ya que este tipo de leucemias presentan frecuentemente translocaciones cromosómicas.

MÉTODOS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

Introducción. En este tema vamos a tratar las aplicaciones de la RTPCR (retrotranscripción de reacción en cadena de la polimerasa) al estudio de las leucemias agudas mieloides y linfoides, para correlacionarlas con la clasificación morfológica, inmunofenotipo.

Las aplicaciones en las que nos centraremos son:

1. Detección de translocaciones cromosómicas.
2. Análisis de los reordenamientos de los genes de inmunoglobulinas (Ig) y receptor de células T (TCR).
3. Estudios de quimerismo celular hematopoyético en paciente trasplantados.

En el momento del diagnóstico de un síndrome proliferativo hematopoyético, la determinación de translocaciones cromosómicas ayuda a la clasificación fenotípica de las leucemias agudas, y los estudios de reordenamientos de Ig y TCR permiten determinar la clonalidad celular. Sin embargo, debido a la gran sensibilidad de la técnica de RTPCR

para detectar células malignas, su principal utilidad es en el “diagnostico” de enfermedad mínima residual. En este sentido, las translocaciones cromosómicas y reordenamientos de los genes de Ig y TCR sirven de marcadores tumorales específicos para evaluar si persisten células leucémicas después del tratamiento.

Detección de translocaciones cromosómicas. La primera Translocación descrita fue el cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica en 1960. Durante las siguientes décadas se describieron numerosas translocaciones por técnicas citogenéticas. En la década de los 80 se empezaron a conocer los loci implicados en estas translocaciones, y esto permitió aplicar la técnica de la RTPCR a su estudio. Además, el análisis molecular reveló que en una misma Translocación citogenética existen diferentes puntos de ruptura en los loci implicados. La metodología general de estudio de las translocaciones mediante RTPCR se basa en utilizar cebadores específicos localizados en ambos loci translocados.

Como se ha comentado anteriormente, el estudio de las translocaciones cromosómicas puede utilizarse para detectar enfermedad mínima residual en aquellos pacientes previamente diagnosticados. En estos pacientes, cuando la reacción de RTPCR es negativa no quiere decir que no exista una translocación; solo que la técnica utilizada no este detectando esa translocación más adelante se dará la tabla de las 28 translocaciones que se pueden detectar por esta técnica.

La reacción de RTPCR para el estudio de las translocaciones puede realizarse a partir de ADN genómico o a partir de ADN complementario, dividiéndose la translocación en dos grupos:

1. Estudios a partir de ADN complementario: Translocaciones cromosómicas en las que no están implicados los genes de Ig o del TCR.
2. Estudios a partir de ADN genómico: Translocaciones cromosómicas en las que uno de los loci implicados es el gen de las Ig o del TCR.

En el primer grupo de translocaciones se produce un ARN mensajero quimérico como consecuencia de la fusión de los exones de los dos loci translocados, dando lugar a una proteína quimérica con su función alterada. En este tipo de translocaciones se estudia el ARNm quimérico mediante retrotranscripción y posterior PCR del ADNc (RT-PCR). En una misma reacción de PCR se pueden estudiar diferentes reordenamientos que se distinguirán por el tamaño del producto de PCR.

Ejemplos de translocaciones estudiadas mediante RT-PCR:

Translocación BCR/ABL [t(9;22)], cromosoma Philadelphia, que se presenta en el 95% de las leucemias mieloides crónicas, en el 20-50% de leucemias linfoides agudas en el adulto y entre el 2-10% de las leucemias linfoides agudas en niños. A nivel molecular, en la translocación t(9;22) existen dos tipos de reordenamientos: "p210" y "p190". El más frecuente es el reordenamiento p210, que a su vez presenta dos subtipos: b3a2 (55%) y b2a2 (40%).

Translocación PML/RAR α [t(15;17)] que se presenta en el 100% de las leucemias mieloides agudas M3 (promielocítica). A nivel molecular se estudian tres tipos de reordenamientos: bcr1 (55%), bcr2 (5%) y bcr3 (4%).

En el grupo de translocaciones en los que están implicados el locus de las Ig o TCR, no hay ARN mensajero quimérico, sino que lo que se produce es un aumento de la expresión del gen por acción del promotor de los genes de Ig o TCR. La translocación en estos casos se estudia mediante PCR a partir de ADN genómico. Uno de los inconvenientes del estudio de este tipo de translocaciones, es que cada punto de ruptura en el cromosoma debe ser estudiado con pareja de cebadores distintos.

Ejemplos de translocaciones estudiadas mediante PCR:

TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO

A continuación se describirán de manera somera las diversas técnicas de análisis citogenético y de biología molecular utilizadas para poner de manifiesto las distintas alteraciones. Lógicamente cada una presenta sus ventajas e inconvenientes y debe ser aplicada de manera adecuada y protocolizada en orden a obtener la mayor información posible para el adecuado manejo clínico de la enfermedad.

El análisis citogenético

El cariotipo de bandas G. Es la herramienta más utilizada de las que dispone la citogenética convencional. Este análisis permite la identificación de cada uno de los cromosomas por su patrón de bandas característico tras su tratamiento con tripsina y tinción con Giemsa poniendo de manifiesto cualquier tipo de alteración cromosómica, tanto numérica como estructural, en las metafases de las células neoplásicas (32). Sin embargo, requiere la obtención de células en mitosis y en el caso de algunas de estas neoplasias las células tumorales presentan un índice mitótico escaso. Además su sensibilidad es limitada (se requiere la observación de las metafases una por una) y la resolución es baja (haciendo que alteraciones submicroscópicas pasen desapercibidas).

La citogenética molecular. Estas técnicas se basan en la hibridación de una sonda de ADN monocatenario (marcada con un compuesto fluorescente) sobre su secuencia complementaria en el genoma, bien en la metafase o en el núcleo en interfase. La más importante de todas ellas y de la que derivan las demás es la Hibridación In Situ Fluorescente o FISH (Fluorescente In Situ Hybridisation) (33). La citogenética molecular puede poner de manifiesto cromosomas completos o secuencias específicas de ADN presentes en una o varias copias. Para ello se pueden utilizar sondas de ADN centroméricas (marcan únicamente los centrómeros), de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencias únicas (marcan regiones cromosómicas muy concretas). Frente al cariotipo convencional, el FISH realizado en interfases celulares presenta una mayor sensibilidad (ya que permite el análisis de grandes poblaciones celulares) y elimina la necesidad de obtención de metafases (eliminando la selección que pueda realizarse en el cultivo celular) pero, al igual que los análisis basados en la biología molecular, detecta únicamente la alteración específica que buscamos y no nos suministra información sobre otras alteraciones presentes en el genoma. Por todo ello esta técnica es un complemento adecuado en todas las situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo por disponer de metafases de poca calidad o no haberlas obtenido, o bien cuando éste ha resultado muy complejo y hay varios cromosomas con alteraciones tan complejas que incluso el citogenetista más experimentado es incapaz de resolver.

Para intentar solucionar la falta de información global del FISH se han desarrollado a partir de los años 90 dos nuevas técnicas de análisis, la Hibridación Genómica Comparada o CGH (Comparative Genomic Hybridisation) (34) y el Cariotipo Espectral o SKY (Spectral KarYotyping)(35). La primera de ellas emplea todo el ADN del tumor (es un método de análisis global) y no analiza metafases de éste (obviando la necesidad de células en crecimiento). Esta técnica se basa en la hibridación competitiva sobre cromosomas normales de dos ADNs (tumoral y normal) mezclados en cantidades equimolares y marcados con distintos fluorocromos (verde y rojo respectivamente) y será capaz de poner de manifiesto ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas pero no de detectar reordenaciones o translocaciones equilibradas; sin embargo abre un futuro muy esperanzador en la búsqueda y

caracterización de nuevos oncogenes (en zonas donde se detecten ganancias recurrentes) y genes supresores tumorales (en zonas donde se detecten pérdidas recurrentes) implicados en estos síndromes. Actualmente, la utilización del FISH y la CGH están bastante restringidas a los SLP crónicos, ya que en éstos el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo.

La técnica de SKY es la consecuencia del desarrollo de nuevos fluorocromos y sistemas de análisis de imagen con el objetivo de caracterizar la mayor cantidad de alteraciones posibles en uno o muy pocos pasos. Esta técnica sólo se utiliza, de momento, como investigación debido a su elevado costo y se basa en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos de manera que el espectro de emisión de cada uno de ellos sea único y diferenciable de los demás. El SKY requiere obtener metafases tumorales, pero permite observar cada cromosoma de un color. Por ello, es de gran utilidad en el caso de alteraciones complejas en las que se desconoce el origen del material reordenado, puesto que permite determinarlas de manera inequívoca.

El análisis molecular

La identificación y caracterización molecular de los genes implicados en las translocaciones cromosómicas recurrentes ha permitido la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) para su análisis. Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de manera exponencial del segmento de ADN de interés hasta niveles que puedan ser detectados. La PCR analiza la alteración de manera directa lo que, como en el FISH, implica una importante especificidad y sensibilidad y es particularmente útil en los casos en los que los datos histológicos, inmunofenotípicos o citogenéticos no son concluyentes y, sobre todo, en la determinación de la EMR. Esta técnica se puede aplicar para determinar la clonalidad de la neoplasia (por medio de las reordenaciones de los loci IG o TCR), la translocación cromosómica asociada (mediante la amplificación específica del gen de fusión resultante), o para determinar posibles alteraciones en oncogenes o genes supresores tumorales. Las dos primeras determinaciones son las que generalmente se aplican en la rutina clínica y son útiles tanto en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad como en su monitorización o seguimiento. En la mayor parte de los casos el análisis de mutaciones en oncogenes y supresores tumorales permanece en el campo de la investigación encaminada al conocimiento de los procesos implicados en la leucomogénesis con vistas al desarrollo de futuros tratamientos por lo que, salvo raras excepciones, no se han incorporado a los análisis de rutina.

Los análisis de clonalidad

Debido a que el proceso de transformación maligna es consecuencia de la expansión clonal de una única célula progenitora, cualquier característica que nos permita identificar esa célula estará presente en todas las que deriven de ella permitiendo así el seguimiento de esta población celular. En el caso de las células linfoides esta característica es la secuencia específica que presenta cada una de ellas en los loci IG y TCR (ambos implicados en el desarrollo de los procesos inmunitarios) una vez reordenados. Durante el proceso de maduración linfóide, los loci IG/TCR llevan a cabo un proceso fisiológico de recombinación y mutación que dará lugar a secuencias de ADN específicas para cada célula (Fig. 2). Este proceso es similar en las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de los genes IG y en las cuatro cadenas de los genes TCR (a, b, g, d). La configuración germinal incluiría varias regiones

variables (V) distintas y varias regiones de diversidad (D, sólo aplicables en el caso de los loci IGH, TCRb y TCRd), de unión (J) y constantes (C) (30). Durante el proceso de maduración, una región V se unirá a una D y a una J (Fig. 2) produciéndose, además, fenómenos de mutación somática en las zonas de unión de estos segmentos. Esto da lugar a multitud de combinaciones posibles (base de la diversidad inmunológica), formando secuencias de ADN específicas de cada célula linfoide (una especie de huella identificativa) (Fig. 2). De esta manera, y dado que el proceso tumoral refleja una expansión clonal a partir de una célula progenitora, todas las células tumorales presentarán la misma secuencia a este nivel. Según este esquema, una población linfoide policlonal estaría caracterizada por una población heterogénea en cuanto a sus secuencias V-(D)-J en estos loci y una población monoclonal (a veces, pero no siempre, asociada a un proceso maligno) estaría caracterizada por una homogeneidad manifestada en la existencia de una secuencia predominante (Fig. 2).

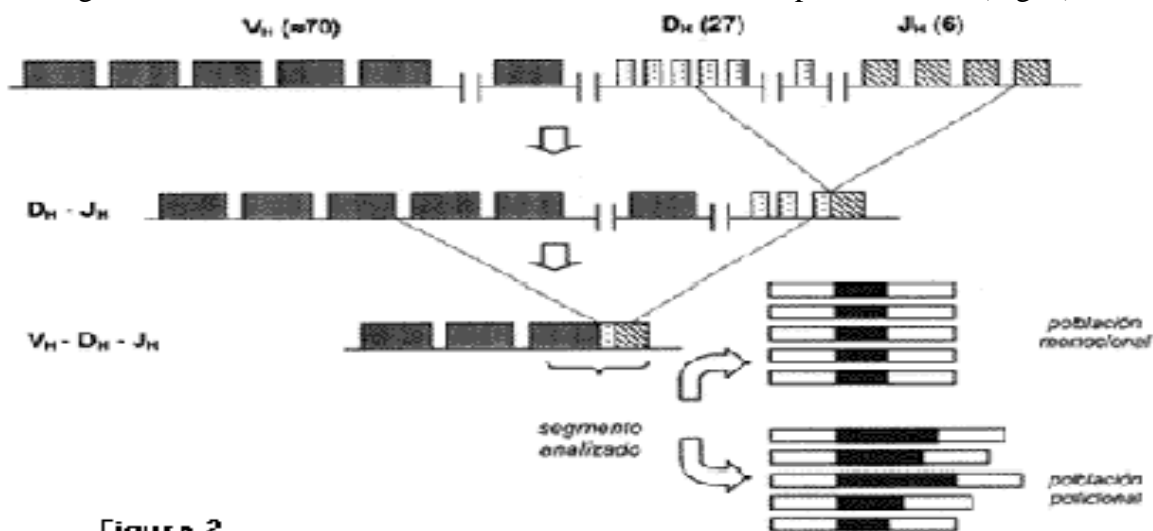


Figura 2.

Ejemplo de la reordenación fisiológica de los diferentes segmentos del locus IGH, siendo V las regiones variables, D de diversidad y J las regiones de unión. Entre corcheteros se muestra el número de segmentos de cada tipo existentes en ese momento. En la recombinación, junto a otros mecanismos como la mutación somática de las regiones de unión (no mostrada), es la base de la diversidad inmunológica de las múltiples combinaciones a las que se pueden dar lugar. Como consecuencia de este proceso la secuencia de ADN formada será única de una población de células y tras el análisis molecular del segmento reordenado se podrá determinar si ésta tiene un origen monoclonal o policlonal.

El conocimiento de la secuencia de ADN del segmento reordenado también puede dar información acerca del linaje y estado madurativo del clon maligno, lo que puede ser de utilidad en la clasificación de la patología. Esto es debido a que, por un lado, el locus IGH estaría reordenado de manera clonal en prácticamente todas las neoplasias de células B y los loci TCR en las neoplasias de células T (el caso inverso es infrecuente, salvo en las neoplasias linfoblásticas inmaduras de células precursoras en las que pueden observarse reordenaciones del otro linaje) y, por otro lado, este proceso es jerárquico en los distintos loci IG/TCR. (36). Por todo ello, el proceso fisiológico de reordenaciones IG/TCR que, en sí mismo, no constituye una anomalía genética, puede ser explotado para la caracterización molecular de este tipo de neoplasias. Desde el punto de vista práctico en la mayoría de las neoplasias linfoides no es necesario realizar este análisis, ya que tanto la morfología como el inmunofenotipo suelen ser suficientes para establecer un diagnóstico. Sin embargo, puede ser

de enorme utilidad en la determinación y monitorización de la EMR, aspecto que se discute más adelante.

El análisis de los reordenamientos cromosómicos

En este caso, el material de partida puede ser ADN tumoral o ARN (total o mensajero) tras su paso a ADN complementario. La utilización de ARN está indicada en aquellas translocaciones en las que están involucrados puntos de rotura dispersos en los genes implicados, lo que hace muy complicado el análisis a partir de ADN genómico, pero que presentan consecuencias similares a nivel de ARN mensajero.

Dada la relativa sencillez de los análisis mediante PCR y la poca muestra requerida, éste ha desplazado en la mayor parte de los casos al Southern-blot de ADN digerido con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas específicas, ya que éste último es un proceso más laborioso y requiere una gran cantidad de muestra. Así, el Southern-blot ha pasado a utilizarse, casi de manera exclusiva, en el análisis de genes muy promiscuos (que se reordenan con un variado número de otros genes) o en el caso en el que los puntos de rotura se encuentren muy dispersos. (36). Sin embargo, en estos casos también está siendo desplazado por el FISH.

Las principales ventajas de PCR (alta sensibilidad y especificidad) y de sus distintas variantes se convierten simultáneamente en sus principales defectos ya que la alta sensibilidad puede llevar a la determinación de alteraciones que se encuentren en una proporción tan baja que realmente no tengan significado patogénico, y la especificidad hace que únicamente seamos capaces de detectar la alteración que busquemos, no suministrando más información. Además, la mayor parte de los análisis mediante PCR son cualitativos, indicando sólo ausencia o presencia de la alteración, y en la monitorización de la respuesta al tratamiento o de la EMR es importante la cuantificación de ésta. (31,37). Para ello se han utilizado varios sistemas (38) que, junto a la aplicación de marcajes fluorescentes, están produciendo una auténtica revolución en este campo. El sistema más importante por su sencillez y posibilidad de estandarización (aunque de elevado costo) es el seguimiento de la amplificación mediante PCR en tiempo real (real-time PCR) (39) en el cual se detecta el producto específico a medida que se produce, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados suministra una medida cuantitativa del grado de afectación.

Otros análisis a nivel molecular

El análisis de mutaciones de genes supresores tumorales y oncogenes permanece en el campo de la investigación (dada la complejidad y costo de su implantación en la rutina diagnóstica) con el objeto de conocer la posible implicación patogénica de estas alteraciones. La aplicación de nuevos sistemas robotizados de gran capacidad de análisis, con indudables ventajas en cuanto a controles de calidad y estandarización de los protocolos mejorará la reproducibilidad de los ensayos y, permitirá la comparación de resultados entre laboratorios facilitando la realización de grandes estudios prospectivos (40). Así, sistemas como los chips o microarrays de ADN, que permiten el análisis simultáneo de un gran número de genes y de sus niveles de expresión en una misma muestra, suministrarán una información de indudable valor para el establecimiento de terapias más adaptadas a la alteración molecular de cada tipo tumoral (terapias genotipo-específicas).(41)

IMPLICACIONES DEL ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS DE ORIGEN LINFOIDE

Las neoplasias de origen linfóide forman un grupo de entidades extremadamente heterogéneo y durante muchos años han sido clasificadas teniendo en cuenta únicamente criterios morfológicos y citoquímicos, tal y como propuso el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1976(42,42). Este grupo clasificó las neoplasias linfoides en LLA, Síndromes Linfoproliferativos Crónicos (SLP) y Linfomas (Hodgkin y no-Hodgkin). En 1994 el Grupo Internacional para el Estudio de los Linfomas propuso la clasificación REAL (Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms) basada en una combinación de los datos morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos, variando entre las distintas entidades la importancia relativa de cada uno de ellos (44). Los principios de la clasificación REAL han tenido un gran impacto al considerar que el diagnóstico debe realizarse desde una aproximación múltiple y que, a pesar de que en algunos casos pueden ser suficientes los datos de morfología, la exactitud del diagnóstico se ve aumentada considerablemente cuando se tienen en cuenta los datos inmunofenotípicos y genéticos. Actualmente, y bajo los auspicios de la OMS, se propone una clasificación basada en los principios establecidos en la clasificación REAL. Basándose en su experiencia, se han propuesto varios cambios que hacen referencia a variaciones en la nomenclatura y subdividiendo categorías demasiado heterogéneas. De esta forma, se reconocerían tres grandes categorías: neoplasias de células B, neoplasias de células T/NK (o agresoras naturales) y la enfermedad de Hodgkin. Las neoplasias de células B y T se clasificarían en linfoblásticas o de células precursoras y periféricas o de células maduras y dentro de ellas la subdivisión se realizaría teniendo en cuenta su presentación clínica principal (45). Es importante destacar que en la clasificación propuesta figuran como factores determinantes de subtipo con valor pronóstico en las neoplasias linfoblásticas de precursores B, la $t(9;22)(q34;q11)$ BCR/ABL, las reordenaciones con implicación de 11q23 (principalmente del gen MLL), la $t(1;19)(q32;p13)$ E2A/PBX1 y la $t(12;21)(p12;q22)$ TEL/AML1; y el establecimiento como importante factor diagnóstico en el linfoma/leucemia de Burkitt de la $t(8;14)(q24;q32)$ y de sus variantes o de las reordenaciones de c-MYC.

Esta clasificación es de especial utilidad en una entidad tan heterogénea como la LLA. La clasificación FAB únicamente establecía los tipos morfológicos LLA-1, LLA-2 y LLA-3, pero la nueva clasificación se basa en las características morfológicas, citoquímicas, inmunofenotípicas y en el grado de maduración y diferenciación de las series celulares B y T y quizá en mayor medida que en el resto de las leucemias, la decisión terapéutica en la LLA viene dada por la determinación inmunofenotípica del linaje afectado, la determinación de la ploidía por medio de la citometría de flujo y la determinación citogenética o molecular de la anormalidad cromosómica recurrente. (40)

Por otra parte, en el caso de las LLC de células B los análisis moleculares realizados del estadio madurativo de las reordenaciones de los loci IG sugieren la existencia de al menos dos grupos con pronósticos distintos (46). En un subgrupo las células leucémicas muestran deleciones cromosómicas en 13q14 y contienen mutaciones somáticas en la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, congruentes con un fenotipo de célula B de memoria y sugiriendo que estas células ya habrían pasado a través del centro germinal. Estos pacientes presentan un pronóstico mejor que las LLC en las que estos genes no están mutados y que muestran generalmente trisomía del cromosoma 12.

INMUNOFENOTIPO

El diagnóstico y tratamiento de leucemias descansa en el reconocimiento de la población celular leucémica y en la determinación de la línea celular maligna y en algunas veces en el estado de maduración, la presencia de blástos leucémicos de mieloperoxidasa, cuerpos de Auer o asociación de monocitos esterasas realmente identificadas en muchos casos de leucemia mieloide aguda (AML). En contraste los blástos leucémicos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) no tienen una morfología única o característica única. Los megacarioblastos malignos solo carecen de definición citológica y características citoquímicas y pueden ser clasificadas inapropiada mente como LLA. Las malignidades linfoides crónicas son semejantes como leucemia linfocítica granular o HTLV-asociada a leucemia, es rara en niños. Esos procesos crónicos pueden ser inicialmente confusos con linfocitosis reactiva o ALL en paciente jóvenes. Porque el pronóstico y tratamiento para ALL, AML y leucemias crónicas difieren marcadamente esto es crucial la documentación del linaje y seguimiento del estado de maduración de la leucemia. En la ausencia de un diagnóstico morfológico similar este es consumado por el uso inmunológico contemporáneo, estructural, análisis molecular. Prueba inmunológica o inmunofenotipo, este es un componente esencial en el diagnóstico, el complemento del resultado morfológico tradicional y los estudios citoquímicos confirman y establecen el linaje celular leucémico, estado de diferenciación y algunas veces la clona. Algunos análisis de citometría de flujo pueden solo proveer información pronostica independiente.

Los tempranos estudios del inmunofenotipo de leucemias fueron corregidos con la producción de anticuerpos policlonales de células hematopoyéticas normales y leucémicas. Los inmunofenotipos tempranos incluían paneles antiseros de linfocitos T inmunoglobulinas de cadenas ligeras y pesadas antígeno común de leucemia linfoblástica aguda (CALLA), antígenos de histocompatibilidad menor (HLA-DR), y la deoxynucleotidil transferasa terminal (TdT). En células T leucémicas y normales fueron identificadas por una única propiedad formación de nidos en forma de rosetas por eritrocitos de carnero. La primera clasificación inmunológica de ALL fue desarrollada con el uso de estas pocas pruebas (tabla 7.1. Clasificación inmunológica y contemporánea de leucemia refleja el desarrollo de anticuerpos monoclonales, el descubrimiento de nuevos fluorocromos blanco, y designación de sensibilidad multiparamétrica de la citometría de flujo.

Varios cientos de anticuerpos monoclonales tienen a designar la diferenciación de las clonas (CD) agrupados por el Workshops Internacionales de antígenos de diferenciación leucocitaria. El grupo de anticuerpos blanco CD (El cual presenta un número de 166) reconocen algunos antígenos celulares, pero no necesariamente el epitope de identidad.

Una variedad de fluorocromos (phycoeritrin (PE), proteína peridinin clorofi II (PerCP), PE-Cyan conjugado y otros). Ahora están disponibles el complemento de repertorio de fluorescein (FITC), rojo Texas y rodamina. Los modernos multiparametros de citometría de flujo son altamente automatizados y hacen la designación del uso de los nuevos fluorocromos, facilitando un análisis simultaneo de esos tras a cinco antígenos de diferenciación celular. ⁽¹¹⁾

El objetivo de la citometría de flujo es que sea un método rápido y cuantificable y que llegue a ser el preferido para ⁽¹⁾ asignación de linaje, ⁽²⁾ caracterización maduracional de la células malignas, ⁽³⁾ detección de la clona, ⁽⁴⁾ heterogeneidad y aspecto aberrante de la población de células malignas, ⁽⁵⁾ cuantificación de células malignas. ⁽⁵⁰⁾

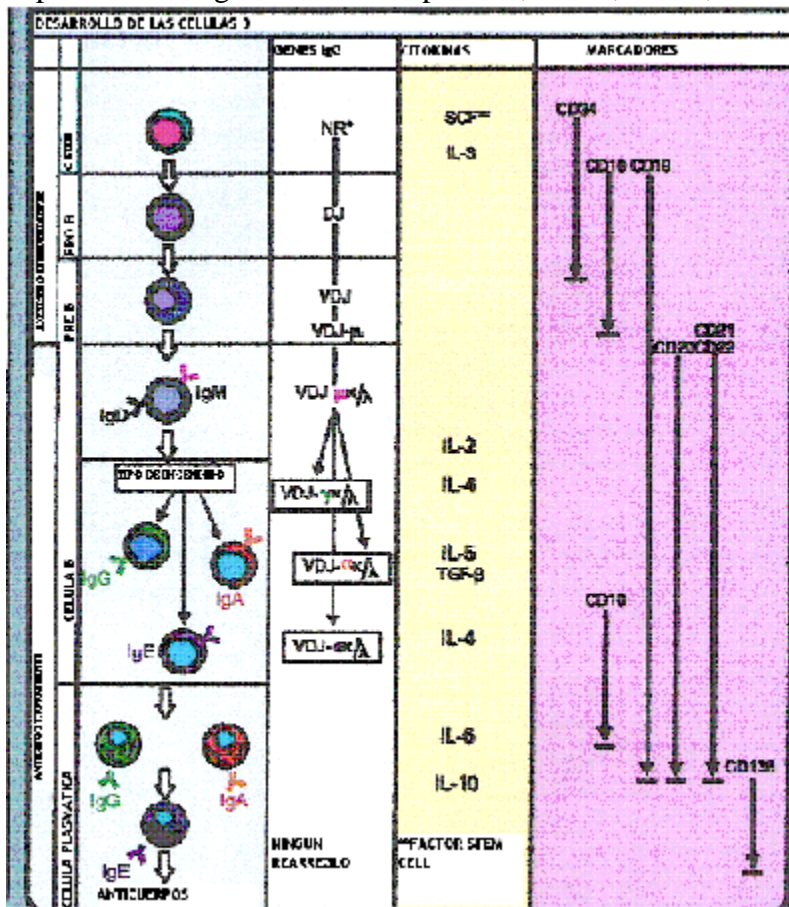
El inmunofenotipo de los tumores hematopoyéticos puede estudiarse de dos formas, ya sea por citometría de flujo o por inmunohistoquímica. Cada una debe ser utilizada en función de los factores asociados al caso en particular del problema, dependiendo de las características de la enfermedad, la distribución de los Ag (nucleares, citoplásmicos o de superficie) y el tipo de muestra disponible para estudio.

Los métodos inmunoquímicos pueden realizarse sobre extensiones citológicas, sobre tejido congelado o sobre bloques de tejido parafinados. Todos ellos son complementarios, cada uno posee sus ventajas e inconvenientes y el lector interesado en ellos debe recurrir a la abundante literatura científica específica disponible al respecto. El enfoque de este apartado de la conferencia se centra sobre una selección de marcadores especialmente útiles en el estudio de síndromes linfoproliferativos sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina, por ser esta la situación más común ante la que se encuentra el patólogo. Cabe señalar aquí que la incorporación de nuevos Ac que funcionan correctamente en parafina, junto al avance en el conocimiento de métodos de desenmascaramiento antigénico, han hecho que los estudios en congelación hayan quedado restringidos a situaciones específicas, pudiendo estudiarse hoy correctamente la mayoría de los síndromes linfoproliferativos y entidades relacionadas sobre tejido procesado de forma rutinaria. Las ventajas de esta situación son una mayor facilidad de manejo y disponibilidad de material, el análisis retrospectivo sobre material de archivo y la mejor conservación arquitectural y citológica de la lesión objeto de estudio.

DESARROLLO DE LINAJE Y EXPRESION DE ANTIGENOS CELULAS B

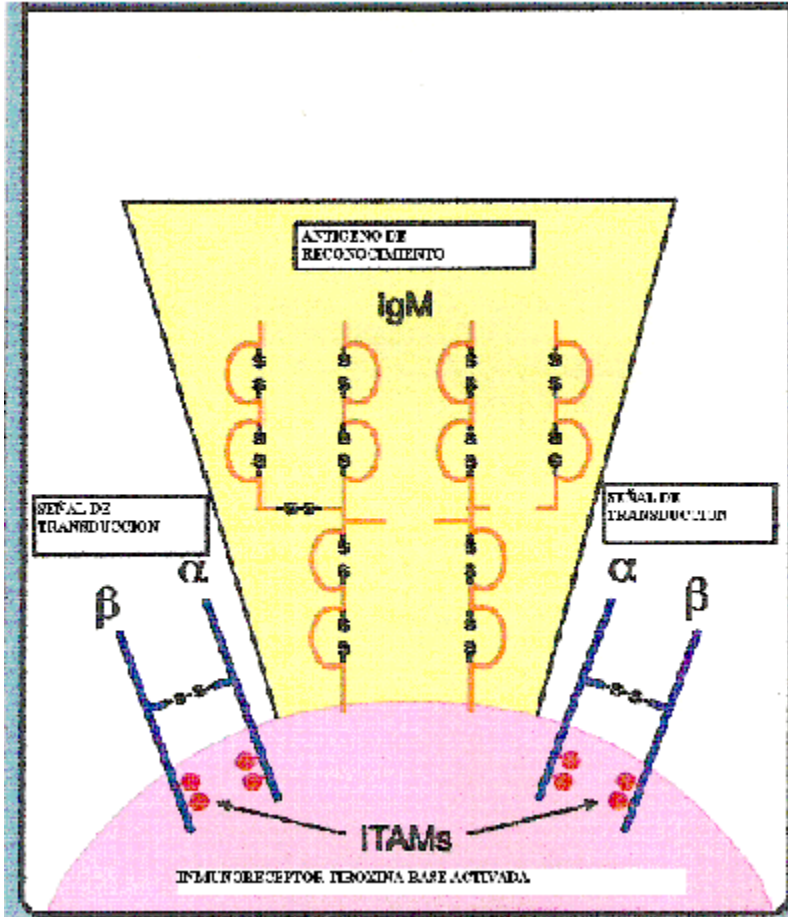
La identificación característica de las células B maduras es la presencia de los antígenos receptores de moléculas compuestas por inmunoglobulinas de dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por uniones disulfuro. Las inmunoglobulinas son heterodímeros complejos de Ig alfa (CD79a) y Ig beta (CD79b) los cuales constituyen transducción- señal elementos receptores de células B. La diferenciación de las células stem de los linfocitos B maduros procede de cuatro pasos que pueden ser identificados por el patrón celular de expresión de inmunoglobulinas. El temprano comprometimiento de las células de médula ósea hacia el desarrollo de linaje B tiene arreglos de diversidad y unión (DJ) de las regiones de cadenas pesadas del gen de las inmunoglobulinas pero no sintetiza proteínas de inmunoglobulinas. La expresión temprana de células pre B en la superficie CD10, CD19, CD24, CD34, HLA-DR y citoplasmático CD22, CD79a, CD79b y el nuclear TdT. ⁽³⁻⁵⁾. La expresión del antígeno común leucocitario, CD45 es inicialmente un pico pero se incrementa con la maduración celular. La reordenación funcional de las inmunoglobulinas del gen de las cadenas pesadas es el comienzo para la aparición de las cadenas u en el citoplasma y promete la diferenciación temprana de las células pre-B al estado pre-B. Los linfocitos jóvenes pre-B son las primeras células que expresan en su superficie CD22 y este es seguido por la aparición del CD20. Durante el estado de maduración de las células pre-B (fase transicional de pre-B) de linfocitos, débilmente expresan en su superficie cadenas pesadas mu pero no cadenas ligeras kappa o lamda ^(11,12). Como en estado pre-B final desaparecen TdT, CD34 y CD10. La expresión de inmunoglobulinas de superficie se acompaña por un incremento en la densidad de CD20 y en algunas células aparece el CD21 el receptor de CD3 y Epstein-Barr virus. Los linfocitos B maduros migran hacia la población de la médula ósea, folículos linfoides y nódulos, bazo, placas de Sálller, y tejido de amígdalas. En este tejido linfoide

secundario el gen de las inmunoglobulinas de cadena pesada de células B pasan por otro rearrreglo resultando en una producción de IgD o en un completo switch de producción de IgG, IgA, o IgE. El switches de las inmunoglobulinas toma un lugar en los folículos linfoides donde se activan antigénicamente a células B proliferando en el centro germinal. ⁽¹⁵⁾ Las células B germinales (centroblastos y centrocitos) comparten algunas similitudes con células pre-B y ambas expresan CD10 y tienen una alta propensión para la apoptosis, esas células no expresan TdT o CD34. Los centrocitos que no se someten a apoptosis forman plasmoblastos que en la médula ósea o regiones medulares de nódulos linfoides donde ellos maduran a células plasmáticas o llegan a ser células de memoria que salen del centro germinal. Las células plasmáticas pueden secretar grandes cantidades de inmunoglobulinas pero no exponer inmunoglobulinas de superficie, CD19, CD20, CD22, o HLA-DR.



Antígenos de diferenciación en la médula ósea.

El desarrollo de las células B maduras depende del contacto con las células stromales, las diferentes células estromales están involucradas en varios estados de diferenciación. Stroma es un término genérico que incluye una variedad de células tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y adipocitos. Las células estromales regulan el desarrollo de las células B en un gran número de pasos: (1) por interacción directa, (2) por formación de la matriz extracelular (colágena y proteoglicanos) con regulación de la migración celular y la unión de factores de crecimiento, (3) por liberación de citocinas.



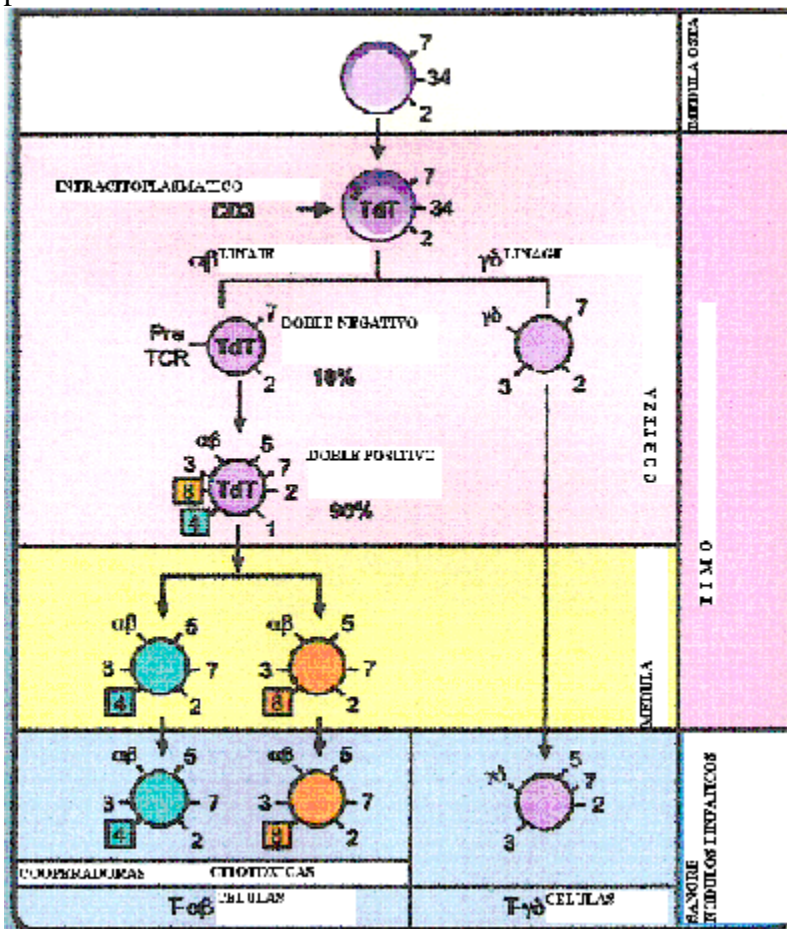
La superficie de la IgM es monomérica y esta consiste de solo una de las cinco subunidades, que hacen de la IgM pentamérica en suero. La IgM consiste de tres dominios: extracelular (similar al monómero de la molécula de IgM del suero), transmembrana (20-25 aminoácidos), y la intracelular (3 aminoácidos). Porque el dominio intracelular de la IgM es de solo 3 aminoácidos largos, esto es incapaz de iniciar una señal de transducción. Esta función es llevada fuera por esta asociación de polipéptidos $Ig\alpha/Ig\beta$ u otra cola citoplasmática larga facilita la interacción con proteínas tiroxina quinasa de la cascada de señalización. Esas interacciones son mediadas por una única secuencia de aminoácido presente en la $Ig\alpha$ y $Ig\beta$ de la cola citoplasmática, ahora como el Inmunoreceptor Tiroxina – base activada o ITAM.

CELULAS T

Algunos estudios indican que los linfocitos T son derivados de las células pluripotenciales de la médula ósea que expresan CD34, CD7, CD33, y posiblemente CD2

El compromiso de las células stem de la médula ósea del linaje de células T toma lugar en el timo implícito la influencia de células stromales del timo. Las células tempranas confirman el desarrollo de las células T se encuentran en la áreas corticales de los lóbulos del timo y son identificados por la expresión de CD34, CD7, CD5, CD2, CD3 citoplasmático y TdT.

Subsecuentemente el receptor β de células T (TCR β) las proteínas de unión sustituyen las cadenas alfa (términos pT α por células pre-T-cell α y este receptor pre-TCR β es transportado a la superficie celular .La expresión de este receptor resulta en la expansión y progresión de las células tempranas T en un estado de timocito común compuesto de CD34/CD7/CD5/CD2/CD4/CD8-células positivas (llamadas células dobles positivas porque de la coexpresión de CD34 y CD8). Estas células dobles positivas pueden solo expresar CD10, CD21 y CD1a. Durante el estado común timocítico, pequeñas cantidades de CD3 en compañía de TCR α y proteínas β (TCR β) o la pérdida común de los proteínas gama y delta, aparecen en la superficie celular (células CD3). Muchas de estas células dobles positivas mueren por apoptosis como resultado de los receptores de TCR, no siendo viable el reconocimiento de antígenos MCH (muerte por selección positiva) Las células positivas sobreviven la selección incrementando su densidad de los receptores en la superficie de CD3 y TCR y cesa la expresión de CD1,Cd10, CD21, TdT y tampoco de CD4 o CD8..Ese estado celular tardío del timo (solo el termino de células positivas porque de la expresión de otros CD4 o CD8) son sujetos a características de selección positiva. La expresión de CD3+, CD4+, o CD3+, CD8+ en las células es exportada del timo hacia la vía del sistema circulatorio al tejido linfoide periférico.^{21-25.}



1.- Doble negativo: poco antes de llegar al timo, las células progenitoras blástos se dividen grandemente encontrándose en la corteza subcapsular. El marcador CD34 y el intracitoplásmico CD3 son característicos de esos progenitores, las células son fuertemente negativas para CD4 y CD8, dos importantes marcadores de linaje T; por esta razón las células en este estado son conocidas como doble negativo, esas células son TdT (deoxynucleotidil transferasa terminal) positivo.

2.- Doble positivo: el segundo estado de diferenciación celular $\gamma\beta$ T está caracterizada por el seguimiento en el cambio fenotípico: pérdida de CD34, la presencia de CD3 con el receptor de células T (TCR) en la superficie de la célula, y la coexpresión de CD4 y CD8 que define a las células como dobles positivas. El marcador CD1 es característico en este estado de diferenciación. Las células ahora cambian en el interior de la corteza donde ellas constituyen el 85% de los timocitos.

LINAJE MIELOIDE Y MONOCITICO

Parecido a los linfocitos T y B el linaje mielocítico y monocítico pueden expresar antígenos comunes. Los mieloblastos expresan tempranamente CD34 y HLA-DR, pero los pierden en el estado promielocítico.²⁶ La expresión del CD123 ocurre en la superficie de los granulocitos comprometidos con células stem de progenitores monocíticos, incrementan en la maduración granulocítica y disminuye con el desarrollo monocítico. La glicoproteína Cd14 es expresada fuertemente en los monocitos y macrófagos pero solo débilmente o no en todas las células monocíticas inmaduras. Algunos neutrófilos pueden producir pequeñas cantidades de CD14. Las moléculas CD15 (complejo de glicoproteínas y glicolípidos tienen un penta sacárido común terminal lacto-N-fucopentosa III o antígeno de Lewis) es inicialmente detectado en promonocitos y mielocitos tempranos, y se incrementa con monocitos y maduración granulocítica. El antígeno CD33 es expresado por las células stem que da un ascenso a colonias hematopoyéticas mixtas con ensayos invitro. La expresión de CD33 disminuye ligeramente con la maduración mielóide pero es claramente en todos los estados de desarrollo monocítico.

Dos moléculas intracelulares, mieloperoxidasa y lactoferrin son marcadores provechosos para asignación de diferenciación mielóide. La mieloperoxidasa es un componente primario de los gránulos azurófilos, la enzima lactoferrin está contenida en los gránulos específicos secundarios. Más tarde los mieloblastos contienen mieloperoxidasa pero no lactoferrin por lo tanto mielocitos, metamielocitos y neutrófilos producen mieloperoxidasa plus lactoferrin.⁽²⁷⁾

LINAJE MEGACARIOCITICO Y ERITROIDE

La expresión de megacariocitos maduros antígenos de plaquetas CD36, CD41, CD42, CD61, y factor VIII.^(28, 29)

Pierden este conocimiento sobre los antígenos de superficie relacionada con los megacarioblastos y de otras células parecidas. El estudio de células megacarioblasticas leucémicas y estudios de células de medula ósea normal soportan un ordenamiento y un incremento en la densidad de los antígenos de plaquetas con maduración megacariocítica.^{(30,}

³¹⁾ Los megacarioblastos jóvenes tienen en su superficie CD4, CD33, CD34, y CD117.^(32,33) La CD41a (complejo de glicoproteína IIb/IIIa) y CD61 (glicoproteína IIIa). Manifestación de

moléculas tempranas en el desarrollo de megacariocitos seguida por la expresión de CD42b (glicoproteína Ib) y CD36 (glicoproteína IV) factor VIII relaciona con la manifestación de proteínas relativamente tarde simultáneamente con el desarrollo de reconocimiento megacariocítico.

Relativamente pocos antígenos de superficie celular en los precursores tempranos de las células eritroides. Muchas descripciones inmunofenotípicas son derivadas de estudios de cultivos de precursores eritroides normales y de líneas celulares leucémicas y pueden reflejar no exactamente en estado invivo. El CD34 solo se expresa por células progenitoras tempranas de eritrocitos. El receptor transferrina (CD71) está presente en todos los estados del desarrollo eritroblástico y en reticulocitos, pero es bajo con la formación de células maduras eritroides de la sangre (RBC). Todos los estados de eritropoyesis nucleada (proeritroblastos y normoblastos ortocromáticos) expresan CD36^(7,8). Glicoforina A (GPA) solo aparece durante el periodo o estado proeritroblasto y gana gradualmente una intensidad en la maduración RBC. El marcador específico de hemoglobina para el linaje eritroide pero no es detectable el estado de maduración de antes del normoblasto ortocromático.⁽¹¹⁾

CLASIFICACION DE LEUCEMIAS AGUDAS MIELOIDES FAB				
FAB	SUBTIPO	MORFOLOGIA	MIFLOPFRONL DABA	MARKADORES DE SUPERFICIE
M0	L. AGUDA MIELOBLASTICA SIN MADURACION	MIELOBLASTOS SIN GRANULACION	-	CD13 CD33 CD34
M1	LAM CON MINIMA MADURACION	MIELOBLASTOS CON ALGUNOS GRANULOS	+/-	CD13 CD33 CD34
M2	LAM CON MADURACION	MIELOBLASTOS PROMIELOCIOS Y CUERPOS DE AUER +/-	++	CD13 CD15 CD33
M3	LEUCEMIA PROMITELOCITICA AGUDA	PROMIELOCIOS CON GRANULOS PROMINENTES CUERPOS DE AUER -	+++	CD13 CD15 CD33
M4	L. MIELOMONOCITICA AGUDA	MIELOBLASTOS, MONOCITOS, PROMIELOCIOS, LOS MONOCITOS.	+	CD11b, CD13 CD14, CD33 CD35
M5	LEUCEMIA AGUDA MONOCITICA	MONOCITOS, PROMIELOCIOS, MONOCITOS.	+/-	CD11b, CD13 CD14, CD66 CD33
M6	ERITROLEUCEMIA AGUDA	ERITROBLASTOS, MIELOBLASTOS	+/-	CD11b CD36
M7	LEUCEMIA MEGACARIOBLASTICA	MEGACARIOBLASTOS	-	CD41 CD61

La LAM se caracteriza por la ausencia en la maduración de la clona maligna, la diferenciación en las células mieloides tempranas. Descripción morfológica y clínica de la asociación Franco Americana y Británica FAB) se muestra en este cuadro. Esta clasificación está basada en

morfología y citoquímica de las células correlacionando tanto como es posible en su contraparte con la maduración normal de las células, la clasificación ha sido amplificada e incluye marcadores de superficie (Antígenos de diferenciación de clona – CD) más comúnmente encontrado en esas células. La mayoría de los casos de LAM no hacen confirmación rígidamente de esas categorías como considerable en la morfología, citoquímica y los marcadores CD. Ciertamente las anomalías cariotípicas, los marcadores CD y la morfología son indicadores pronósticos.

INMUNOGLOBULINAS Y REORDENACION DE GENES RECEPTORES DE CELULAS T.

La habilidad del sistema inmune de reconocer específicamente a millones de diferentes antígenos y epitopes antigénicos está basada en la enorme diversidad de antígenos receptores específicos, que están en la superficie unidas a la membrana inmunoglobulinas (sIg) moléculas de los linfocitos B y de moléculas receptoras de las células T (TCR).

Los antígenos receptores específicos difieren de linfocito a linfocito, pero en concreto en cada linfocito o clona de linfocito expresa aproximadamente 10 a la 5 receptores con identificación específica del antígeno. La extensa diversidad de los receptores antígeno-específico de linfocitos está basada en la reordenación de procesos afectando los genes de IG y TCR.

Los varios tipos de leucemias linfoides, parecen células linfoides normales (precursores). Parecido a las células linfoides normales muchas de las leucemias linfoides y de los linfomas contienen solo contados rearrreglos de genes de Ig y TCR. Porque de ellos de deriva una única célula linfoide transformada maligna, todas las células linfoides malignas tienen rearrreglos de genes IG y TCR con un idéntico destino. Esta información puede ser empleada para valorar la linfoproliferación de la clona. ⁽¹¹⁾

USO DE LA CITOMETRIA

El valor diagnóstico del inmunofenotipo por la citometria de flujo en sangre periférica o de medula ósea es establecida para el seguimiento de las malignidades hematopoyéticas: Leucemias agudas linfoblásticas o mieloides, crisis blasticas en síndromes mieloproliferativos crónicos o en la transformación de síndromes mieloproliferativos con transformación leucémica o enfermedades linfoproliferativas crónicas (células de linaje T, B, y NK). El principio de prueba a prueba está basado en la identificación de un único o múltiples antígenos de membrana superficiales o intracelulares en suspensión simultáneamente con esas células características de light scatter, las células nucleadas son reducidas drásticamente antes del análisis por gradiente de densidad enriquecido con células mononucleares y o procedimiento de lisis de eritrocitos, los antígenos son detectados con un fluorocromo mAbs, más frecuentemente con un fluorocromo fluorescente (IF).

CITOMETRIA DE FLUJO

El objetivo de este estudio es aprovechar los avances para interpretar leucemias agudas por análisis de citometria de flujo combinando el diseño y la intensidad en la expresión del antígeno para llegar a un diagnóstico definitivo. La selección del gating (población) es crucial para aislar las células anormales por que el fenotipo leucémico puede ser determinado en una población lo más pura posible. Muchas de las leucemias involucran el análisis de medula ósea.

El gating de Standard forward (tamaño de las células) y side scatter (complejidad ó en otro termino textura de la célula) no es optimo para la separación de células de medula ósea porque coincidencia entre monocitos, blástos, mielocitos, promielocitos y metamielocitos. Como las células maduras de la medula ósea ellas expresan un incremento en CD45 .esto cuando el CD45 es combinado con side scatter, el cual separa los linajes basado en los constituyentes. La infiltración a la medula ósea de células inmaduras o blástos es más fácilmente reconocida con el argumento de CD45 versus side-scatter mas que el tradicional gating forward side-scatter. La leucemias mieloides agudas (AML). AML es subclasificada tradicionalmente por morfología y citoquímica de acuerdo a la French-American-British (FAB) este criterio fue modificado por el promotor Workshop Instituto Nacional de Cáncer que incorporo los datos inmunofenotípicos .Aunque el principal papel de la citometria de flujo es proveer datos inmunofenotípicos, la morfología celular puede ser examinada por ambos forward side-scatter⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁷⁾ y CD45 –side-scatter. En objetivo de este trabajo es sacar provecho de los diferentes métodos que se encuentran disponibles para una mejor clasificación de una leucemia como pueden ser la morfología, citometria de flujo y las cambios genéticos y estructurales de una célula como lo son las translocaciones cromosomicas por la técnica RTPCR que más adelante se detallara.⁽⁵¹⁾

ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA REALIZAR EL INMUNOFENOTIPO Y CLASIFICAR LAS LEUCEMIAS AGUDAS DE PACIENTES DEL HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD.

Anticuerpos mieloides

CD45, CD34, CD33, Cd117, CD14, CD13

Anticuerpos plaquetarios

CD41

Anticuerpos eritrocitarios

GLICOFORINA A

Anticuerpos intracelulares

cMPO,cCD79a,cCD3

Anticuerpos linfocitarios

cCD2, CD20, CD10, CD19, CD4 FITC / CD8 PE / CD3 PE-CY5

CITOGENETICA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

La hipótesis propuesta por Boveri en 1914 ,de las mutaciones cromosomicas en las células somáticas está asociada con carcinogénesis, tiene una dirección en la apreciación y la contribución de la citogenética aplicada a la investigación del Cáncer(1) .En el presente las evaluaciones citogenéticas son consideradas esenciales para el diagnóstico ,acción , estrategia terapéutica y el monitoreo de muchas neoplasias La identificación de los primeros cambios cromosómicos en el cáncer humano fueron las primeras asociaciones de las enfermedades hematológicas. Recientemente correlaciones similares en tumores sólidos tienen marcadamente un incremento. La identificación de las distintas aberraciones cromosomicas y de otras asociaciones clínico patológicas surgieron durante los 80s principalmente el proyecto de sugerencia para la clasificación de leucemias agudas (el sistema MIC) que está basado en la morfología (M), inmunología (I) y citogenética ©. Las anomalías citogenéticas

específicas en leucemia aguda linfoblástica (ALL) pueden ser relacionadas con el inmunofenotipo con la excepción de la translocación t(8;14) (q24.1;q12-21), y las variantes de ALL L3 ellas no correlacionan con los FAB subtipos de clasificación morfológica, en contraste varias anormalidades cromosómicas (ejemplo t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12-21), inv (16)(p13.1;q22) tienden a ser asociadas con una morfología específica característica de las leucemias mieloides.⁽¹¹⁾

CONSECUENCIA DE LAS ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN EL DESARROLLO DE UN TUMOR

Las anormalidades cromosómicas en el desarrollo del tumor fue investigada proporcionando la intuición de cómo se activan los proto-oncogenes por las anormalidades cromosómicas que son afectados por el desarrollo del tumor. Los resultados indican que la estructura termo molecular y función de las proteínas son creadas por las anormalidades cromosómicas. Por lo tanto tumor-específico la fusión de las proteínas es producto de las translocaciones.⁽⁵²⁾

GENÉTICA MOLECULAR DE UNA LEUCEMIA

El objetivo principal es la investigación del cáncer la identificación de los genes responsables para la génesis y progresión del cáncer.⁽²⁸⁾ El rápido progreso en las técnicas de secuenciación de DNA y los análisis serán indispensables para la relación final de este objetivo, pero la investigación de esos genes es gratamente simplificada si la anomalía genética puede ser visualizada en niveles citogenéticos. Muchos de esos recientes progresos en la investigación de leucemias son posibles por esta razón.

Los extensos estudios citogenéticos en un gran número de pacientes con leucemia es establecer que tienen una fuerte correlación entre la citogenética y el fenotipo clínico de leucemias en particular. En realidad las translocaciones cromosómicas están presentes en muchas de las leucemias humanas y son débilmente usadas para el diagnóstico clínico y pronóstico también. El nivel molecular de la translocación es de un valor especial porque ellas identifican inmediatamente el lugar preciso en el genoma investigando el, gen potencialmente cancerígeno. El punto de rompimiento del cromosoma puede ahora ser clonado y secuenciado eficientemente y los genes referidos pueden ser rápidamente identificados. En varios momentos a lo largo de la información secuencial tiene a definir funciones potenciales de esos genes parecidos al encontrado en algunos factores de transcripción o tiroxina kinasas. Esta clase de información permite rápidamente desarrollar modelos de pruebas para explicar otras potenciales leucomogénesis. En otros momentos los genes son novedosos y no mecanismos leucomogénicos estos aparecen inmediatamente.

Para ambas situaciones el principal cambio es el uso de la información genética y el entendimiento la subsiguiente biología de la leucemia y otro indicio en la intervención racional de la terapéutica. El número de translocaciones clonadas para leucemias humanas o linfomas se ha incrementado drásticamente en los últimos 8 años. Una de las consecuencias de este efecto de clonación es que el tema común de la cantidad de genes afectados por esas translocaciones son el inicio de la manifestación. Muchos esos genes codifican factores de transcripción, lo cual guía a los conceptos de que las leucemias pueden ocurrir por alteraciones en el regulador maestro de proteínas que controlan el desarrollo hematopoyético y la diferenciación programada. Como funciones específicas de esas proteínas son definir, llegando

a ser esto claro que los distintos genes afectados por translocaciones cromosómicas independientes utilizando sus efectos en común en la ruta de señales de transducción.⁽⁵³⁾

EL PAPEL CRÍTICO DE LAS TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS EN LAS LEUCEMIAS HUMANAS

Las translocaciones cromosómicas juegan un papel significativo en la biología molecular de la leucemia. La clonación de genes semejantes como MLL (leucemia de linaje mixto mieloidelinfoide que el punto de rompimiento en la translocación elucidó su función en las células normales y la alteración de sus funciones en las células malignas, contribuyendo a la morfología y el fenotipo en estas enfermedades. Otros genes identificados por clonación en las translocaciones son nuevos que fueron previamente desconocidos en el genoma humano.⁽⁵⁴⁾

La identificación del gen MLL en la banda 11q23 en las translocaciones es importante para la caracterización y el tratamiento de leucemias. Sin embargo el análisis citogenético no siempre encuentra una translocación y en muchos genes compañeros de MLL hacen una detección molecular difícil. Se han desarrollado técnicas por transcripto reversa primera cadena de cDNA con oligonucleótidos contenidos que codifican la secuencia 5' de MLL del punto de rompimiento de la región 5' terminal y exámeros random en la terminación 3', la secuencia de MLL conocida fue adjunta a un compañero de secuencia desconocida. Esto permitió la formación de stem-loop templates con el punto de fusión de un transcripto quimérico en el loop y en el uso de MLL primer en dos sitios PCR. Las pruebas fueron validadas para la detección de transcriptos fusionados conocidos y los transcriptos para el alelo normal de MLL en la línea celular MV4-11. El cDNA de una PCR se usó para la identificación de los transcriptos fusionados en dos casos de tratamiento relacionado con leucemia mieloide aguda donde el cariotipo fue normal y los genes asociados desconocidos. El cDNA de PCR reveló la fusión de MLL con AF-10 en un caso y la fusión de MLL con ELL en el otro caso. Alternativamente el splicing de transcriptos y el monitoreo del gen fue detectado por el método. El cariotipo normal en las leucemias puede contener translocaciones misteriosas de MLL con una variedad de genes compañeros.

GENÉTICA MOLECULAR EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLÁSTICAS

Aunque en muchos de los casos de leucemias agudas linfoblásticas (ALL) no sugieren un reconocimiento en condiciones genéticas predisponentes, esta enfermedad está todavía considerada como que tiene una genética básica. Esto es los cambios somáticos genéticamente adquiridos contribuyen a un principal camino en la patogénesis de ALL y tiene un importante aplicación para el diagnóstico y tratamiento. Las lesiones genéticas adquiridas, restringen la clona leucémica incluye cambios en ambos el número y estructura de los cromosomas en la célula blástica. Las alteraciones estructurales dan como resultado translocaciones recíprocas, inversiones, deleciones, amplificación del gen y mutaciones puntuales. Aunque muchas de estas anomalías son detectables por análisis citogenéticos de rutina otros requieren de técnicas moleculares. La identificación molecular de los genes localizados es el sitio de esa alteración tienen una dirección es la aislamiento y caracterización de numerosos oncogenes y genes supresores de tumor, previendo un indicio valorable en el mecanismo de leucomogénesis.^(4, 7,9)

ACTIVACIÓN DE PROTO-ONCOGENES

El cariotipo estándar puede identificar translocaciones cromosómicas, incluyendo en ambas recurrentes y reordenamientos random, sobre el 50 % de los casos de niños con ALL. Cuando los ensayos moleculares son usados con análisis citogenéticos evidencian una translocación esto aproximadamente sobre el 75% de los casos. Muchas de las translocaciones de ALL seguido interrumpen genes que codifican para factores de transcripción, definidas como proteínas de unión DNA e interactúan con otras proteínas celulares. ^(4,7,9)

Los factores de transcripción pueden ser clasificados por compartir partes estructurales, sugiriendo que los miembros de cada grupo pueden estar involucrados en procesos de regulación similares. En agregación, muchos de estos factores de transcripción involucrados en las leucemias humanas comparten homología con la llave para el desarrollo de esas proteínas. A continuación se muestra en la tabla las translocaciones más frecuentes y los genes afectados.

ANORMALIDAD	FRECUENCIA APROXIMADA %	FENOTIPO ESPECIFICO	BANDA DEL CROMOSOMA/GENES INVOLUCRADOS	
t(1;19)(q23;p13.3)	5-6	Pre-B en el 90% de los casos	1q23/PBX1	19p13.3/E21A
t(9;22)(q34;q11.2)	3-5	Linaje B en el 90 % de los casos	9q34/ABL	22q11.2/BCR
t(4;11)	2	Pre-B tempranas en el 80 % de los casos	4q21/AF4	11q23/MLL (ALL1)
t(1;11)(p32;q23)	<1	Pre-B tempranas	1p32AF1P	11q23 MLL(ALL1)
t(9;11)(p22;q23)	1	Pre-B tempranas	9p22/AF9	11q23/MLL (ALL1)
t(11;19)(q3;p13.3)	1	Pre-B tempranas y Células-T	11q23/ MLL (ALL1)	19p13.3/ENL
t(5;14)(q31;q32)	<1	Eosinofilia	5q31/IL3	14q32/IGH
t(17;19)(q22;p13.3)	<1	Pre-B tempranas	17q22/HLF	19p13.3/E2A
t(12;21)(p13;q22)b	<1	Pre-B tempranas y pre-B	12p13/TEL (ETB6)b	21q22/AML1 (CBFA2)
t(9;12)(q34;p13)	<1	Pre-B tempranas y pre-B	9q34/ABL	13p13/TEL(ETV6)
del(6q)	4-13	Linaje no específico	desconocido	No aplicable
T(9p;V) y del(9p)	7-12	Linaje no específico	9p22/p16(MTS1) p15(MTS2) y p19ARF	Variable o no aplicable
t(11q23 ;V) y del(11q)	3-5	Linaje no específico	11q23/MLL (ALL1)	Variable o no aplicable
t(12p13 ;V) y (12P)	10-12	Linaje no específico	12p13/TEL (ETV6)b	Variable o no aplicable
t(8 ;14)(q24 ;1 ;q32)	3	Células B en el 90 % de los casos	8q24.1/MYC	14q32/IGH

t(2;8)(p12;q24.1)	<1	Células B del 4-5 % de los casos	2p12/IGK	8q24.1/MYC
t(8;22)(q24.1;q11.2)	<1	Células B del 6-10 % de los casos	8q24.1/MYC	22q11.2/IGL
t(11;14)(p13;q11.2)	1	Células-T (7 % de los casos)	11p13/RBTN2(TTG2)	14q11.2/TCRA/D
t(11;14)(p15;q11.2)	<1	Células-T (1 % de los casos)	11p15/RBTN1(TTG1)	14q11.2/TCRA/D
t(10;14)(q24;q11.2)	1	Células-T (5-14 % de los casos)	10q24/HOX11	14q11.2/TCRA/D
t(8;14)(q24.1;q11.2)	<1	Células-T (2 % de los casos)	8q24.1/MYC	14q11.2/TCRA/D
t(1;14)(p32-p34;q11.2)	<1	Células-T (3 % de los casos)	1p32-p34/TAL1 (TCL5/SCL)c	14q11.2/TCRA/D
t(1;14)(p34;q11.2)inv(14)(q11.2q32)	<1	Células-T	1p34/LCK	14q11.2/TCRA/D
inv(14)(q11.2q32) y t(14;14)(q11.2;q32)	<1	Células-T	14q11.2/TCRA/D	14q32/IGH
t(1;3)(p32-p34;p21)	<1	Células-T	1p32-p34/TAL1 (TCL5/SCL)c	3p21/TCTA
t(1;7)(p32;q43-35)	<1	Células-T	1p32-p34/TAL1 (TCL5/SCL)c	7q34-35/TCRB
t(1;7)(p34;q43-35)	<1	Células-T	1p34/LCK	7q34-35/TCRB
t(7;9)(q34-35;q34)	<1	Células-T	7q34-35/TCRB	9q34/TAN1
t(7;9)(q34-35;q32)	<1	Células-T	7q34-35/TCRB	9q32/TAL1
t(7;10)(q34-35;q24)	<1	Células-T	7q34-35/TCRB	10q24/HOX111
t(7;11)(q34-35;p13)	<1	Células-T	7q34-35/TCRB	11p13/RBTN2(TTG2)
Inv(7)(p15q34-35)	<1	Células-T	7p15/TCRG	7q34-35/TCRB
t(7;19)(q34-35;p13)	<1	Células-T	7q34-35/TCRB	19p13/LYL1

Abreviación: V, cromosoma variable.

a los porcentajes están determinados solo por el fenotipo el cual determinado por una anomalía que se sabe tiene una alta frecuencia.

Los rearrreglos del gen bTEL (ETV6). (Confirmados por Southern blotting) y la fusión de transcritos crítica de t(12;21) (identificados por RT-PCR) ocurre en un 16-25 % de los niños con ALL de linaje B.

Las deleciones microscópicas en TAL1 y ocurre de un 9-26 % en niños con leucemia LLA de células-T.

ONCOGENES QUIMERICOS t(9;22)

La primera fusión de un gen descrita en ALL fue BCR-ABL creada por la translocación t(9;22)(q34;q11) algunas veces referido como cromosoma Philadelphia (Ph). Se tienen estudios citogenéticos que demostraron que el cromosoma Ph está presente en el 95 % de los casos de leucemias mielógenas crónicas (CML), 25% de los casos de ALL en adulto, y del 3 al 5 % en pacientes pediátricos con ALL. En ambas CML y ALL la t (9; 22) de la secuencia 5' de BCR a 3' de la secuencia de ABL. (11,16). El punto de rompimiento del cromosoma 9 está disperso cerca de las 200 kilobases (kb) región blanco del primer intrón de ABL, mientras que el punto de rompimiento de BCR en el cromosoma 22 es un grupo de dos áreas : el principal punto de rompimiento a 5.8-kb de la región (M-bcr) en CML y el punto de rompimiento menor se encuentra en la región (m-bcr) en muchos de los casos de ALL con Ph positivo en niños.(17,21)Ph-positivo en el caso de ALL en adultos contienen puntos de rompimiento en M-bcr o m-bcr. Los genes fusionados creados por la ruptura en M-bcr (tipo de rompimiento CML) codifica a 210-kilodalton (kDa) proteína fusionada (p210), mientras que la fusión ocurre en m-bcr (tipo de rompimiento ALL), la proteína codificada a 190-kDa (p190). (22,24) libro pagina 197, 198,199. ⁽¹⁷⁾

EL CROMOSOMA PHILADELPHIA

El cromosoma Ph se encuentra localizado en el cromosoma 22 y es el resultado de una translocación recíproca, t(9;22)/q34;q11) entre el brazo largo del cromosoma 9 y 22 .este es el sello de CML y se encuentra en el 95% de los pacientes. Y solo se encuentra en el 5% en el caso de niños y de 15 a 30% en adultos con leucemia linfoblástica aguda y en el 2 % de los pacientes recién diagnosticados de LAM. En la translocación del Ph se suma el segmento 3' del gen ABL del cromosoma 9q34 a la parte 5' del gen BCR en el cromosoma 22q11, creando un gen híbrido BCR-ABL gen que transcribe un RNAm quimérico BCR-ABL. El gen ABL codifica a un no receptor de tiroxina kinasa con un peso de 145kd (P145ABL) este tiene 11 exones y se extiende sobre 230 kilobases (kb). El punto de rompimiento del gen ABL ocurre normalmente en la parte 5' (hacia el centrómero) del exon 2 de ABL. Del exon 2 al 11 de ABL (solo llamado del 2 al 11) son transportados al a la región del punto de rompimiento principal (MBCR) del gen BCR del cromosoma 22 entre los exones 11 y 16 (solo referidos como b1 a b5) los cuales se extienden sobre las 5.8 kb. El punto de rompimiento localizado de BCR tampoco cae en 5' entre los exones b2 y b3 o 3' (sobre el telómero) entre los exones b3 y b4. La fusión del gen BCR-ABL con b2a2 o b3a3 son creados juntos y transcritos a 8.5kb del mRNA. La fusión del mRNA es trasladado a una proteína quimérica de 210 kb llamada p210 BCR-ABL, en muchos de los casos las células CML tampoco tienen transcritos b2a2 o b3a2, pero en el 5% de los casos, los eventos del splicing alternativo siguen la expresión de ambos productos. La característica clínica, responde al tratamiento, y el pronóstico es similar al de pacientes con transcritos b2a2 t estos con transcritos b3a2 excepto por conteo alto de plaquetas en pacientes con transcritos b3a2.

En el 50% de los adultos y en el 80 % de los niños con Ph positivo en leucemia aguda linfoblástica y en raros casos de CML, el punto de rompimiento en el cromosoma 22 cae en 5' del M-bcr dentro del segmento llamado la región menor del punto de rompimiento (m-bcr). El splicing sale del exon e1' y e2' formando transcritos BCR-ABL que son trasladados en pequeños proteínas fusionadas BCR-ABL de 190kd, término p190BCR-ABL. Un tercer punto de rompimiento se localiza en el gen BCR que es identificado como la región 3' de M-bcr entre los exones e19 y e20 (el mu-bcr); este traslado en la fusión del transcrito junto con el e19a2. El producto trasladado es una proteína de 230 kd término p230 BCR-ABL.

La expresión de 190BCR-ABL puede ser asociada con monocitosis y la expresión de p230 BCR-ABL puede ser asociada con leucemia neutrofilica crónica y la variante con trombocitosis.

La evidencia del papel de transcritos de BCR-ABL como mediadores centrales de la proliferación mieloides y transformación en CML con modelos para experimentos in vivo in vitro para el desarrollo del tumor. (56, 57).

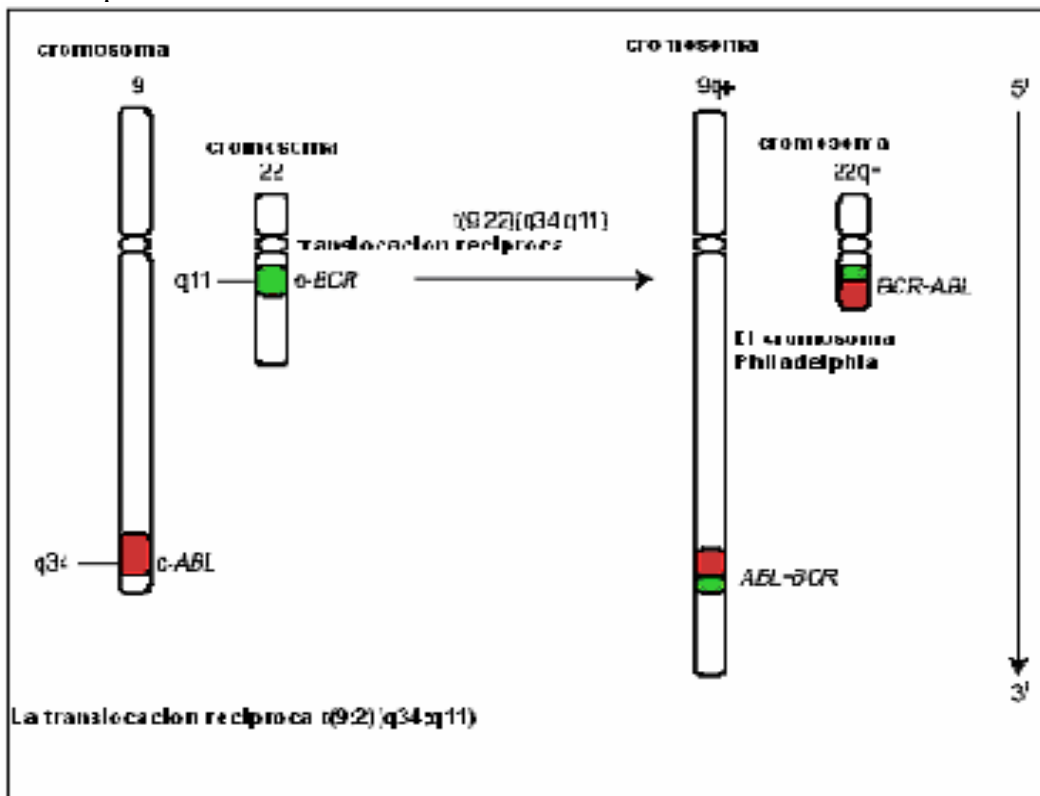
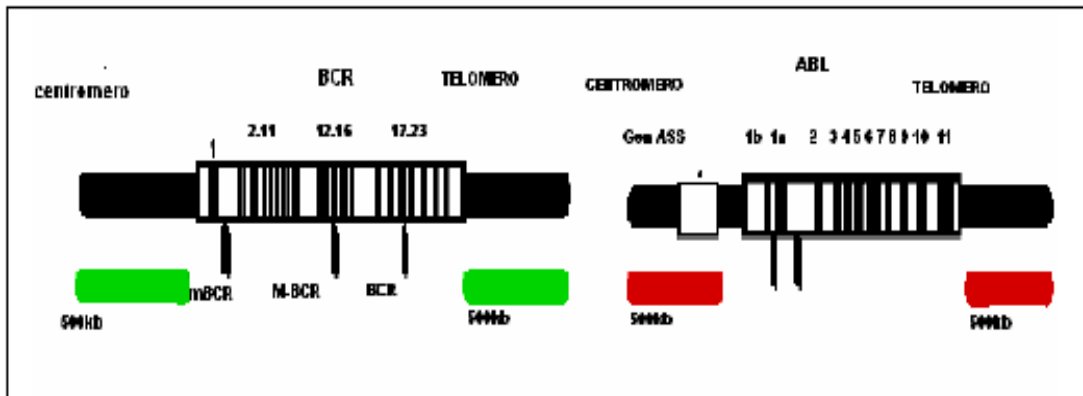


Figura 2. La translocación recíproca (9;22)(q34;q11). Los cromosomas normales 9 y 22 llevan los genes c-ABL y c-BCR respectivamente. El resultado de la translocación es la formación de un cromosoma como 22 (el cromosoma Philadelphia) creándose un gen híbrido BCR-ABL. En consecuencia el resultado de la translocación es un cromosoma 9 largo que lleva el gen híbrido ABL-BCR. La proteína llamada BCR-ABL constituye la actividad tyrosine kinasa en contraste eso no es evidencia de que la proteína Abl-BCR es producida.

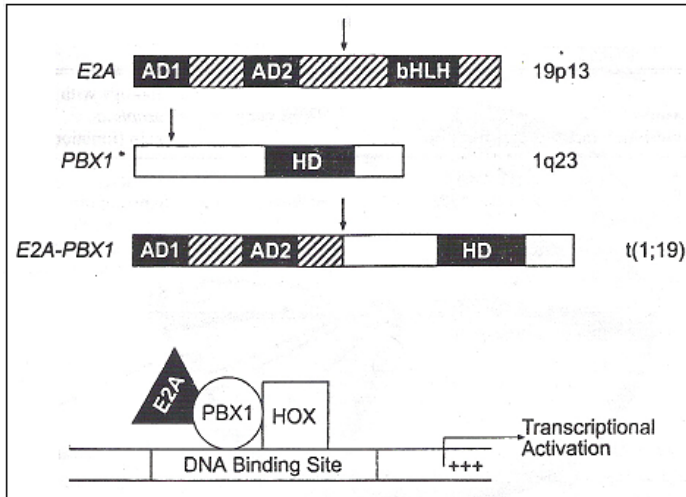


GEN E2A-PBX1 TRANSLOCACION t(1; 19)

La traslocación cromosómica t(1; 19) es creada por la fusión de una proteína nombrada E2A/PBX1. Esta proteína es detectada en el 25% de los casos en niños con LLA pre-B y solo se han reportado en el presente en algunos casos en adultos con ALL.

En las células B normales el gen E2A codifica tres diferentes factores de transcripción E12, E47, y ITF-1/E-25 los cuales se derivan de un splicing alternativo del transcrito E2A. Esas proteínas pertenecen a la familia básica helix-loop-helix (bHLH) de factores de transcripción. Estas tienden a mostrar que esta familia de proteínas forman homo y heterodímeros por interacción aunque su motivo respectivo es bHLH. Esos complejos dimericos forman transcritos tejido-especifico que regulan factores involucrados en varias rutas de desarrollo. PBX1 es la otra cabeza, el gen homeobox pertenece a la familia y los miembros son PBX1, PBX2, y PBX3. PBX1 se expresa en todos los tejidos excepto en células de linaje B y T. El hemodominio de pbx1 unido a la secuencia ATCAATCAA. Ahí hay un alto grado de secuencia homologa entre el hemodominio de pbx1 y el represor de levaduras $\alpha 2$. En agregación pbx1 y la proteína Exd del hemodominio de Drosophila son cerradamente relacionadas. Por lo tanto esto tiende a sugerir que pbx1 puede funcionar como un transcrito regulador con interacciones directas a otras proteínas hemodinámicas. La fusión de la proteína E2A/pbx1 consiste de una porción N-terminal de 483 aminoácidos derivados de E2A fusionando con 342 o 259 aminoácidos para el C-terminal de pbx1. El motivo de bHLH incluyéndole dominio de unión de DNA del E2A está dañado como resultado de la fusión, pero el dominio de activación de E2A está retenido en la fusión de proteína. Se sabe poco de los mecanismos oncogénicos conferidos a la proteína quimérica E2A/pbx1. Esto demuestra que el gen reportado construye el contenido de pbx1 región hemodinámica que contiene el motivo de unión al DNA esta transcrito por E2A/pbx1 pero no solo por pbx1. Esta dirección postula que la activación incorrecta espacialmente y temporalmente de pbx1 a los que contribuyen los genes responsables del fenotipo de ALL pre-B. Sin embargo en estudios con ratones transgenicos muestran que la región E2A es esencial y que el hemodominio pbx1 es indispensable para el desarrollo de linfomas malignos. Este encuentro sugiere que la fuerte oncogénesis puede ser causada por la interacción entre las proteínas celulares y E2A/pbx1 iniciando interacciones de hemodominio DNA. Los paciente leucémicos que traen la translocacion t(1;19) y que expresan la proteína fusionada E2A/pbx1 son asociadas con un peor diagnostico. Esto no demuestra como la anomalía genética confiere semejante

agresividad. Sobre el 85% de los pacientes con ALL con t(1;19) expresan transcritos E2A/pbx1 exhibiendo algunos puntos de rompimiento. Anticuerpos monoclonales específicos (MoAbs) formados para el nuevo epítopo por la unión de la región de E2A/pbx1 la fuerte proteína quimérica puede ser clínicamente valorable también para su diagnóstico por la delineación de los mecanismos involucrados en la oncogénesis y la agresividad asociada con el peor pronóstico. A continuación se muestra en el diagrama. ^(11, 58, 59,60, 61, 128, 129, 130, 131)



La fusión de E2A-PBX1. El gen E2A, se localiza en el cromosoma 19 y codifica a una proteína que contiene 2 dominios N terminal transactivados AD1 y AD2 y contiene un C terminal helix-loop-helix y una región básica del dominio de DNA-binding (bHLH). PBX está localizado en el cromosoma 1 codifica a una proteína con un dominio homeobox DNA-binding (HD). La t(1;19) es creada por la fusión E2A-PBX1 conteniendo los dominios de transactivación producidos de E2A y la homeodomain de PBX. Los puntos de rompimiento se indican arriba en el dibujo. E2A-PBX1 unen al DNA en cooperación con otra proteína HOX que activan la transcripción de los genes blanco.

GEN E2A-HLF t (17; 19)

En raros casos de ALL la t (17; 19) (q22; p13) fusiona la terminación amino terminal dominio tras activacional de E2A al del carboxilo terminal DNA-unido y el dominio dimerizante de la base leucina transcripción cerrada de factor HLF. HLF el cual es normalmente expresado en el hígado pero no en el las células linfoides llevando homología con DPB, gen promotor de albúmina D-box-proteína de unión, y TEF, la cual transactiva el gen de expresión de la hormona tiroides-estimulada. (83,87) libro. E2A-HLF une la secuencia específica de DNA y transforma NIH-3T3 en cultivo de fibroblastos. Aunque E2A-HLF puede unir el DNA tampoco como un heterodimero o como un heterodimero con HLF y proteínas relacionadas, una mutación E2A-HLF palpable solo de la hemodimerización de las células transformadas también como un tipo silvestre de E2A-HLF. La transformación leucémica requiere de ambos dominios transactivados de E2A y de la leucina zipper del dominio dimerizado de HLF, sugiriendo que la proteína quimérica, actuando como un heterodimero, juega un papel en la leucomogénesis por una regulación aberrante de los genes blanco que controlan la fase temprana de los progenitores linfoides.

APOPTOSIS REVERSA POR LA ASOCIACION DE LEUCEMIA CON FACTOR QUIMERICICO DE TRANSCRIPCION E2A-HLF

El gen fusionado de E2A-HLF, formado por la acción de la translocación cromosómica t (17; 19) maneja la transformación leucémica de los precursores temprano de células B pero el mecanismo de esta actividad desconoce el resto. En este Art. Se reporta que las células leucémicas humanas llevan la translocación t (17;19) rápidamente a la muerte por apoptosis cuando programaron la expresión de un dominio negativo supresor de la proteína fusionada E2A-HLF, indicando que la oncoproteína quimérica probablemente afecta ligeramente la vida celular más que el crecimiento celular. Por otra parte cuando se introduce al interior murina a linfocitos pro-B, la fusión oncogénica de la proteína reversa E2A-HLF une la interleucina 3 dependiente y p53 mediador de apoptosis. La cerrada homología de la región básica leucina zipper (bzip) DNA-unión y dimerización del dominio de HLF para que el CES-2 proteína específica de muerte celular de *Caenorhabditis elegans* sugieren un modelo de leucomogénesis en el cual el block E2A-HLF es un paso temprano dentro de una célula conservada evolucionadamente en el camino a la muerte. (62)

Este resultado también como la homología entre HLF y CES-2 a *C. elegans* proteína que regula la muerte programada de las células específicas en el nematodo sugieren que E2A-HLF interfieren con el camino normal de la apoptosis en los linfocitos pro-B. Porque esto es raro el significado clínico de la translocación t (17; 19) es desconocido. De siete pacientes quienes expresaban en sus blástos E2A-HLF, cada uno tubo una muerte por leucemia a pesar de la terapia agresiva, sugiriendo que la que la quimioterapia en esos casos puede ser mediada por E2A-HLF inhiben la apoptosis. ⁽¹¹⁾

UNA RTPCR DETECTA mRNA CON ANORMALIDADES HETEROGENEAS QUIMERICAS EN LEUCEMICAS CON 11q23.

Leucemias con la translocación 11q23 son clínicamente únicas siendo común en infantes de un año de edad y demostraron una característica bifenotípica o linaje mixto. Citogenéticamente más de 10 loci del cromosoma son encontrados y son involucrados en la translocación 11q23 como cromosomas compañeros. En la leucemia infantil, t (4; 11) (q21; q23) y t (11; 19) (q23; p13) se observan frecuentemente asociadas especialmente con leucemia linfoblástica aguda (ALL). Leucemias agudas con t (9;11)(p22;q23) tienen características monocíticas y algunas de las translocaciones comunes reportadas solo son encontradas en leucemias secundarias ligadas a tratamiento con inhibidores de topoisomerasas II de DNA, tales como etoposide y teniposide.

Recientemente los genes involucrados en la translocación 11q23 pueden ser clonados y caracterizados. Uno de esos, MLL (varios llamados ALL-1, HRX, o HTRX), codifican un polipéptido de 3,963 aminoácidos homólogos a *Drosophila trithorax*, conteniendo dos supuestos DNA-unión, el motivo consiste de tres motivos AT-hook y dos diversos dominios de dedos de zinc. Casi todos los puntos de rompimiento en las leucemias con translocación 11q23 permanecen en una región del gen MLL. Pero esta translocación de dos supuestos motivos DNA-unión son alterados y el gen MLL esta fusionado en el cromosoma compañero semejante como LTG4 (FEL/AF-4) LTG9 (AF-9) o LTG19 (ENL), resultando en la fusión de un mRNA codificando proteínas quiméricas.

En este estudio se analizo la fusión de los puntos, de 7 muestras con t (4; 11) 8 muestras con t (9;11), 9 muestras con t (11;19), una muestra con la t(11)(q23) por RTPCR. Art. 63

Las translocaciones comprometidas HRX se están viendo en la mayoría de los casos de leucemias agudas linfoblásticas (ALL) y el tratamiento induce una leucemia mielógena aguda secundaria (AML).

La translocación t(11;19)(q23;p13.1) juega un papel importante en la patogénesis de la leucemia mieloide en paciente de edad. Art.65

El gen MLL está fusionado a ENL ó ELL en las leucemias agudas que contienen t(11;19)(q23;p13). Aunque ENL y ELL está localizada en el cromosoma 19, banda p13.1, respectivamente, esos puntos de rompimiento no siempre son distinguidos por citogenética standart por lo tanto se debe usar RTPCR. ⁽⁶⁶⁾

TEL-AML1 t(12;21)

Hace 25 años el pronóstico de leucemia linfoblástica aguda en niños (ALL) era muy pobre y muchos de estos sobrevivían solo 2 ó 3 meses después del diagnóstico. Con los protocolos de quimioterapia actuales, más del 90% de los niños con ALL en curso de remisión completa (CR) lo principal de esto será que están libre de enfermedad (continua en remisión completa, (CCR) durante mucho tiempo.

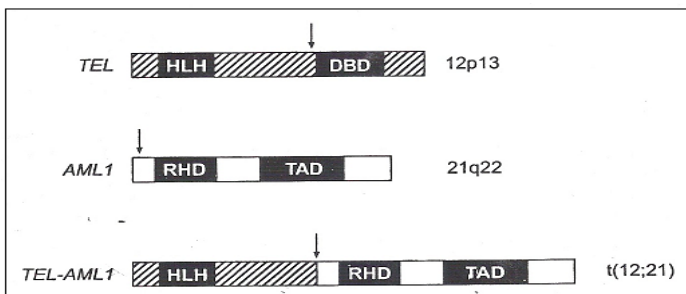
En el futuro se incrementa el rango de cura y se reduce la toxicidad innecesaria, han sido hechos para identificar los efectos biológicos y clínicos y las características pronosticas del significado diagnóstico. Las anomalías citogenéticas de las células leucémicas ayudan a identificar a los pacientes con definición clínica y respuesta terapéutica. Las Hiperploidias (> 50 cromosomas) identificadas subsecuentemente con ALL de linaje B con pronóstico favorable. Por contraste la presencia de translocaciones t(9;9) y t(4;11) tienen un peor pronóstico. Recientemente la translocación t(12;21) fue considerada para ser de valor pronostico limitado durante su rara aparición, apenas empieza a detectarse en un 0.05% de los pacientes. Los intentos iniciales para identificar la translocación t(9;21) por la técnica de FISH indicaron que su prevalencia es grandemente indeterminada. El gen TEL1 del cromosoma 12p13 y el gen AML1 del cromosoma 21q22 revisados por Nucifora y Rowley recientemente han sido mostrados por estar involucrados en la translocación t(12;21) por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de esta manera se han llegado a identificar las translocaciones. La fusión de esta proteína se encuentra en los primeros 336 aminoácidos de ets factor terminado TEL (translocación ets, leucemia solo ahora como ETV6) unido a 21 residuos de 480 aminoácidos de AML-1B. La translocación suprime el dominio de unión-DNA de TEL pero mantiene el AML-1 de dominio homólogo (RHD; el DNA-unión). Ligado a la translocación de proteínas del contenido-RHD, TEL/AML-1B interfiere con transcripción dependiente de AML-1B. TEL/AML-1B solo inhibe la translocación basal para un promotor constructor contenido en el receptor de células T (TCR). Un segundo determinante en el principal de los casos contiene TEL/AML-1B en este otro alelo de TEL es suprimido. Este TEL es solo un punto supresor en el tumor quienes pueden perder su cooperación con la t(12;21) induce a leucemia. ^(135,136, 137)

Uno de los más recientes desarrollos en ALL es la identificación de TEL-AML1 como la más común alteración genética en estas enfermedades. La fusión de TEL-AML1 está creada por la t(12;21) translocación detectada por cariotipo estándar en menos del 0.05% en los casos de ALL. Sin embargo las técnicas moleculares tienen a demostrar la fusión de los genes TEL-AML1 en aproximadamente uno de cuatro niños con ALL. El resultado de la fusión es una proteína quimérica helix-loop-helix (HLH) dominio de TEL es un miembro de la familia

ligada a factores de transcripción y de la unión de DNA y dominios de transactivación de AML-1. Interesantemente los dominios más tarde muestran homología con el Runt- pair-rule de *Drosophila*. Ambos TEL y AML1 son involucrados en una gran variedad de leucemias asociadas a translocaciones. TEL originalmente fue clonado como TEL/plaquetas-derivadas, receptores de factor de crecimiento Beta (PDGFR α) debido a la fusión de t (5; 12) en leucemia mielocítica crónica. AML1 es el DNA unión componente del AML1/CBF α complejo de factor de transcripción, el cual es el blanco más frecuente asociadas a las translocaciones mieloides, incluyendo la t (8; 21), t (3; 21) y la inv. 16. ⁽¹¹⁾

Recientemente se identifico la translocacion t (12; 21)(p12; q22) en pacientes con leucemia aguda linfoblástica en células de linaje B (ALL), este rearrreglo es detectable en un clásico punto de rompimiento AML1. ^(67, 68)

La proteína fusionada de TEL-AML1 es expresada en la translocacion t (12; 21) (p13; q22) en el 25% de pacientes pediátricos entre los 1 y 5 años de edad y en 3% de Pacientes adultos en los casos con ALL de células B. TEL es un factor de transcripción de la familia Ets con terminación COOH, dominio de unión DNA. En TEL-AML1 la mayoría de TEL con la excepción de este dominio DNA unión, es posicionada en NH2 –terminal de AML1. La unión TEL-AML1 de elementos AML1 cis DNA y representa genes ligados a reporteros. El gen AML1 en el mismo punto de mutación en el AML1 dominio de unión DNA en 5% de AML, y los genes que codifican AML1 o sus compañeros de dimerización, CBF, son involucrados en varias otras anormalidades cromosomicas en agregación el 20% de los casos de AML. La mutación del gen AML1 y la expresión de AML1-ETO, CBF-SMMHC, o TEL-AML1 aparentemente las proteínas fusionadas tienen una común habilidad que es la inhibición de AML1 endógena. A continuación se muestra en el diagrama). ⁽⁶⁹⁾



La fusión de TEL-AML1. TEL está localizado en el cromosoma 12, codifica a una proteína que contiene un hemodominio helix-loop-helix (HLH) y DNA-binding (DBD). AML1 se localiza en el cromosoma 21, codifica a una proteína que contiene un dominio homólogo (RHD) y un dominio transactivacional (TAD). La t(12;21) producto de la fusión de la porción 5' de TEL y de AML1, el punto de rompimiento se indica en el dibujo de arriba.

ATIVACION DE OTROS GENES EN ALL DE CELULAS T Y CELULAS B

Los genes de factores de transcripción no solo son blancos movilizados para translocaciones en los sitios de genes receptores de inmunoglobulina en células T. Un distinto pero raro suceso de ALL es caracterizado por un inmunofenotipo temprano en células B, hipereosinofilia y la translocacion t(5;14). La fusión más tarde del gen de inmunoglobulinas de cadena pesada al gen promotor de IL-3 causando una sobre expresión de IL-3. Se cree que este efecto facilita y

estimula el crecimiento de una señal en las células leucémicas a través de un lazo autocrino. En leucemias de células T, el gen TAN1 los cuales comparten homología con el gen de *Drosophila notch*, pasa por una expresión desregulada seguido a esto una recolocación al locus de TCRB como resultado de la tras locación t(7;9). Simultáneamente la recolocación del locus de TCRB activan la expresión de un gen de tiroxina kinasa LCK en los casos de ALL de células T con la t(1;7).⁽¹¹⁾

TRANSLOCACIONES EN LEUCEMIAS MIELOIDES

A continuación se muestra una tabla con las translocaciones más frecuentes y los genes afectados en las LAM.

Anormalidades cromosómicas que ocurren en LAM, se muestran en la siguiente tabla.

ANORMALIDAD	FRECUENCIA APROXIMADA EN %	SUBTIPO FAB	BANDA CROMOSOMA/GENES INVOLUCRADOS	
t(8;21)(q22;q22)	14	M2, M1	8q22/ <i>ETO</i>	21q22/ <i>CBFA2</i> ^(AML1)
inv(16)(p13.1q22) and t(16;16)	10	M4Eo	16p13.1/ <i>MYH11</i>	16q22/ <i>CBFB</i>
t(9;11)(p22;q23)	7	M4, M5	9p22/ <i>AF9</i>	11q23/ <i>MLL</i> (ALL1)
t(15;17)(q22;q12-21)	8	M3	15q22/ <i>PML</i>	17q12-21/ <i>RARA</i>
t(5;17)(q34;q12-21)	<1	M3, variant	5q34/ <i>NPM</i>	17q12-21/ <i>RAR#</i>
t(11;17)(q23;q21)	<1	M3, variant	11q23/ <i>PLZF</i>	17q12-21/ <i>RARA</i>
t(11;17)(q13;q21)	<1	M3, variant	11q13/ <i>NuMA</i>	17q12-21/ <i>RARA</i>
Monosomy 7 and del(7q)	4	M2, M4	Unknown	Unknown
t(1;22)(p13;q13)	1	M7	Unknown	Unknown
t(3;5)(q25.1;q34)	1	Nonspecific	3q25.1/ <i>MLF1</i>	5q34/ <i>NPM</i>
inv(3)(q21q26)	1	Nonspecific	3q21/ <i>Ribophorin 1</i>	3q26/ <i>EVII</i>
t(6;9)(p23;q34)	1	M2, M4	6p23/ <i>DEK</i>	9q34/ <i>CAN</i>
t(9;9)(q34;q34)	<1	Nonspecific	9q34/ <i>SET</i>	9q34/ <i>CAN</i>
t(8;16)(p11.2;p13.3)	1	M4, M5	8p11.2/ <i>MOZ</i>	16p13.3/ <i>CBP</i>
t(1;11)(p32;q23)	<1	M4, M5	1p32/ <i>AF1p</i>	11q23/ <i>MLL</i>
t(1;11)(q21;q23)	<1	M4, M5	1q21/ <i>AF1q</i>	11q23/ <i>MLL</i>
t(6;11)(q27;q23)	<1	M4, M5	6q27/ <i>AF6</i>	11q23/ <i>MLL</i>
t(10;11)(p12-14;q14-21)	1	M5	10p12-14/ <i>AF10</i>	11q14-21/ <i>CALM</i>
t(10;11)(p12-14;q23)	1	M4, M5	10p12-14/ <i>AF10</i>	11q23/ <i>MLL</i>
t(11;16)(q23;p13.3)	<1	t-AML	11q23/ <i>MLL</i>	16p13.3/ <i>CBP</i>
t(11;17)(q23;q21)	<1	M4, M5	11q23/ <i>MLL</i>	17q21/ <i>AF17</i>
t(11;19)(q23;p13.3)	1	M4, M5	11q23/ <i>MLL</i>	19p13.3/ <i>ENL</i>
t(11;19)(q23;p13.1)	<1	M4, M5	11q23/ <i>MLL</i>	19p13.1/ <i>ELL</i>
t(X;11)(q13;q23)	<1	M4, M5	Xq13/ <i>AFX1</i>	11q23/ <i>MLL</i>
t(11;22)(q23;q13)	<1	t-AML	11q23/ <i>MLL</i>	22q13/p300
t(16;21)(p11.2;q22)	<1	Nonspecific	16p11.2/ <i>TLS (FUS)</i>	21q22/ <i>ERG</i>
t(12;22)(p13;q11.2)	<1	Nonspecific	12p13/ <i>ETV6 (TEL)</i>	22q11.2/ <i>MNI</i>
t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21q26), and ins(3)(q21;q25q27)	1	Nonspecific	3q26/ <i>EVII</i>	Variable
t(3;21)(q26;q22)	<1	Nonspecific	3q26/ <i>EAP/MDS1/EVII</i>	21q22/ <i>AML1</i>
t(3;12)(q26;p13)	<1	Nonspecific	3q26/ <i>EAP/MDS1/EVII</i>	12p13/ <i>ETV6(TEL)</i>
t(7;11)(p15;p15.5)	<1	Nonspecific	7p15/ <i>HOXA9</i>	11p15.5/ <i>NUP98</i>
inv(11)(p15.5q22)	<1	Nonspecific	11p15.5/ <i>NUP98</i>	11q22/ <i>DDX10</i>

LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA CON TRANSLOCACIONE t(15;17)

La leucemia promielocítica aguda (APL) es un distinto subtipo de leucemia mielógena aguda (AML) identificada y clasificada por la French-American-British como AML-M3 y caracterizada citogenéticamente por una translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 15 y 17. Pacientes con el tipo común hipergranular de leucemia promielocítica aguda son seguidas por leucopenia. Sin embargo una de las formas más agresivas de APL, se caracteriza por una marcada leucocitosis y apenas blástos con gránulos, con bilobed o núcleo en forma de riñón, son descritas como la variante hipogranular (M3v) y se informa en el 25 % de los casos con APL. La típica enfermedad se presenta con una vida amenazada de una diathesis hemorrágica con un empeoramiento por la Citotoxicidad de la quimioterapia. ^(86,87)

La APL está caracterizada por una expansión en la población clonal de células mieloides malignas bloqueadas en el estado de diferenciación de promielocitos. En la mayoría del 95% de los casos una translocación cromosómica es identificada t (15; 17) (q22; q21) en los promielocitos leucémicos. Este rearrreglo ha sido demostrado como resultado de la fusión entre un gen previamente no identificado el término leucemia promielocítica (PML) en el cromosoma 15, y el receptor del ácido retinoico α (RAR α) en el cromosoma 17 dos productos quiméricos resultan de esta translocación. PML-RAR α es expresada en todos los casos y codificado y copiado por el cromosoma 15 y RAR α -PML expresado solo en el 80 % de los casos y codificado y copiado por el cromosoma 17. La expresión consiste en el producto PML-RAR α dentro de este subtipo de leucemia sugiere que juega un papel crítico en la patogénesis. Esta interpretación está basada en recientes experimentos que demostraron en un ratón transgénico la expresión de PLM-RAR α desarrollando una leucemia aguda que se parece a APL. ⁽¹¹⁾

Los retinoides son moléculas de señalización con un papel significativo en el desarrollo y diferenciación. Estos efectos biológicos guían a una hipótesis de que los retinoides fuertes son usados como agentes en el tratamiento de malignidades humanas. Así los retinoides han sido evaluados como posibles terapias para una gran variedad de neoplasmas incluyendo leucemias, cáncer de piel, cáncer cervical y neuroblastomas. Entre las leucemias mieloides y la leucemia promielocítica aguda se encontró una para ser particularmente sensible al ácido retinoico y más que en una década ha pasado desde la demostración de que todos los ácidos transretinoicos (tRA) pueden inducir remisión en los pacientes con APL por una diferenciación simultánea de las células leucemias.

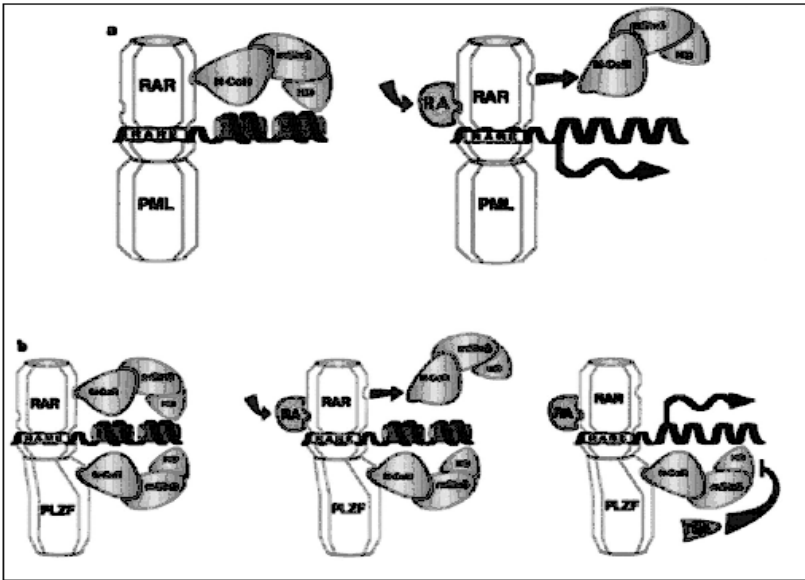


Figura 2 Un modelo de la interacción de la proteína fusionada APL con el complejo N-COR-mSin3-histone deacetylase. Impresa con el permiso de Grignani F, De Mattels S, Nervi C, et al. Proteína fusionada del receptor de ácido retinoico- α , deacetil histona nuevo miembro en leucemia promielocítica. ⁽³⁹⁾

En 1977 Rowley y colaboradores describieron una asociación específica de APL con una Translocación t(15; 17). Subsecuentemente la demostración de los beneficios de la terapia de tRA en APL, el punto de rompimiento en el cromosoma 17 fue identificado dentro de un gen que codifica al receptor del ácido retinoico RAR α . El punto de rompimiento en el cromosoma 15 dentro de un nuevo gen PML. La expresión de la fusión PMLRAR α es una característica constante de la enfermedad en la gran mayoría de los pacientes con APL. Desde esos descubrimientos los esfuerzos han sido directamente en el entendimiento del papel de PMLRAR α en leucomogénesis y la respuesta a la terapia. En adición a la translocación común t(15;17) otras translocaciones han sido identificadas en casos raros de APL. Esas translocaciones resultan de la fusión RAR α e incluye fusiones con PLZF en t(11;17)(q23;q21), NPM en t(5;17)(q32;q21) y NuMA en t(11;17)(q13;q21). Los patrones de RAR α en las fusiones de APL son todas nucleares pero de otro modo tienen comúnmente un límite. RAR α es un ligando que induce factor de transcripción, en la ausencia de estos ligandos tRA, RAR α generalmente actúan como represores de transcripción pero recurriendo a moléculas correpressoras, incluyendo SMRT y N-CoR la cuales en su momento recurren a diacetil histonas. En la presencia del ligando RAR generalmente actúan como inductores transcripcionales pero como moléculas correpressoras y coactivadores. Cuando comparamos con RAR α , PMLRAR α tiene un contexto dependiente de efectos de transcripción. Por ejemplo dependiendo del tipo de célula y de los elementos transcripcionales ensayados, PMLRAR α pueden disminuir e incrementar la transcripción basal en la ausencia del ligando. Similarmente, PMLRAR α puede exhibir ambas actividades dominantes negativas y súper activación en la presencia de tRA. Por lo tanto la activación transcripcional y o la represión transcripcional por PLMRAR α es necesaria o suficiente para la leucomogénesis que no ha sido experimentalmente dirigida.

Aunque casi todos los pacientes responden a la terapia tRA, seguido se desarrolla resistencia a este agente en pacientes tratados. Esto ha sugerido que aumenta el metabolismo de tRA, incrementando la expresión de la proteína II de unión celular para ácido retinoico y incrementa la expresión del gen de resistencia a las drogas pudiendo contribuir clínicamente a la resistencia (revisado en Ding y et al y Imaizumi et al). Sin embargo las alteraciones de la misma proteína PLMRAR α ha sido descrita en algunas subclonas resistentes a ácido retinoico de la línea celular NB4 APL tan bien como en algunos pacientes con una enfermedad que estuvo clínicamente resistente a tRA. Las mutaciones observadas en PMLRAR α incluyeron cambios en los aminoácidos que debilitan la habilidad de la proteína de unión del ácido retinoico y la activación transcripcional. Esos hallazgos son evidencia que la pérdida de sensibilidad en el ligando por PMLRAR α juegan un papel importante en la resistencia clínica de tRA. ^(88, 89)

VARIANTES DE TRANSLOCACIONES QUE AFECTAN RAR ALFA

Dos variantes de translocaciones que involucran el gen RAR han sido identificadas en APL. Estos incluyen a la t (5; 17) la cual fusiona la proteína nucleofosfomina nuclear (NPM) con RAR α y la t (11; 17) la cual fusiona el represor transcripcional PLZF con RAR α , un importante instinto en el mecanismo de transformación en APL trae como estudios de la insensibilidad de ATRA en la translocación t (11;17). PLZF es una proteína altamente expresada en el desarrollo del sistema nervioso, hígado corazón y riñones. En adición PLZF es expresada en progenitores hematopoyéticos CD34+ y es bajo regulación sobre diferenciación terminal en algunas líneas celulares hematopoyéticas. PLZF contiene POZ en N-terminal (poxvirus y zinc-finger) represión autosómica dominante y en C-terminal Krüppel-like DNA-unión dominio. Sorpresivamente PLZF fue encontrada no solo en hemodímeros con PML y es localizada con esto en el NBs sugiriendo un posible papel para PLZF en la supresión de desarrollo en función de PLM o alternativamente un papel para PML en la función normal de PLZF. Ambas interacciones parecen ser mediadas directamente por el dominio POZ. Como resultado de la translocación t(11;17), dos productos recíprocos son formados, PLZF-RAR α y RAR α -PLZF. El producto PLZF-RAR α es tomado como la transformación y consiste de la porción N-terminal de PLZF, incluyendo este dominio de represión POZ fusionado en el tramo de RAR α (Fig.11.5). ⁽¹¹⁾

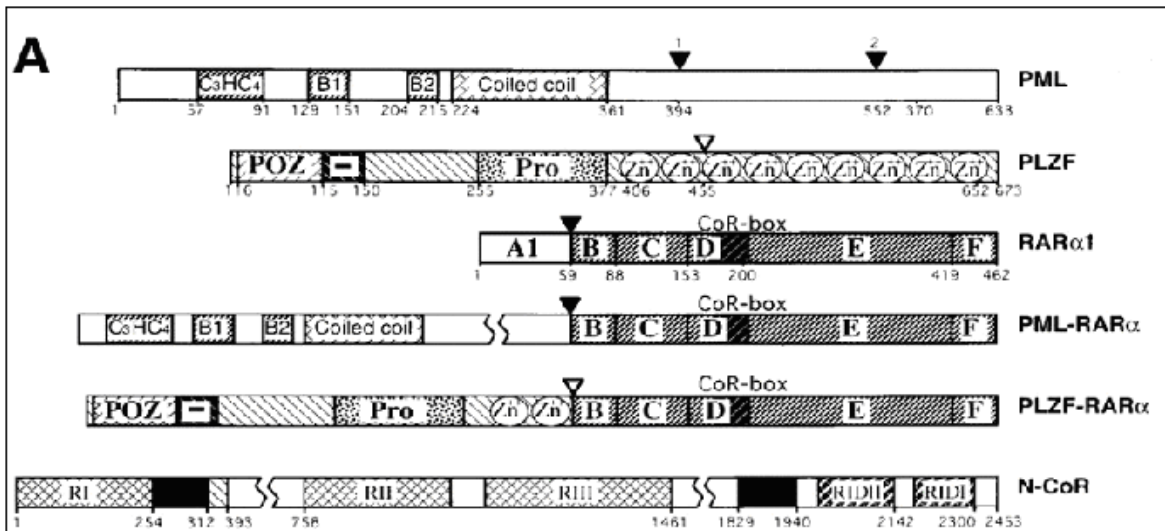


Fig11.5 Representación esquemática de PLZF, RAR α y la PLZF-RAR α proteína quimérica codificada por la translocación t(11;17). PLZF contiene un N-terminal poxvirus y zinc-finger (POZ) dominio seguido por una represión autosómica dominante (A), una región rica en (P) y un dominio Krüppel-like zinc finger (Zn).

La expresión de proteína PLZF-RAR α en ratones transgénicos para el promotor de captasina G ha mostrado uniformemente el desarrollo de la leucemia mieloide crónica dentro de los primeros 5 años de vida. En consecuencia igual que los productos quiméricos PML-RAR α y PLZF-RAR α contribuyen directamente al desarrollo de leucemia mieloide sin embargo el tipo de leucemia mieloide inducida en este sistema experimental difiere significativamente entre estos dos oncogenes. El producto recíproco RAR α -PLZF se formó como resultado de la t(11;17) esta se mantiene en muchos casos y contiene el lugar PLZF DNA-binding domain. El papel de este producto más tarde es la transformación de las células hematopoyéticas quedando para ser determinadas.

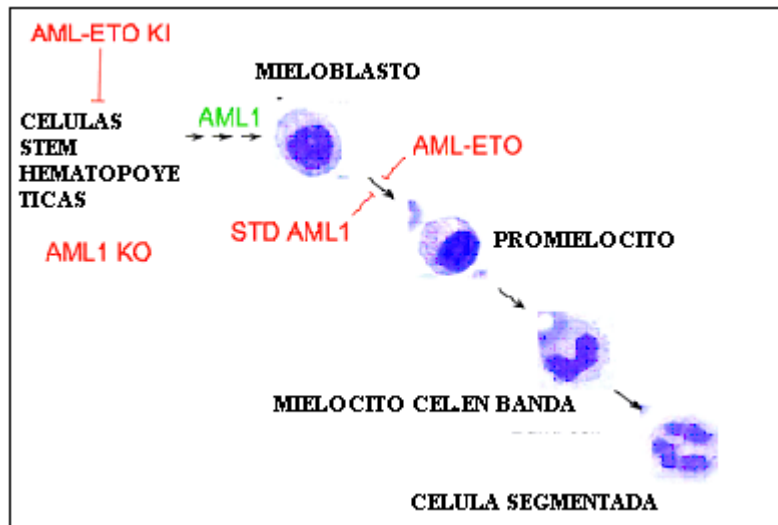
Los fármacos de quimioterapia están reconocidos como una espada de doble filo. La quimioterapia del cáncer es una causa de leucemia mieloide aguda (AML) en los jóvenes secundaria a la terapia relacionada AML (t-AML) en cantidades del 10 al 20 % de todos los casos de leucemias. Los inhibidores topoisomerasas II del DNA son ampliamente usadas en el tratamiento del cáncer pero ellas solo son reconocidas como una sugerencia secundaria con periodos de latencia cortos.

MLL (ALL1, Htrx, HRX), el cual está localizado en la banda del cromosoma 11q23 frecuentemente este rearrreglo de cromosomas en las translocaciones de novo en leucemias y solo en pacientes de t-AML quienes previamente recibieron inhibidores de topoisomerasas II del DNA por una enfermedad maligna primaria. La proteína de tipo silvestre MLL con una masa molecular de 431 kDa tiene AT-hook dominio de unión DNA, activación transcripcional y represión en los dominios en planta múltiple de homodominios (PHD) de dedos dominios y una región de homóloga a los mamíferos DNA metiltransferasas. El carboxilo terminal de MLL contiene un (Su (var) 3-9, mejoran el interés y trithorax) (SET)

dominio, a largo del cual el dominio PHD, es conservado con el de *Drosophila trithorax* gen (trx). Trx está envuelto en el segmento determinante de *Drosophila* a través de la regulación de los genes homeotic. MLL está considerada a ser la homóloga humana de trx por que en los ratones con la mutación Mll demostraron la transformación homeotic. Esto ha sugerido que MLL juega un papel importante en la hematopoyesis y leucemias a través de esta habilidad que regula la expresión de los genes Hox. El ratón mutante Mll-null tiene defectos en los estados tempranos de hematopoyesis relacionados a los progenitores hematopoyéticos en la proliferación o nuevos elementos. La maduración detenida fue observada en la diferenciación hematopoyética in vitro solo o doble de las células stem embrionales de ratón knockout Mll. Las translocaciones cromosómicas involucran MLL produciendo la fusión de los productos de la porción N-terminal de MLL con diferentes patrones de proteínas; la delección terminal de MLL no ha sido identificada en células leucémicas. 19 genes compañeros han sido clonados hoy día. Ahí no ha compartido la estructura común entre uno de los productos de los genes, sin embargo esto es a través de los genes compañeros es crítico para la leukomogénesis por varias razones. Todos los genes compañeros están fusionados en el marco de MLL, resultando en una nueva fusión proteínica, en el rango más que simplemente una troncada de MLL. En un sistema modelo "knock-in" solo ratones con la fusión compañera idéntica que se observan en las leucemias humanas desarrollando leucemia de origen mielóide, sugieren que la fusión del producto es crítico en la leucomogénesis. Por lo tanto en la médula ósea murina el sistema de immortalización, el gen compañero ENL fue crítico para la immortalización y leucomogénesis. Sin embargo esto no se entiende como los productos fusionados participan en la leucomogénesis. En el estudio realizado se identificó el gen, que no está presente en la base de datos del GenBank como la fusión compañera de MLL para un paciente quien tiene t-AML con una t(11;17)(q23;q25). Este patrón de translocación cromosómica ha sido reportada en varios casos de leucemia aguda y síndrome mielodisplásico Este gen compañero fue llamado MSF (MLL septin-like fusión) porque está altamente conservado con genes de la familia septin. La familia de proteínas septin está localizada en el citoplasma, es caracterizada por el dominio de unión GTP y es involucrada en citokinesis causado por interacción con los filamentos del cito esqueleto. MSF es altamente homólogo y conserva el dominio de unión GTP con hCDCrel-1, del cual el gen compañero de MLL en leucemias con una t(11;17)(q23;q11.2).^(90, 91,92)

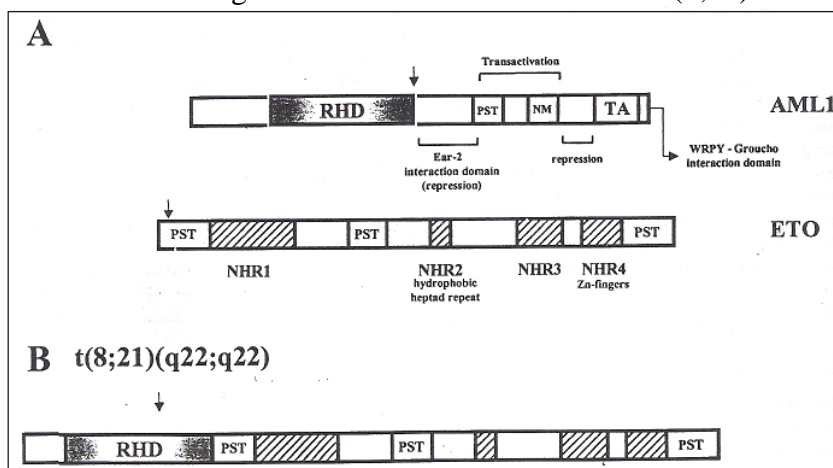
La translocación t(8;21)

La translocación t(8;21) se ha visto exclusivamente en las LMA con clasificación morfológicamente de FAB M2 y en el 40% de estos casos. El rearrreglo resulta de la fusión entre el gen AML1 del cromosoma 21 y el gen ETO en el cromosoma 8 (ETO solo se conoce como MTG8 y CBFA2T1) o cromosoma 8 Fig. 6. La complejidad de la translocación sugiere que AML1-ETO producto quimérico que es codificado por el cromosoma 8 jugando un papel crítico en el establecimiento de la clona leucémica. Este producto consiste de la porción N-terminal de AML1 incluyendo la terminación RHD fusionada en el tramo de la porción carboxilo terminal de ETO.^(11,95, 96)



Principio del formulario

Compromiso intracelular del blanco en la transcripción hematopoyetica de AML1 inhibidor de factor de transcripción en la diferenciación mieloide y promueve la transformación de la línea celular. En este diagrama se muestra como ocurre la t(8;21)



Representación esquemática de AML1, ETO y la t(8;21) que es codificada por la proteína quimérica a AML1-ETO. AML1 contiene al dominio homólogo más pequeño de los heterodimeros (RHD), una región rica en prolina/serina/treonina (PST), asociada al sitio de la matriz nuclear (NM) y al dominio (TA) de activación transcripcional. ETO está organizada en tres regiones ricas de prolina/serina/treonina (PST) y en cuatro dominios con homología al nervio (región homóloga al nervio, NHR1-4).

Translocación t(16;21)

AML1 está fusionado con ETO un miembro de la familia MTG16 como resultado de una t(16;21)(q24;q22) viéndose en casos raros de terapia relacionada de AML o MDS la estructura de productos quiméricos ensamblado AML1-ETO y esta predice su función en un mecanismo similar. Esta anomalía se relaciona con la terapia recibida de los pacientes de LAM o SMD considerándose una variante de la t(8;21). Tanto en la translocación

t(8;21) como en la t(16;21) sus puntos de rompimiento ocurren entre los exones 5 y 6 de AML1 y entre los exones 1 y 2 o los exones 3 y 4 de MTG16. Los dos genes están fusionados en un fragmento resultado de los productos quiméricos característicos de esta translocación. El producto quimérico recíproco MTG16-AML1 solo se detectó en una de los pacientes la t(16;21) este producto proteínico fue previsto como truncado. Estos genes de fusión AML1-MTG16 en la t(16;21) resultado de una leucemia, la producción de la proteína que es muy similar a la AML-MTG8 proteína quimérica. ^(11,93,94)

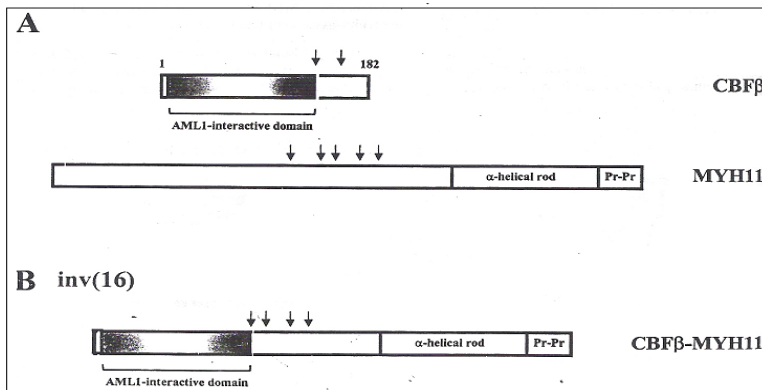
Translocación t(3;21)

La translocación t(3;21) se observa en muy pocos casos de SMD, y la transformación blástica de LMC, AML1 están fusionados con otro gen el EVII el cual codifica un represor transcripcional u otros dos genes alternativos de función desconocida EAP y MDS1 los cuales son localizados junto a EVII en el cromosoma 3 y son frecuentemente spliced las secuencias de EVII en el transcrito codificado. Cada uno de los productos resultantes de esos reemplazos en la secuencia de AML1 en el Carboxilo terminal del RHD, resultando en la eliminación de la habilidad de las moléculas para activar la transcripción. Por lo contrario la translocación t(12;21) se observa en pacientes pediátricos de LLA resultado de un producto quimérico que contiene el helix-loop-helix en un dominio dimerizado de TEL ligado en al menos en un fragmento de AML1.(11) . Los genes quiméricos expresados en la son AML1/EAP, AML1MDS1, y AML1-EVII. AML1 (CBFA2), El cual codifica para la subunidad alpha del factor de transcripción heterodimérico CBF este solo involucra a la t(8;21) y al gen que codifica la subunidad beta de (CBFB) que está involucrada en la INV 16. Estos son dos de los más comunes rearrreglos cromosómicos en la leucemia mieloide aguda.art. ^(97, 98, 99, 100)

Inv16 y t(16;16)

La inversión (16)(p13;q22) y una variante en la t(16;16)(p13;q22) por lo tanto constituye una de las más frecuentes lesiones genéticas identificadas *in novo* en AML. Aunque estas anomalías fueron inicialmente encontrados en casos patológicos con morfología de acuerdo a la FAB en M4Eo, recientes estudios demostraron que ellas solo ocurren en frecuencia significativa en casos con morfología de M1 o M2. ⁽¹¹⁾

Las leucemias agudas que presentan la inv16 ó t(16;16) se asocian a un buen pronóstico. En estos pacientes se reportó que sobre el 50 % de los pacientes estuvieron 5 años libres de la enfermedad. En la inv16 o t(16;16) guían la generación de genes quiméricos, uniendo a MYH11 para 16p o CBF-beta (core binding factor) para 16q. Este gen parece que codifica una o más proteínas modificando el metabolismo intracelular de la citosina y presentan una alta sensibilidad de las células leucémicas a las drogas. ^(93, 94,95)



Representación esquemática de CBFβ, MYH11, y la inversión 16 que codifica una proteína quimérica CBFβ-MYH11. La porción carboxilo terminal C de MYH11 contiene un dominio de interacción proteína-proteína (Pr-Pr).

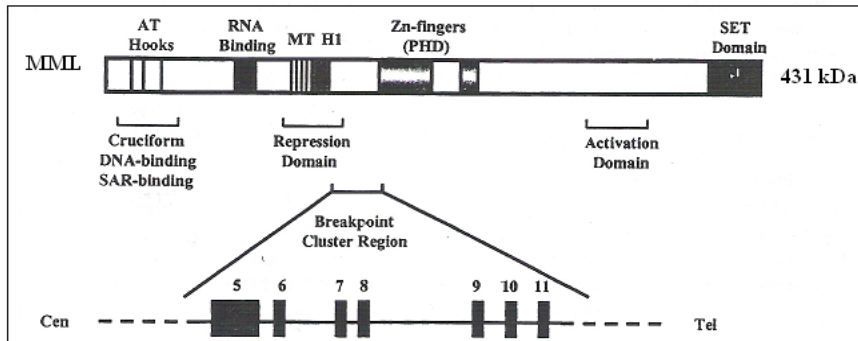
Las alteraciones cromosómicas involucradas en el cromosoma 11 banda q23, son las anomalías citogenéticas más comunes vistas en las AML y ocurren aproximadamente en un 6% a 8% de las AML nuevas y en un 85% de las AML secundarias que siguen su desarrollo expuestas a inhibidores como las topoisomerasas II. En consecuencia el cromosoma 11q23 es el rearrreglo más frecuente en el sitio de las LLA en los infantes, estos han sido estimados que sobre 40 diferentes loci del cromosoma pueden participar en esta translocación 11q23. El sitio más frecuente involucrado en AML incluye 1p32, 1q21, 6q27, 9q22, 10p12, 16p13.3, 17q21, 19p13.3 y 22q13. La clonación molecular de un número de estas translocaciones han demostrado que en la mayoría de los casos de 11q23 el gen blanco es designado MLL (para una leucemia de linaje mixto, solo se refiere como HRX, ALL-1 y HTRX1). Como resultado de estas translocaciones un mensaje quimérico es formado eso consiste en la porción 3' de un gen que codifica en el cromosoma recíproco. En consecuencia esas translocaciones inducen alteraciones en MLL, este gen ha sido encontrado al sufrir duplicaciones parciales internas en raros casos de AML que tampoco tienen un cariotipo normal o trisomía del cromosoma 11. ⁽¹¹⁾

A continuación se muestra una tabla en la que se encuentra involucrado el gen MLL.

Tranlocación	Fusión de Proteína	Función/ Proteína
t(9;11) (p22;q23)	MLL-AF-9	RNA polymerase II
t(11;19) (q23;p13.1)	MLL-ELL	RNA polymerase II elongation factor
t(11;19) (q23;p13.3)	MLL-ENL	RNA polymerase II
t(1;11) (p32;q23)	MLL-AF1p	Homology to poly(A)ribonuclease
t(6;11) (q21;q23)	MLL-AF6q21	Forkhead transcription factor
t(X;11) (q13;q23)	MLL-AFX	Forkhead transcription factor
t(10;11) (p12;q23)	MLL-AF-10	PHD finger and leucine zipper
t(11;17) (q23;q21)	MLL-AF17	PHD finger and leucine zipper
t(11;16) (q23;q13.3)	MLL-CBP	HAT coactivator
t(11;22) (q23;q13)	MLL-p300	HAT coactivator
t(6;11) (q27;q23)	MLL-AF6	RAS-binding protein
t(1;11) (q21;q23)	MLL-AF1q	Cloned—no homology

Translocaciones asociadas a LAM que involucran al gen MLL.

Aquí se muestra como ocurre la afección del gen MLL.



La proteína MLL y la organización en la región punto de rompimiento, MLL está organizado con un dominio interno N-terminal AT-hook, regiones con proteínas homologas de RNA-binding, DNA-metiltransferasas (MT), histona HI, HD-type dedos de zinc (Zn) y el dominio SET. El punto de rompimiento de la región blanco es abajo del centrómero (cen) a telómero (tel)

t(X;11)

La translocación t(X;11) ocurre en pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda (AML). Se muestra que el gen MLL en 11q23 está fusionado al gen SEPTIN6 en Xq24 homólogo de humano a ratón septin6, en tres infantes nuevos de AML con una anomalía compleja cromosómica involucrada 11q24 y Xq22-24. SEPTIN6 consiste de mínimo 6 exones y esta codifica mínimo 2 tipos de proteínas por splicing alternativo. La expresión de los transcritos SEPTIN6 de 2.3-, 3.1-, y 4.6-kb fueron simultáneamente detectados en pulmones fetales, hígado, y cerebro, y en todos los tejidos adultos excepto en cerebro y en líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda y AML. Sin embargo la expresión de un transcritos de 2.7-kb fue detectado en corazón fetal y cerebro. La proteína SEPTIN6 es homóloga a los miembros de la familia septin incluye a CDCREL1 y AF17q25/MSF, la cual genera productos fusionados con MLL. La proteína fusionada MLL-SEPTIN6 contiene por lo menos la proteína septin completa, similar a MLL-CDCREL1 y MLL-AF17q25/MSF. Notablemente tres de todos los pacientes fueron diagnosticados con M1 ó M2. los resultados y la literatura sugieren que AML con el gen fusionado MLL-SEPTIN6 es una consecuencia de la AML en infantes la cuales se diferencian en el linaje mieloide, aunque AML con la fusión de otros genes MLL es capaz de diferenciar en linaje mielomonocítico o monocítico.

Un gran número de leucemias han sido relacionadas y asociadas con aberraciones cromosómicas. Estudios recientes han demostrado que varios rearrreglos cromosómicos son fuertemente asociados con distintos subgrupos clínicos y pueden predecir características clínicas en la respuesta terapéutica. Las translocaciones ocurren en el cromosoma 11 involucrando la banda q23 (11q23), observándose en la leucemia aguda o síndromes mielodisplásicos, son caracterizados por la presencia de una gran variedad de patrones en los cromosomas. Un mínimo de 40 regiones presentan patrones cromosómicos de 11q23 se han observado, relacionados con t(4;11), t(9;11) y t(11;19). El gen MLL (Solo llamado ALL-1 y

HRX) ha sido identificado en la translocación 11q23 y este rearrreglo es encontrado en la mayoría de infantes y terapia relacionada a leucemias. ⁽¹²⁴⁾

t(17;19)

La fusión del gen E2A-HLF forman la translocación cromosómica t(17;19)(q23;p13.3), se maneja la idea de esta transformación leucémica de precursores de células B tempranas por represión en las rutas apoptóticas conservadas evolucionadamente. Esta ocurre en niños grandes y adolescentes. En esta molécula quimérica de dominios transactivación de E2A esta fusionado a la región básica y los dominios de zipper leucina (bZIP) de HLF la cual media la unión de DNA y dimerización. Dos distintos tipos de rearrreglos genómicos resultado de la fusión E2A-HLF han sido descritos en t(17;19) de ALL. El tipo de rearrreglo 1 es una inserción que codifica para una porción de la quimera no encontrada en otro tipo de proteína ocurre entre E2A exon 13 y el exon HLF. Esta inserción deriva de una forma misteriosa en un intervalo de exon en el punto de rompimiento de 17;19. Conteniendo la secuencia intrónica de E2A que está en la terminación 5', la secuencia intrónica de HLF que está en la terminación 3' y varios números de nucleótidos a la mitad. El rearrreglo tipo 2 presenta para más punto de rompimiento en 5' de E2A y la fusión resulta con E2A exon 12 directamente spliceado por el exon 4 de HLF. La leucemia asociado con la fusión de la proteína E2A-HLF no responde bien a la quimioterapia intensiva, no hasta las condiciones agresivas para el trasplante de médula ósea. Por lo tanto la manifestación frecuente con coagulación intravascular y hipercalemia las cuales son generalmente complicaciones raras en niños con ALL pro-B. Aunque las actividades de unión DNA y la activación transcripcional son propiedades de tipo 1 y tipo 2 de las proteínas fusionadas E2A-HLF parecen ser similares, la coagulopatía se desarrolla más frecuentemente en una cantidad de pacientes con rearrreglos de tipo 1 que de tipo 2.

Los pacientes de leucemia con el producto fusionada E2A-HLF y la tendencia a sangrar se tienen datos de laboratorio parecido a los pacientes con t(15;17) de leucemia promielocítica aguda. Los principales determinantes para la patogénesis de APL-asociadas a coagulopatía han sido investigadas en las décadas y los factores expresados en las células leucémicas que afectan las actividades pro coagulantes y fibrinolíticas han sido identificadas (para la revisión, ver Falange et al). Estos factores incluyen factor tisular, citocinas inflamatorias características como interleucina-1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y miembros de la familia annexin. Una de estas annexin II ha sido reportada por ser causa de coagulopatía asociada con APL. (132, 133,134)

t(5;12)

El gen ETV6 (ahora conocido como TEL) en el cromosoma 12p13 es el blanco de un gran número de translocaciones asociada con varias malignidades hematológicas. La contribución de ETV6 a leucomogénesis ocurre por diferentes mecanismos que involucran a otros como helix-loop-helix dominio dimerizado o esta transformación –específica de E26 (ETS) dominio DNA-unión. Las primeras caracterizaciones de ETV6 fue por FISH encontrándose 7 nuevos rearrreglos en leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y linfoma no hodgkin's. Estas aberraciones no siempre se descifran a nivel citogenéticos, incluida la t(5;12)(q31;p13), t(6;12;17)(p21;p13;q25), t(7;12)(p15;p13), t(7;12)(p12;p13), t(7;12)(q36;p13), t(12;13)(p13;q12), y no completamente definida la t(12;?)(p13;?). La pérdida o trastorno del segundo alelo de ETV6 por delección de

(12)(p12;p13) o por una deleción intragenica de ETV6 fue detectad en dos casos. En 6 casos el punto de rompimiento ocurrió en 12p13 en la terminación 5' de ETV6 rió abajo del exon que codifica del dominio HLH por lo tanto el caso está contenido entre el punto de rompimiento y el exon que codifica para el dominio HLH y los exones codifican para el dominio ETS de ETV6. Estas observaciones proveen evidencia para una múltiple contribución de ETV6 en la patogénesis de un amplio rango de enfermedades hematológicas. Un pequeño número de pacientes con enfermedades mieloproliferativa crónicas tienen la activación constitutiva del gen de factor de crecimiento derivado-plaquetas receptor beta (PDGFRB), el cual codifica a receptor tiroxina kinasa. Este gen está localizado en el cromosoma 5q33, y la activación es normalmente causada por la translocacion t(5;12)(q33;p13) translocacion asociada con la fusión del gen ETV6-PDGFRB. La tiroxina kinasa es un inhibidor de imatinip mesylate (medicamento) que inhibe especialmente a ABL, PDGFR, y KIT kinasas y tiene una eficacia impresionante en BCR-ABL-positivo en leucemia mieloide crónica.

Recientes estudios citogenéticos y moleculares sugieren de la existencia de algunos nuevos y únicos pacientes con enfermedades mieloproliferativas con una anormalidad citogenética definida. La anormalidad más común es la t(5;12)(q33;p13) la cual fusiona al gen ETV6/TEL factor de crecimiento derivado de plaquetas receptor beta (PDGFER), que es mapa de 5q33.

Clínicamente muchos pacientes presentan enfermedades mieloproliferativa con eosinofilia, leucemia eosinofílica y esta cae nuevamente en la propuesta de categoría de quien es MPD/MDS,. STI571 es una pequeña molécula que selectivamente inhibe la actividad enzimatica de varias tiroxinas kinasas, incluyendo el de ABL y BCR la fusión de la proteína ABL en leucemia mieloide crónica, el receptor factor de crecimiento derivado de plaquetas y el producto del gen c-kit. ^(138, 139, 140, 141)

t(16;21)

La translocacion cromosomica t(16;21)(p11;q22) es una aberración non-random observada en varios tipos de leucemias mieloblasticas agudas (AML), por lo tanto el rearreglo cromosómico der(16) t(1;16) 12q13 es frecuentemente encontrado en tumores sólidos. Una nueva línea celular YNH-1 fue establecida en células de sangre periférica de hombres de 46 años de edad con AML (M1) llevando translocacion t(16;21) y t(1;16). YNH-1 ha sido mantenida con un doble tiempo de 82 horas por más de 20 meses como un factor de estimulación de colonias granulocíticas (G-CSF), factor de estimulación de granulociticos –macrófagos (GM-CSF) y interleucina 3 (IL-3) dependiente de línea. Morfológicamente las células YNH fueron free-floating mieloblastos inmaduros con núcleo bilobulado y vacuolas en el citoplasma. Ellas fueron positivas para mieloperoxidasa pero negativas para α -naftol butil esterasa y tensión de esterasa cloroacetato. En el análisis de marcadores de superficie para las células YNH-1 fueron positivas para CD13,CD33 y CD34. Los análisis cromosómicos mostraron 46, XY, der(16)t(16;21)(p11;q22)t(1;16)(q12;q13), der(21)t(16;21)(p11;q22), der(6)t(6;21)(q13;q13),der12t(6;12)(q21;q13). Estas translocaciones fueron confirmadas por FISH estudios con la clona ERG-YAC y cromosoma específico del archivo de DNA. FUS/ERG y ERG/FUS ambos transcritos quiméricos fueron identificados por análisis de RTPCR. Este YNH-1 debería ser usado para elucidar la fisiopatología y el mecanismo molecular en AML con translocaciones t(16;21), t(1;16) 12q13. (68,144)

TAL1

El gen tal-1 fue identificado en un análisis sobre la translocación t(1;14)(p34;q11) la translocación del cromosoma observada en las células malignas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) (1-4). Aunque esta sólo se encuentra en el 3% de los pacientes con t(1;14)(p34;q11) ha sido implicado como factor causante de leucomogénesis basado en esta posibilidad de pacientes no relacionados y esta asociación exclusiva con T-ALL. La translocación genera un cambio recíproco de material genético entre los cromosomas 1 y 14 con un punto de rompimiento citogenético en las bandas del cromosoma 1p34 y 14q11. Consecuentemente el gen de tal-1 formado en el cromosoma 1 y es transportado al interior de las cadenas TCR- α/δ del locus 14q11, esta sobre expresión es presumiblemente alterada en uno de los promotores de formación de T-ALL.

Dos líneas adicionales de evidencia soportan la notación de que el gen tal-1 es un protooncogen que contribuye potencialmente al desarrollo de T-ALL. El primer producto del gen tal-1 es un miembro de la familia helix-loop-helix (HLH) proteínas de unión DNA, de las cuales varias han sido mostradas específicamente reconociendo mejor las secuencias core de transcritos eucarióticos. Aunque las proteínas (HLH) controlan diversos aspectos del crecimiento celular normal y diferenciación, tres miembros de esta familia (i, e; c-myc, lyl-1 y E2A) solo han sido implicados en leucemia linfoblástica aguda humana, segundo a pesar de la frecuencia de translocación t(1;14) (p34;q11) aquí se mostró que el 25% de los pacientes con T-ALL tienen un sitio específico de delección de 90 kb del gen (tal1) de tal-1 que es aparentemente no detectable con análisis citogenéticos. Por lo tanto la alteración estructural de tal-1 por otra translocación t(1;14) (p34;q11) ó delección tal1 representan la más común de las lesiones genéticas asociadas a T-ALL en humanos. Los mecanismos por los cuales la translocación de alelos de tal-1 son activados no son entendibles. Se analizaron las estructuras de los cromosomas de t(1;14)(p34;q11) de una serie de pacientes con T-ALL, en cada 5 casos el punto de rompimiento en la translocación cromosómica 1 ocurre y describe en la región de 1-kb del locus tal-1. Sin embargo el mapeo del DNA genómico de tal-1 revela que los exones codificados están situados en ambos sitios de la t(1;14)(p34;q11) principal punto de rompimiento. Aquí la translación del alelo de tal-1 es truncada de una manera que reduce potencialmente esta codificación aminoácida.

El gen TAL1 en el cromosoma 1 codifica un factor de transcripción hematopoyético. Los diferentes artículos mencionan porcentajes parecidos de pacientes manejados ya sea en niños y adultos, en leucemias o linfomas de estirpe T, realizando análisis de Southern o RTPCR recientemente. ^(145, 146, 147, 148, 149)

MDR

Los transportadores en el cuerpo juegan un papel principal en la distribución y eliminación de muchos agentes terapéuticos clínicamente importantes. La P-Glicoproteína (PGP) es una ATP-dependiente de membrana unida al transportador que hasta ahora le confiere resistencia a varias estructuras no relacionadas agentes neoplásicos clínicamente importantes. Este fenómeno generalmente es conocido como resistencia a las drogas. PGP es codificada por los genes en el cual incluye a mdr1 y MDR1 en los humanos y mdr1a y mdr1b en los roedores. Los productos de sobre expresión del gen mdr1 han sido implicados como un primer mecanismo en resistencia a drogas en el tumor, particularmente en los tumores que se presentan en tejidos los cuales normalmente expresan PGP (ejemplo, hígado, riñones, intestino

y la interrupción de sangre al cerebro). Aunque otras funciones fisiológicas no están claramente definidas, los productos del gen *mdr1* juegan un papel tomando la protección de organismos repitiendo tóxicos xenobioticos.

Mientras los agentes neoplásicos son sustratos importantes de PGP, otra variedad de drogas clínicamente relevante solo son transportadas por PGP. Por lo tanto en adición y examinación de la sobre expresión de PGP en células tumorales, no entendiendo los mecanismos fisiológicos de regulación de PGP pudiendo ayudar esto a su explicación variablemente sujeta a disposición de drogas. La identificación de secuencia de genes y los recientes avances en biología molecular han resultado en una explosión de conocimientos referentes a la regulación genética de PGP. Estos delineamientos de esos caminos regulatorios pueden permitir su predicción y manipulación de genes expresados de *mdr1* en orden de mejorar la eficacia clínica de sustratos de PGP. Como las funciones de PGP es proteger las células de los daños químicos y metabólicos esto es plausible que esos transportadores juegan un papel importante en la respuesta celular en stress. Por lo tanto numerosos estímulos “stress-evoking” han sido reportados como genes de expresión alterados de *mdr1*. Las regiones promotoras y las secuencias regulatorias río debajo de los genes *mdr1* de humanos, ratones, hámster, y ratas han sido identificados y caracterizados.

En resumen, un gran número de estimuladores ambientales son conocidos por sus efectos en la expresión de los genes *mdr1*. En humanos esto sugiere que MDR1 puede funcionar como un gen de shock caliente y esta expresión puede ser modulada por un número de agentes gatillo los cuales son señales de ruta. La radiación ionizante solo ha mostrado una desregulación cruzando la expresión del gen *mdr1* en especies en un número de vías de mecanismos. La evidencia demuestra que la radiación UV modula el gen humano MDR1 de transcripción aunque los mecanismos en la cromatina no, un primer camino regulatorio se ve con el gen MDR1. Otros estímulos stress incluyendo una variedad de citokinas y factores de crecimiento han demostrado sus efectos en la expresión del gen *mdr1*. Aunque muchos han sido reportados en la expresión del gen *mdr*, los mecanismos involucrados en esta regulación son relativamente desconocidos. Esto es que un número limitado de factores de transcripción posee sitios de unión en los promotores de *mdr1* que son involucrados en los caminos regulatorios de estimulación de stress. La sobre expresión del gen1 de multiresistencia a drogas (MDR1) es un factor negativo de pronóstico en leucemia.^(150,151)

MATERIALES

Aspirado de **medula ósea** ó **sangre periférica humana**, colorante de **Wright-Giemsa** para la tención de laminillas para su observación al **microscopio**, **anticuerpos monoclonales**, **citómetro de flujo**, **RNAm**, **dNTP**, **Buffer**, **DTT**, **MMLV-RT**, **cDNA**, (**kit de HemaVision**). Para síntesis de cDNA micropipetas con filtro 0.5-10 ul, 20-200 ul, **espectrofotómetro**, **microcentrifuga**, **termociclador**, **agua libre de DNase y RNase**, **guantes**, **tubos libres de RNase**.

Preamplificación, micropipetas con filtro 0.5-10 ul, 2-20 ul, 20-200 ul, 100-1000 ul, pipeta multicanal de 20-200 ul, tiras de microtubos de 8 pozos, tiras de tapas de 8, tubos de 1.5 ml, HotStarTaq DNA polimerasa , vortes, agua para PCR.

Detección de la amplificación, micropipetas 0.5 ul, 2-20 ul, 20-200 ul, 100-1000 ul, agarosa ,TBE buffer, camara de electroforesis, bromuro de etidio mg/ml, buffer de carga, pipeta multicanal (1-50 ul).

EL PANEL EMPLEADO PARA CLASIFICAR LEUCEMIAS POR INMUNOFENOTIPO FUE EL SIGUIENTE.

Anticuerpos mieloides

CD34, CD33, CD117, CD14, CD13.

Anticuerpos linfoides

CD3, CD2, CD10, CD19, CD20, CD4, CD8

Anticuerpos anti plaquetas

CD41

Anticuerpos eritroides

GLICOFORINA A

Anticuerpos intracelulares

cMPO, cCD3,cCD79

Anticuerpo de pronóstico

MDR

TECNICAS

TINCION DE LA MEMBRANA CELULAR CON ANTICUERPOS MONOCLONALES FLUORESCENTES

Muestra: sangre completa, médula ósea, u otros líquidos corporales (cefalorraquídeo, pleural, etc.) anticoagulados con EDTA (K3) o heparina.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- En un tubo de propileno de 12 x 75 mm, colocar 100 uL de la muestra, que debe contener de 5-20x10⁵ células en total. Si es necesario diluir la muestra con PBS, o concentrarla por centrifugación.
- 2.- Agregar el (los) anticuerpo(s) monoclonal(es) fluorescente(s), en el volumen recomendado por el fabricante.
- 3.- incubar por 10-15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 4.- Hemolisar y fijar en el Q-Prep r utilizando el ciclo de 35 segundos.
- 5.- Leer en el citómetro de flujo, excitando con un láser de argón (enfriado por aire) a 488 nm, y colectando con la siguiente selección de filtros:

FITC	525 nm (FL1)
Ficoeritrina	575 nm (FL2)
PE-texas RED (ECD)	610 nm (FL3)
PerCP	675 nm (FL4)
PE-Cyanina 5	675 nm (FL4)
Tricolor	675 nm (FL4)

Se utiliza alofococianina (APC) como marcador fluorescente, la emisión se colecta también en 675 nm, pero es menester emplear un rayo láser infrarrojo (He-Ne) para excitarla.

La colección de los fluorocromos debe hacerse utilizando los pulsos en escala logarítmica.

TINCION DE ANTIGENOS CITOPLÁSMATICOS

Muestras: Sangre periférica o médula ósea, obtenidas con EDTA (K3) u otros especímenes.

Procedimiento:

- 1.- Colocar 50 uL de la muestra (5-20 x 10⁵ células por mL) en un tubo de propileno de 121 x75 mm.
- 2.-Adicionar 100 uL del fijador (reactivo 1 IntraPrep) y agitar vigorosamente.
- 3.- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 4.- Lavar con 4 mL de PBS por 5 minutos a 300 x g y aspirar el sobrenadante.
- 5.- Adicionar 100 uL del permeabilizante (reactivo 2 IntraPrep) y dejar incubar durante 5 minutos.
- 6.-Agitar en el vórtex a baja velocidad durante 2 segundos.
- 7.- Adicionar 20 uL del (los) anticuerpo(s) conjugado(s) apropiado(s).
- 8.- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 9.- Lavar las células con 4 mL de PBS por 5 minutos a 500 x g.
- 10.- Descartar el sobrenadante.
- 11.- Resuspender en 500 mL de PBS para analizar en el citómetro.

La selección de filtros en el citómetro , está sujeta a los fluorocromos empleados.

NOTA: El reactivo FIX & Perm r (CALTAG Laboratorios) ha sido evaluado en estudios multicéntricos y considerado como óptimo para la detección de diversos antígenos intracitoplásmaticos. El reactivo IntraPrep r (Becman-Coulter) es una muy buena alternativa para el mismo propósito.

REACTIVOS

PBS

NaCl	17.00 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2.35 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.45 g
H ₂ O,qbp	2.00 L
pH 7.4 con HCl 2N	

Métodos:

El estudio se realizara llevando a cabo los tres métodos de diagnóstico en forma prospectiva a todas las muestras de aspirado de médula ósea o sangre periférica con el diagnóstico morfológico de la FAB de leucemia aguda ,establecidos y confirmados por los médicos Hematólogos y Químicos del servicio de Hematología y Biología Molecular del HCSAE, tanto adultos como pediátricos ,así como las muestras enviadas de los hospitales regionales de PEMEX en provincia, de donde este centro ,ya funciona como referencia para el diagnóstico por inmunofenotipo y RTPCR ,en leucemias agudas.

Se solicitara el envío de muestra de aspirado de medula ósea en cantidad de 3 ml, en EDTA como anticoagulante, en donde 2 ml servirá para la determinación del inmunofenotipo y 1 ml para el estudio de RTPCR para la búsqueda de translocaciones.

En caso de tener una muestra con más del 30% de blástos en sangre periférica, siempre y cuando se tenga el diagnóstico de leucemia aguda confirmado morfológicamente.

Se realizara la determinación del inmunofenotipo por la técnica de preparación automática Q-prep., de Beckman Coulter para obtener las células mononucleares y se cuantificaran las reacciones antígeno-anticuerpos utilizando anticuerpos monoclonales triples en protocolos previamente establecidos en el citómetro de flujo modelo XL marca Beckman Coulter. Que más adelante se mencionaran los paneles utilizados.

El estudio de las translocaciones se realiza en mRNA total extraído de células mononucleares de sangre periférica o médula ósea el cual se extrae empleando metodologías estándar.

El mRNA total se usa como molde para la síntesis del cDNA, usando la enzima transcriptasa reversa (RT) y el cDNA, se usa entonces para la amplificación de la secuencia blanco o empleando la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) procedimiento que se conoce como RT- PCR . El método empleado está diseñado en base al empleo de PCR múltiples que contienen varios pares de iniciadores, lo cual permite realizar un rastreo para las principales translocaciones encontradas en las leucemias.

Una vez que se detecta la presencia de un gen de fusión, se realizan PCR con un solo par de iniciadores específicos para cada una de las translocaciones, de las que se emplearon en las mezclas iniciales para realizar el screening.

Los productos de amplificación tanto en la fase de rastreo, como fase de identificación se visualizara en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, lo cual permite analizar la intensidad de la banda que es proporcional a la cantidad de RNA m proveniente del gen de fusión, así como tamaño en pares de bases lo cual permite conocer el punto de ruptura de cada translocacion

TECNICA

6.2 Preparación de RNA

1.- Recolectar sangre por venopunción en tubo con EDTA, ó en el procedimiento de aspirado de medula ósea se puede recolectar muestra en un tubo con EDTA.

2.- No congelar la muestra de sangre ó medula ósea obtenida.

3.- El RNA se obtendrá de las células mononucleares aisladas de la sangre total o de la medula ósea por el método físico, como lo es los diferentes gradientes de densidad (Ficoll Hypaque). Esta técnica recomienda el uso de QIAamp Blood Mini Kit (Quiagen).

4.- Con muestras de 24 horas de recolección, extraer el RNA de la muestra como lo describe en el manual de Quiagen QIAamp RNA Blood Mini Kit. Obteniéndose aproximadamente de 1×10^7 de células mononucleares de 5-10 μ g.

5.- Medir la concentración de RNA por densidad óptica a 260nm. En absorbancia de 1 unidad a 260nm corresponde a 40mg de RNA por ml ($A_{260}=1=40\mu\text{g/ml}$) ajustar la concentración de RNA a 0.1 $\mu\text{g/ul}$ con agua libre de RNAsas. Preparar dos alícuotas con 10 ul por tubo .Almacenar las alícuotas de RNA a -70°C.

6.3 Síntesis de cDNA por PCR amplificación maestra.

6.3.1.- Cada tubo de muestra libre de RNAasas contiene 1ug de RNA (disolver en 10ul de agua libre de RNAasas como se describió anteriormente) y agregar 4ul de solución primer cDNA mezclar lentamente con la pipeta en el fondo del tubo de reacción por 10 segundos.

Nota usar solo las pipetas que están destinadas en esta área de pre-amplificación.

6.3.2.- En un tubo aparte, libre de RNAasas pipetear 10 ul de agua libre de RNAasas y 4ul de la solución primer de cDNA (como control negativo).

6.3.3.-Incubar los tubos en un termociclador a temperatura de 65°C por 5 minutos, sacarlos y colocarlos en hielo.

6.3.4.- Pipetear 11ul de síntesis-mezcla de cDNA (ver lo siguiente) en cada tubo, mezclar con la pipeta una y otra vez por 10 segundos.

Síntesis-mezcla de cDNA por una muestra:

Si son 2 ó 3 muestras multiplicar por el número de muestras las cantidades abajo señaladas.

Nota prevenir la contaminación de la síntesis mezcla de cDNA cuando es preparada y alicuotada en una área separada nunca usar pipetas que hayan tenido contacto con algún DNA ó RNA (área 2 pre-amplificación)

5.0ul 5X MMLV-RT solución buffer

2.5ul 100 mM DTT

2.5ul dNTP mezcla (por cada 10nM)

1.0ul MMLV-Rt, 200 U/ul

Para compensar las variaciones de pipeteo y la pérdida de liquido en el interior de las paredes de los tubos, se recomienda la preparación de un 10 % más de la mezcla.

6.3.5.- Incubar a 37 °C por 45 minutos. (Sacar y colocar en hielo)

6.3.6.- Agregar 25 ul de agua destilada para diluir del cDNA.

6.3.7.- Incubar a 95 °C por 5 minutos para inactivar la enzima MMLV-RT.

6.3.8.- Sacarla y colocarla en hielo. Ahora la muestra está lista para la amplificación por PCR por Hema Vision Master-ó Split out, si la muestra no va ser procesada en el momento guardarla en congelación (4 a 8 °C) hasta su proceso.

6.4 PCR de amplificación maestra

Nota para lograr la máxima sensibilidad en la muestra de cada paciente y control negativo está sujeta a dos reacciones de PCR: La primera PCR maestra y la segunda PCR maestra anidada.

6.4.1 La primera PCR maestra

En la preparación de la primera reacción de mezcla maestra es como se menciona posteriormente. La primera PCR maestra consiste en 8 reacciones paralelas por cada muestra de paciente. Cada PCR contiene diferente solución primer (M-1PCR a M8PCR) cada una es específica para la síntesis de diferentes grupos de translocaciones ó rearrreglos cromosómicos. Colocar las 8 reacciones de PCR en el templete de cDNA (control negativo) este es preparado con las reacciones de PCR de muestras de pacientes.

6.4.1.1.- Determinar el número de reacciones de PCR (muestras de pacientes + control negativo) para ser corrección, por ejemplo 1 muestra de paciente y un control negativo = 16 reacciones de PCR.

Volumen transferido

6.4.1.2.- Preparar la primera mezcla maestra de polimerasa de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1 mezcla maestra de PCR polimerasa.

No de muestras + Control negativo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de reacciones De PCR	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
10x PCR buffer	44	66	88	110	132	154	176	196	218	240	262
Mezcla de dNTP	9	13	18	22	26	31	35	39	44	48	52
HotStarTaq DNA Polimerasa (5u/ul)	7	11	14	18	21	25	28	31	35	38	42
H2O destilada	205	307	409	511	613	715	817	911	1012	1113	1214
Volumen total	265	397	529	661	792	925	1056	1177	1309	1439	1570

El buffer 10X PCR es suplido con Quiagen HotStarTaq DNA polimerasa. Este contiene 15 mM de MgCl₂.

6.4.1.3.- Mezclar por pipeteo en el fondo del pozo, no formar burbujas.

6.4.1.4.- Tomar una tira de 8 tubos y dispensar M1 a M8.

6.4.1.5.- Transferir la primera mezcla maestra de polimerasa en cada uno de los 8 tubos de reacción. El volumen transferido es determinante para el número de muestras a analizar de acuerdo en la tabla II. Por ejemplo para una muestra de paciente y un control negativo agregar 32 ul de la primera mezcla maestra de polimerasa en los 8 tubos. (Ver la tabla II).

Tabla II .Primera mezcla maestra de polimerasa de PCR transferir el volumen.

Número de muestras + control negativo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volumen transferido	32	48	64	80	96	112	128	144	160	176	192

6.4.1.6.- Agregar la solución maestra primer (M1-PCR a través de M8-PCR I) a los tubos correspondientes que contienen la primera mezcla maestra de polimerasa. El volumen agregar es determinado por el número de muestras a ser analizadas de acuerdo a la tabla III. Por ejemplo una muestra de paciente y un control negativo, agregar 11 ul de M1-PCR I al tubo 1, y agregar 11ul de M2-PCR I al tubo 2,y así sucesivamente. La nueva mezcla contiene la mezcla polimerasa y el primer de PCR que es llamada mezcla de reacción.

Tabla III. Volumen de solución primer maestra

Número de muestras + control negativo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volumen alícuotado	11	16	21	27	32	37	43	48	54	59	64

6.4.1.7.- Rotular cada una de la tiras de 8 tubos de muestra y del control negativo, el lugar de la tira y el tubo de reacción.

6.4.1.8.-Agregar con la pipeta 20 ul de la mezcla de reacción y mezclar por pipeteo sin formar burbujas. Transferir 20 ul de mezcla de reacción a cada tubo de la tira de muestra y control negativo.

6.4.1.9.- Agregar 5 ul de la muestra de cDNA a cada uno de los 8 tubos de reacción en la tira. Repetir el procedimiento para todas las muestras. Usar pipetas con filtro dedicadas únicamente para pre-amplificación.

6.4.1.10.- Agregar 5 ul del control negativo preparado anteriormente a cada tubo de los 8 de control negativo.

6.4.1.11.- Colocar los tubos en el termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 9600 e iniciar inmediatamente la amplificación por PCR usando los parámetros de ciclado que están en la tabla IV.

Tabla IV. Parámetros de amplificación de PCR maestra.

Paso	Tiempo/Temperatura	Ciclos
1	15 minutos a 95 °C	1
2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 minuto 30 segundos a 72 °C	25
3	terminar en 4 °C	1

6.4.2 Reacción de amplificación maestra PCR anidada

6.4.2.1.- preparar el número de reacciones de PCR como en el paso (1)

6.4.2.2.- Preparar la mezcla de polimerasa anidada de acuerdo a la tabla V.

Tabla V: Mezcla de polimerasa anidada

No de muestras + Control negativo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de reacciones De PCR	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
10x PCR buffer	44	66	88	110	132	154	176	196	218	240	262
Mezcla de dNTP	9	13	18	22	26	31	35	39	44	48	52
HotStarTaq DNA Polimerasa (5u/ul)	7	11	14	18	21	25	28	31	35	38	42
H2O destilada	275	412	550	687	824	961	1099	1225	1361	1497	1633
Volumen total	335	502	670	837	1003	1171	1338	1491	1658	1823	1989

6.4.2.3.- Mezclar en el pozo por pipeteo varias veces sin formar burbujas.

6.4.2.4.- Tomar la tira con 8 tubos y rotularla con M1 a M8.

6.4.2.5.- Transferir la mezcla de polimerasa anidada a cada uno de los 8 tubos. El volumen transferido es determinado por el número de muestras a analizar como esta en la tabla VI. Por ejemplo para una muestra de paciente y un control negativo agregar 40 ul de la mezcla de polimerasa anidada en cada uno de los 8 tubos.

Tabla VI: Transferir el volumen de la mezcla de polimerasa anidada.

Número de muestra + control negativo	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volumen transferido	40	61	81	102	122	142	162	183	203	224	244

6.4.2.6.- Agregar la solución de primer anidado (M1-PCR II a través de M2-PCR II) en el tubo correspondiente que contiene la mezcla de polimerasa anidada, el volumen a agregar es de terminado por número de muestras a analizar de acuerdo a la tabla VII. Por ejemplo para una muestra de paciente y un control negativo agregar 11 ul de M1-PCR II al tubo 1 , y agregar 11 ul de M2 PCR II al tubo 2 y así sucesivamente. La nueva mezcla (Mezcla de polimerasa anidada + premier) es llamada mezcla reacción anidada.

Tabla VII: Volumen de solución de primer anidado

Número de muestras	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volumen a alícuotar	11	16	21	27	32	37	43	48	54	59	64

6.4.2.7 Etiquetar la tira de 8 de muestra más la de un control negativo. La tira de tubos introducirla a un rack.

6.4.2.8 Usando una pipeta multicanal colocar y repartir 24 ul, mezclar la reacción anidada por pipeteo sin formar burbujas. Transferir 24 ul de esta mezcla a cada una de las muestras en la tira y al control negativo de la tira.

NOTA: transferir el rack con los tubos al cuarto de preparación de reactivos en el área 3 dedicada a transferir los productos de PCR para la previa First Master PCRs en la Nested Master PCRs.

6.4.2.9 Usando una pipeta multicanal transferir 1.0 ul de cada una de las reacciones de la First Master PCR a su correspondiente tubo de Nested master PCR.

6.4.2.10 Colocar los tubos al interior del termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 9600 e iniciar inmediatamente la reacción de amplificación usando los parámetros de ciclado que se indican en la tabla VIII.

Tabla VIII: Nested Master PCR parámetros de amplificación

PASO	TIEMPO/TEMPERATURA	CICLOS
1	15 MINUTOS 95 °C	1
2	30 SEGUNDOS A 95 °C 30 SEGUNDOS A 58 °C 1 MINUTO 30 SEGUNDOS A 72 °C	20
3	10 MINUTOS A 72 °C	1
4	LLEVAR A 4 °C	1

6.5 Detección de productos de Master PCR en las reacciones amplificadas

6.5.1 Preparar un gel de azarosa al 1.5 % de 10 centímetros de largo en 1 x TBE buffer y agregar bromuro de etidio en concentración final de 0.5 ug/ml.

6.5.2 Agregar 3 ul de buffer de carga al interior de los tubos que contienen la reacción First Nested master PCR. Cargar aproximadamente 14 ul al interior del gel. Por conveniencia en la interpretación se recomienda cargar las 8 reacciones de PCR de una muestra (en la línea 1-8) seguido el marcador de peso molecular.

6.5.3 Correr el gel en 1 x TBE buffer hasta que el azul de bromofenol haya emigrado $\frac{3}{4}$ partes del gel.

6.5.4 Examinar el gel a través de un transiluminador y documentarlo en fotografía.

6.6 Interpretación de resultados de las reacciones de amplificación master PCR

Cada una de las 8 reacciones identifica un número de translocaciones. Para identificar la translocación específica usar la amplificación de PCR Split-out, la Split out es una solución primer específica para cada translocación.

La presencia de un producto específico en una de las 8 líneas para cada una de las muestras a determinar las cuales corresponden a la solución primer Split out pueden ser usadas para la amplificación de PCR Split out (ver figura 1) 1). Por un instante una banda específica en la línea 2 significa que la solución primer de Split out puede utilizarse M2A-M2E y así sucesivamente.

Importante: El fragmento del control interno de 911 pb puede ser amplificado en todas las líneas.

La intensidad del fragmento de PCR control interno puede disminuir en presencia de productos específicos de translocaciones

La presencia de una mancha débil de fragmentos de PCR pueden ser no interpretados como una translocación específica. Porque Hama Vision es un sistema múltiple basado en manchas débiles ó bandas tenues que pueden ser observadas ocasionalmente. En el caso de tener duda de la amplificación de la PCR Split out se puede verificar.

Para algunos de los genes involucrados en translocaciones específicas de leucemias más que en un punto de rompimiento han sido descritas. Para los puntos de rompimiento que son

separados por varios cientos pares de bases, aquí se ha designado la detección individual de primers que tienen una alta sensibilidad. Sin embargo por razones semejantes como la existencia de variantes de empalme, unas pocas de translocaciones detectadas por Hema Vision Kit pueden aparecer en más de una reacción master. Cuando más de una reacción Master muestra una amplificación específica, se recomienda correr todas las reacciones de Split out correspondientes. La interpretación de las reacciones de Split out (usar la tabla de interpretación) pueden tener una translocación.

En la tabla siguiente se muestra una lista de las translocaciones que en teoría pueden aparecer en más de una reacción Master (Split out) y solo puede aparecer como un fragmento grande en el Split-out:

Split-out	Translocación	Solo aparece en el Split out	Pero se interpreta como
M1D	t(10;11)	M2D o M5B	M1D
M2D	t(10;11)	M5B	M2D
M2C	t(11;19)	M5C	M2C
M5D	t(9;11)	M2E	M5D
M7D	t(3;21)	M4B o M8B	M7D
M4B	t(3;21)	M8B	M4B
M8C	t(15;17)	M4D	M8C
M6A	inv(16)	M7C	M6A
M6B	t(9;22)	M8E	M6B

Síntesis de cDNA para amplificación Split out

Para la síntesis del cDNA por favor ver la sección 6.3.

La PCR amplificada Split out.

Para conseguir la máxima sensibilidad en cada muestra de paciente y del control negativo están sujetas a dos reacciones de PCR : la primera PCR Split-out y la PCR anidada Split-out.

La primer PCR Split out

El volumen de la mezcla polimerasa Split-out depende del número de reacciones de PCR Master mostrando un producto específico de una translocación, el número de muestras paciente que serán analizadas y el número de controles negativos a preparar. La reacción del control negativo es preparada para cada mezcla de Split out (ver la figura 3) la siguiente tabla muestra la preparación de la primera mezcla polimerasa Split-out para una reacción.

Tabla IX primera mezcla polimerasa Split-out

Para compensar la variación en el pipeteo y la pérdida de líquido en el interior de los pozos se recomienda preparar un 10 % más de la mezcla.

Mezclar la Polimerasa-mezcla por pipeteo hacia arriba y hacia abajo varias veces.

Colocar las tiras de tubos de reacción PCR de 0.2 ml correspondiente al número de tubos con su respectiva solución primer Split-out. Colocar una por una de las muestras teniendo la reacción positiva específica en la amplificación Master y colocar una por cada tipo de Split-out (para control negativo) (ver la figura 3).

Transferir 15 ul de la mezcla polimerasa del primer Split-out por cada tubo.

Por cada muestra y control negativo 5 ul de la primera solución identificada primer Split-out colocar (MX)-PCR I son adicionados a los tubos. Un ejemplo se muestra en la figura 3. Para una muestra primera solución Split-out M3A-PCR I es adicionado al tubo número 1, M3B en

el tubo número 2 y así sucesivamente. Por ejemplo 2, la primera solución Split-out M1A pipetear al tubo número 1, M1B en el tubo número 2, etc.

NOTA: transferir el rack con los tubos al cuarto de preparación de reactivos con el cDNA sintetizado al área 1.

Agregar 5 ul del cDNA muestra a cada uno de los 8 tubos que contienen la solución primer y la mezcla de polimerasa Split-out. Agregar 5 ul del cDNA del control negativo a cada uno de los tubos de control negativo.

NOTA: transferir el rack con los tubos al cuarto de preparación de reactivos en el área 3 dedicada a transferir los productos de PCR para la previa First Master PCRs en la Nested Master PCRs

Tabla X: Parámetros de la primera amplificación de PCR Split-out

PASO	TIEMPO/TEMPERATURA	CICLOS
1	15 MINUTOS 95 °C	1
2	30 SEGUNDOS A 95 °C 30 SEGUNDOS A 58 °C 1 MINUTO 30 SEGUNDOS A 72 °C	25
3	LLEVAR A 4 °C	1

La reacción de PCR anidada Split-out

El volumen de la mezcla de polimerasa anidada Split-out depende del número de reacciones PCR Split-out preparar como en 6.8. La preparación de la mezcla de una muestra es como se muestra a continuación (tabla XI).

Tabla XI Mezcla polimerasa anidada Split-out

REACTIVO	1 REACCION
10 x PCR buffer	2.5 ul
dNTP mezcla (10mM cada una)	0.5 ul
HotStarTaq DNA Polimerasa (5 unidades/ul)	0.4 ul
ddH2O	15.6 ul

Para compensar la variación en el pipeteo y la pérdida de líquido en el interior de los pozos de los tubos, se recomienda preparar un 10 % más de la mezcla.

mezclar la mezcla de polimerasa Split-out por pipeteo hacia arriba y hacia abajo varias veces.

Colocar el número de tiras con tubos de 0.2 ml para PCR como en 6.8.1.2.

Transferir 19 ul de la mezcla polimerasa Split-out a cada tubo.

Por cada muestra y control negativo 5 ul de la solución primer Split-out a identificar colocar (MX)-PCR II son adicionados a los tubos. Por ejemplo 1, solución primer Split-out M3A-PCR I es agregado al interior del tubo 1, M3B al interior del tubo 2 y así sucesivamente. Para la muestra 2 la solución primer Split-out M1A es agregada al interior del tubo número 1, M1B es agregada al interior del tubo numero 2 y así sucesivamente.

NOTA: transferir el rack con los tubos al cuarto de preparación de reactivos en el área 3 dedicada a transferir los productos de PCR para la previa PCRs Split-out en la Nested Split-out PCRs.

Agregar 1 ul de cada una de las reacciones de PCR primer Split-out a cada uno de los tubos colocar el contenido correspondiente de la solución primer y mezcla de polimerasa anidada Split-out.

Colocar los tubos al interior del termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 9600 e iniciar inmediatamente la reacción de amplificación usando los parámetros de ciclado que se indican en la tabla XII.

Tabla XII: Parámetros de PCR Split-out anidada

PASO	TIEMPO/TEMPERATURA	CICLOS
1	15 MINUTOS 95 °C	1
2	30 SEGUNDOS A 95 °C 30 SEGUNDOS A 58 °C 1 MINUTO 30 SEGUNDOS A 72 °C	20
3	10 minutos a 72 °C	
4	LLEVAR A 4 °C	1

Detección por electroforesis en un gel de agarosa.

Preparar un gel de agarosa al 1.5 % de 10cm de largo en 1 x TBE buffer, agregar bromuro de etidio con una concentración final de 0.5 ug/ml.

Agregar 3 ul de buffer de carga a cada una de las reacciones PCR Split-out. Cargar con 14 ul al interior del gel. Para conveniencia de interpretación se recomienda cargar las reacciones de PCR de una muestra seguido del marcador de peso molecular.

6.5.3 Correr el gel en 1 x TBE buffer hasta que el azul de bromofenol haya emigrado $\frac{3}{4}$ partes del gel.

6.5.4 Examinar el gel a través de un transiluminador y documentarlo en fotografía.

7. INTERPRETACION

El fragmento de control interno es de 911 pares de bases y puede ser amplificado en todas las líneas.

Checar el fragmento del control interno para la integridad de la muestra de RNA y por la presencia de inhibidores de PCR. La amplificación débil del fragmento de control interno en la ausencia de fragmentos de una translocacion especifica puede ser causada por una degradación del templete de RNA o la presencia de contaminantes genómicos de DNA en la preparación de RNA.

La presencia de fragmentos de PCR de una translocacion especifica en una de las líneas muestra que la muestra de RNA contienen la translocacion definida por el par de primer especifico en la reacción de PCR Split-out. La interpretación se muestra en la siguiente tabla que contiene la información para verificar cual translocacion es identificada por al par primer particular Split-out. Este ensayo de prueba de 28 translocaciones ó rearrreglos cromosomales los cuales pueden resultar en la generación de más de 28 variantes de genes de fusión de mRNA debido a la heterogeneidad de los puntos de rompimiento y al splicing alternativo. Como una consecuencia del número de translocaciones positivas en fragmentos largos de PCR.

En la tabla 1 se muestran las 8 mezclas de primer utilizados en la que se muestran los distintos genes afectados en caso de una translocación positiva para alguno de ellos, en la tabla 1 del Split-out se muestran individualmente cada uno de los primer utilizados para determinar la especificidad de la translocación, por ejemplo si resulta positivo para M6 tendremos que realizar una segunda RTPCR para las 5 mezclas que encierra a M6 y así determinar específicamente de que translocación se está determinando; si diera positiva para M6B estaríamos hablando de t(9;22)(q34;q11) genes involucrados BCR(22q11) ABL(9q34); fusión del gen y tamaño correspondiente del fragmento de PCR (pares de bases) BCR/ABLb2a2: 397pb, BCR/ABL3a2:472pb, BCR/ABLc3a2: 1012 pb, BCR/ABLb2a3: 223pb, BCR/ABLb3a3: 298 pb, y así sería para cada uno de M1 a M8 posteriormente los Split-out de M1 a M8.⁽⁴⁸⁾

HemaVision Screen es una prueba múltiple de RT-PCR cualitativa, diseñada para el Screen de 28 diferentes translocaciones o rearrreglos de los cromosomas, incluyendo más de 80 puntos de ruptura ó variantes de Splice, encontrándose subtipos particulares y específicos de leucemias agudas o crónicas

t(1;11)(q21; q23)	MLL/AF1q
t(1;19)(q23; p13)	E2A/PBX1
t(3;21)(q26; q22)	AML/EAP/MDS/EVI1
t(3;5)(q25.1; q34)	NPM/MLF1
t(4;11)(q21; q23)	MLL/AF4
t(5;12)(q33; p13)	TEL/PDGFRb
t(5;17)(q35; q21)	NPM/RAR α
t(6;11)(q27; q23)	MLL/AF6
t(6;9)(p23; q34)	DEK/CAN
t(8;21)(q22; q22)	AML1/MGT8
t(9;11)(q22; q23)	MLL/AF9
t(9;12)(q34; p13)	TEL/ABL
t(9;22)(q34; q11)	BCR/ABL
t(9;9)(q34; q34)	SET/CAN
t(10;11)(p12; q23)	MLL/AF10
t(11;17)(q23; q21)	MLL/AF17
t(11;17)(q23; q21)	PLZF/RAR α
t(11;19)(q23; p13.1)	MLL/ELL
t(11;19)(q23; p13.3)	MLL/ENL
t(12;21)(p13; q22)	TEL/AML1
t(12;22)(p13; q11)	TEL/MN1
t(15;17)(q22; q21)	PML/RAR α
t(16;21)(q11; q22)	TLS/ERG
t(17;19)(q22; p13)	E2A/HLF
inv(16)(p13; q22)	CBFB/MYH11
t(X;11)(q13; q23)	MLL/AFX
TAL1deletion(p34)	SIL/TAL1

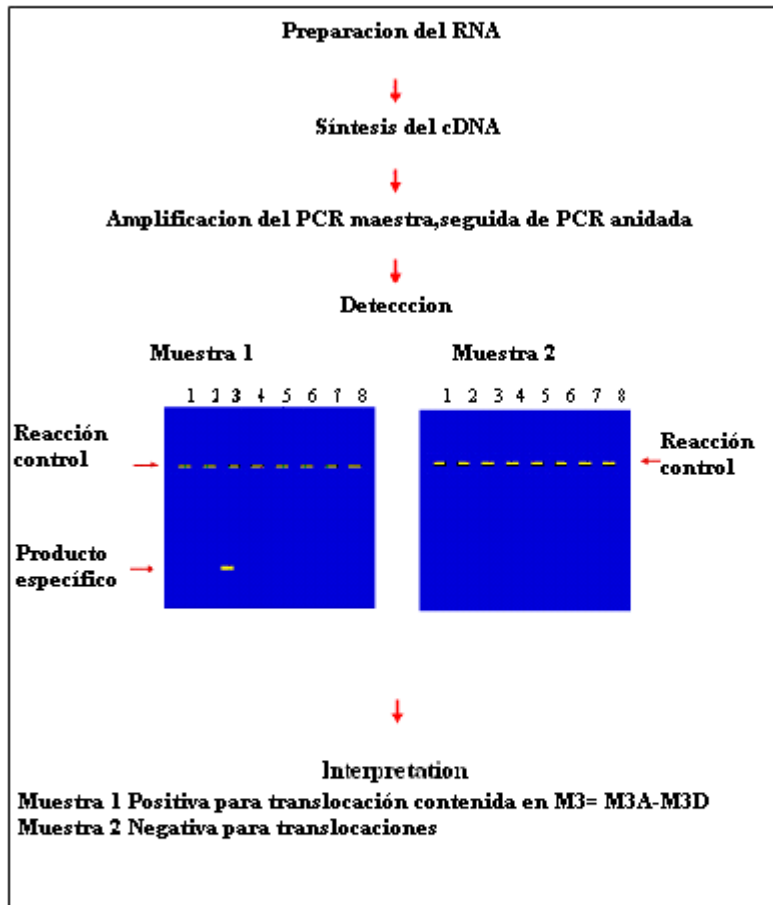
Todos los Kits estan CE-Hechos y identificados con IVD "Para procedimientos de diagnostico invitro"

Descripcion de la técnica

El RNA total es utilizado como templete para la síntesis de cDNA, con un total de ocho reacciones de amplificación múltiples y paralelas llamadas (amplificación maestra de PCR), seguida subsecuentemente por una reacción de amplificación de PCR anidada.

Los resultados de los productos de PCR son examinados por electroforesis en un gel de agarosa; y la presencia de una banda característica y específica determina un tipo de translocación.

HemaVision-Screen carta de seguimiento, ilustración de los pasos involucrados en el Screen de las 28 diferentes translocaciones.



Como se ilustra arriba la muestra 1, el resultado del fragmento de PCR en la línea 3 (M3), esto indica que una de las translocaciones que están contenidas en M3 ha sido identificada en la muestra 1. La translocación puede ser identificada, utilizando un splice específico que contiene el splice-out primer que está en el Kit de HemaVision. Cada reacción de PCR contiene un control interno positivo que resulta en un fragmento de 911 pares de bases. El fragmento de control de PCR resulta de la amplificación de la secuencia de RNA que está presente en todas las muestras de RNA. Estas reacciones control chequean la integridad del RNA de la muestra y la presencia de inhibidores de PCR.

En las tablas de interpretación se muestran las ocho combinaciones de mezclas de reacción, que se utilizan para realizar el primer Split out (Tabla 1) y en caso de que resulte positiva para alguna de ellas, se realiza la segunda reacción específica para cada mezcla por ejemplo si es positiva para el Split M4, se emplearán las mezclas de M4 (Tablas Split out) las cuales la constituyen M4A, M4B, M4C, M4D y de esta reacción si fuera positiva para M4D, esta pertenece a t(15;17)(q21;q22) PML(15q22) RAR .1 q21) y así para cada una de las mezclas.

Tabla 1: tabla de interpretacion

M1		
Mezcla	Translocacion	Genes
M1A	t(X;11)(q13;q23)	MLL1(11q23) AFX1(X;q13)
M1B	t(6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23) AF6(6q27)
M1C	t(11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23) ELL(19p13.1)
M1D	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)

M5		
Mezcla	Translocaciones	Genes
M5A	t(4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF4(4q21)
M5B	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)
M5C	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)
M5D	t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)
M5E	t(1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF1q(1q21)

M2		
Mezcla	Translocacion	Genes
M2A	t(1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23) AF-1p(1p32)
M2B	t(11;17)(q23;q21)	MLL1(11q23) AF-17(17q21)
M2C	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)
M2D	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)
M2E	t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)

M6		
MIX	TRANSLOCATION	GENES
M6A	inv(16)(p13;q22)	CBFβ (16q22) MYH11 (16p13)
M6B	t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)
M6C	t(9;12)(q34;p13)	TEL(12p13) ABL(9q34)
M6D	t(5;12)(q33;p13)	TEL(12p13) PDGFRβ(5q33)
M6E	t(12;22)(p13;q11)	TEL(12p13) MN1(22q11)

M3		
Mezcla	Translocacion	Genes
M3A	t(1;19)(q23;p13)	E2A(19p13) PBX1(1q23)
M3B	t(17;19)(q22;p13)	E2A(19p13) HLF(17q22)
M3C	t(12;21)(p13;q22)	TEL(12p13) AML1(21q22)
M3D	TAL1 ^d (40 kb deletion)	SIL1(1p34) TAL1(1p34)

M7		
Mezcla	Translocaciones	Genes
M7A	t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) CAN(9q34)
M7B	t(9;9)	SET(9q34) CAN(9q34)
M7C	inv(16)(p13;q22)	CBFβ (16q22) MYH11 (16p13)
M7D	t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVII (3q26)

M4		
Mezcla	Translocacion	Genes
M4A	t(8;21)(q22;q22)	AML1(21q22) MGT8(8q22)
M4B	t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVII (3q26)
M4C	t(16;21)(p11;q22)	TLS(16p11) ERG(21q22)
M4D	t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARα(17q21)

M8		
Mezcla	Translocaciones	Genes
M8A	t(11;17)(q23;q21)	PLZF(11q23) RARα(17q21)
M8B	t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVII (3q26)
M8C	t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARα(17q21)
M8D	t(5;17)(q35;q21)	NPM(5q35) RARα(17q21)
R8E	t(3;5)(q25.1;q34)	NPM(5q35) MLF1(3q25.1)
M8F	t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)

Table 1: Tabla de interpretacion

Split-out M1

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y MEDIDA DE LOS CORRESPONDIENTES FRAGMENTOS DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M1A	t(X;11)(q13;q23)	MLL1(11q23) AFX1(X;q13)	MLL ex 8/AFX: 491 bp	1
M1B	t(6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23) AF6(6q27)	MLL ex 6/AF6: 308 bp MLL ex 7/AF6: 441 bp	2; 3
M1C	t(11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23) ELL(19p13.1)	MLL ex 7/ELL: 464 bp MLL ex 7/ELL-ins120: 584 bp MLL ex 8/ELL-ins120: 697 bp	4; 5; 6
M1D	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)	MLL ex 6/AF10 (589): 267 bp	9; 10

Split-out M2

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y MEDIDA CORRESPONDIENTE DEL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M2A	t(1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23) AF-1p(1p32)	MLL ex 6/A F-1p: 183 bp	7
M2B	t(11;17)(q23;q21)	MLL1(11q23) AF-17(17q21)	MLL ex 5/AF-17: 303bp	8
M2C	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)	MLL ex 6/ENL(A): 186 bp MLL ex 7/ENL(A): 318 bp MLL ex 8/ENL(A): 432 bp	30; 32; 34
M2D	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)	MLL ex 6/AF10 (979): 268bp MLL ex 7/AF10 (979): 400bp MLL ex 6/AF10 (883): 364bp MLL ex 7/AF10 (883): 496bp MLL ex 6/AF10 (787): 460bp	9; 10; 12
M2E	t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)	MLL ex 6/AF-9(B): 367 bp	3; 30; 35

Split-out M3

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y TAMAÑO CORRESPONDIENTE AL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M3A	t(1;19)(q23;p13)	E2A(19p13) PBX1(PRL)(1q23)	E2A/PBX : 376 bp E2A/PBX (ins 27 bp): 403 bp	13; 14; 15
M3B	t(17;19)(q22;p13)	E2A(19p13) HLF(17q22)	E2Aex12/HLFex4: 207 bp E2Aex13/HLFex4(ins59): 389 bp E2Aex13/HLFex4(ins87): 417 bp	16; 17; 18
M3C	t(12;21)(p13;q22)	TEL(12p13) AML1(21q22)	TEL/AML1ex2: 428 bp TEL/AML1ex2Δex3: 174 bp (Splice variant) TEL/AML1ex3: 389 bp TEL/AML1ex3Δex3: 135 bp (Splice variant)	19; 20; 21; 55
M3D	TAL1 ^d (40 kb deletion)	SIL1(1p34) TAL1(1p34)	SIL/TAL d1+d2: 184 bp	22; 23

Split-out M4

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y TAMAÑO CORRESPONDIENTE AL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M4A	t(8;21)(q22;q22)	AML1(21q22) MGT8(ETO)(8q22)	AML1 ex5/MGT8(ETO): 197 bp	24; 25; 26
M4B	t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) MDS1(3q26)	AML1ex5/MDS: 291 bp AML1ex6/MDS: 483 bp	25; 27; 28
M4C	t(16;21)(p11;q22)	TLS(16p11) ERG(21q22)	a: TLS(ins44bp,ex7)/ERG(ex9): 313 bp b : TLS(ex7)/ERG(ex9): 269 bp c : TLS(ex6)/ERG(ex9): 234 bp d : TLS(ex8)/ERG(ex7): 407 bp	29; 57
M4D	t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22) RARα(17q21)	PML ex3/ RARα ex3: 325 bp PML ex3& RARα ex3: <325 bp (splice variants)	50; 51; 52

Split-out M5

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y TAMAÑO CORRESPONDIENTE AL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M5A	t(4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF4(4q21)	MLL ex 6/AF-4 (1414): 319 bp MLL ex 7/AF-4 (1414): 451 bp MLL ex 8/AF-4 (1414): 565 bp MLL ex 6/AF-4(1459): 277 bp MLL ex 7/AF-4(1459): 409 bp MLL ex 8/AF-4(1459): 523 bp MLL ex 7/AF-4(1546): 322bp MLL ex 8/AF-4(1546): 436bp	30; 31; 32; 33
M5B	t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23) AF10(10p12)	MLL ex 5/AF10 (2222): 202 bp MLL ex 6/AF10 (2110): 388 bp MLL ex 5/AF10 (1931): 493 bp	9; 10; 11
M5C	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23) ENL(19p13.3)	MLL ex 6/ENL(B): 315 bp	30; 34
M5D	t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23) AF9(9q22)	MLL ex 6/AF-9(A): 322 bp MLL ex 7/AF-9(A): 454 bp MLL ex 8/AF-9(A): 568 bp	3; 30; 35
M5E	t(1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23) AF1q(1q21)	MLL ex 6/AF-1q: 400 bp	36

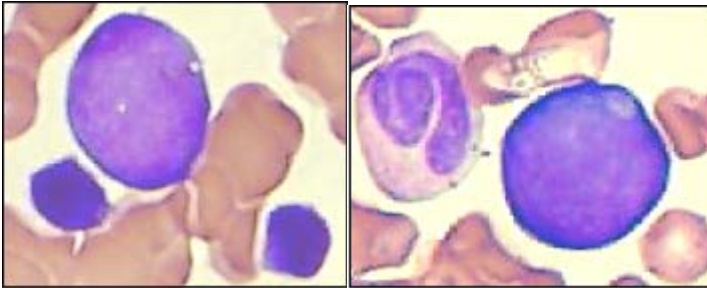
Split-out M6

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y TAMAÑO CORRESPONDIENTE DEL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M6A	inv(16)(p13;q22)	CBFβ (16q22) MYH11 (16p13)	CBFβ/MYH11(D): 288 bp CBFβ/MYH11(E): 495 bp CBFβ/MYH11(G): 192 bp CBFβ/MYH11(H): 299 bp	47
M6B	t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL(9q34)	BCR/ABLb2a2: 397 bp BCR/ABLb3a2: 472 bp BCR/ABLc3a2: 1012 bp BCR/ABLb2a3: 223 bp BCR/ABLb3a3: 298 bp	37; 38; 39
M6C	t(9;12)(q34;p13)	TEL(12p13) ABL(9q34)	TEL/ABL (A): 595 bp TEL/ABL(B): 1141 bp	40; 41
M6D	t(5;12)(q33;p13)	TEL(12p13) PDGFRβ(5q33)	TEL/PDGFRβ: 464 bp	42
M6E	t(12;22)(p13;q11)	TEL(12p13) MN1(22q11)	TEL/MN1(1): 243 bp TEL/MN1(2): 408 bp	43

Split-out M7

PCR MIX	ALTERACION CROMOSOMAL	GENES INVOLUCRADOS	FUSION DEL GEN Y TAMAÑO CORRESPONDIENTE AL FRAGMENTO DE PCR (pares de bases)	REFERENCIA
M7A	t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) CAN(9q34)	DEK/CAN: 320 bp	44
M7B	t(9;9)	SET(9q34) CAN(9q34)	SET/CAN: 393 bp	45; 46
M7C	inv(16)(p13;q22)	CBFβ (16q22) MYH11 (16p13)	CBFβ/MYH11(A): 270 bp CBFβ/MYH11(B): 483 bp CBFβ/MYH11(C): 663 bp CBFβ/MYH11(F): 174 bp	47
M7D	t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EAP(3q26)	AML1 ex5/EAP: 127 bp AML1 ex6/EAP: 319 bp	25; 27; 28; 56

RESULTADOS



ANGEL GUZMAN LINFOBLASTOS (29) Por morfología se clasifica como LAL L2 y su inmunofenotipo es compatible con LLA de células T como se observa en la tabla 1. Mientras que el resultado de su análisis molecular es positiva para TALd, es una translocación que se presenta en un 25 % de los pacientes con LAL T, por lo que el resultado molecular es de gran valor diagnóstico, pues en este momento no se pudo realizar anticuerpos intracelulares como cCD3, cCD79a, cMPO.



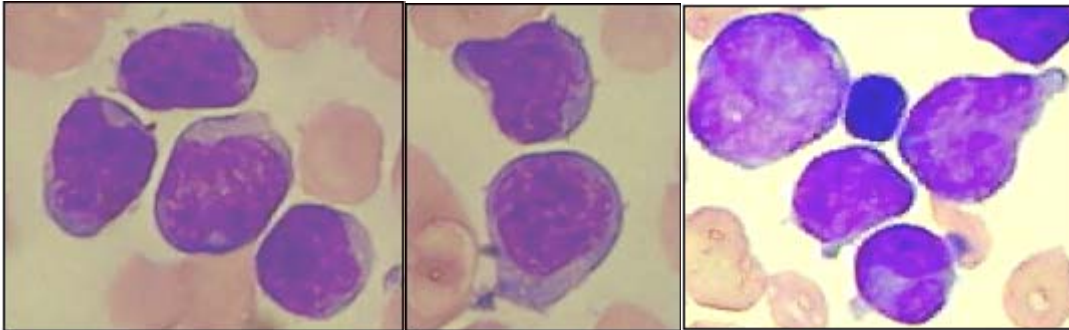
ANGEL GUZMAN POSITIVO PARA M3

Tabla 1

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P-gp(MDR)	CD41
0.11	0.8	96		41.8	0.62	51	0.44	4.4	4.36	2.31	0.86	NR	
2.16	4.66	99.9	0	4.34	87	12.7	7	7.2	1.37	0.12		NR	0.99
GLYCO		c.MPO	c.CD79	c.CD3	NO REALIZADOS								

Paciente de 12 años de edad de nombre Díaz Ojeda Adamaris Azarel, radicada en Salamanca Guanajuato. Antecedentes patológicos: crisis asmáticas hace 2 años, varicela a los 9 años de edad.

Inicia con palidez de tegumentos y mucosas y gingivorragia leve hace aproximadamente 3 meses. De dos meses a la fecha se acentuó la palidez de tegumentos y sintomatología de síndrome anémico, agregándose fiebre y pérdida de peso además de gingivorragia acentuada y manifestaciones de sangrado en piel (equimosis). Hipertrofia en encías con sangrado moderado, cardiopulmonar normal, abdomen plano blando despreciable sin palpase crecimiento viscerales, peristalsis normal equimosis en ambas rodillas y tibias, no edemas. Se palpan crecimientos ganglionares en cadenas laterales del cuello. BH Leucocitos 115 mil por mm³ y monoblastos en un 90 %, con 6 % segmentados, 2 % linfocitos y 2 % de mieloblastos, plaquetas 35,000/mm³. LAM M4 12-Nov-03, al 20-Abril-2004 no ha logrado remisión, con buenas condiciones generales



DIAZ OJEDA ADAMARIS AZAREL (17) Por morfología las células que se presentan son mieloblastos y monoblastos clasificables como LAM M4 y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 como se observa en la tabla 2. El análisis molecular fue positiva para t(11;19) y esta se asocia a LAM M4 y M5.



DIAZ OJEDA ADAMARIS AZAREL POSITIVO PARA M1, POSITIVO PARA M3 t(11;19)

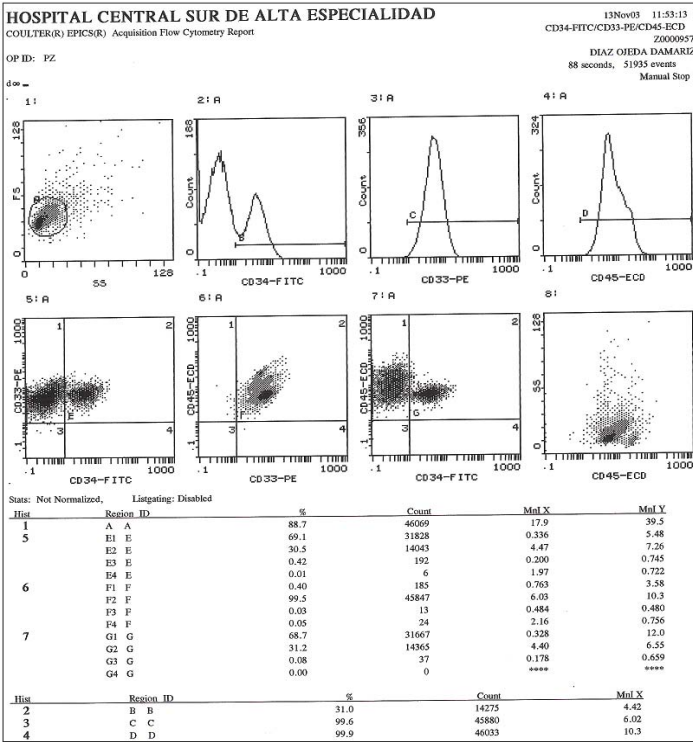
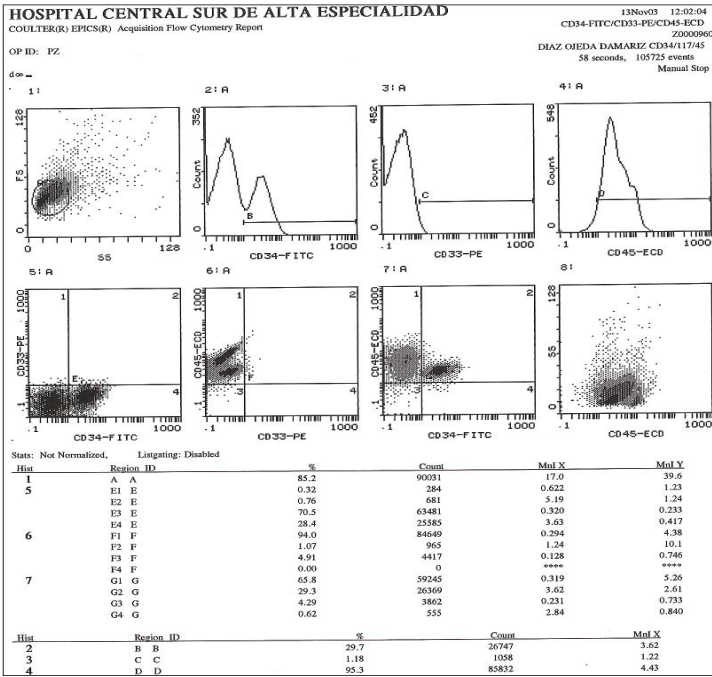
Tabla 2

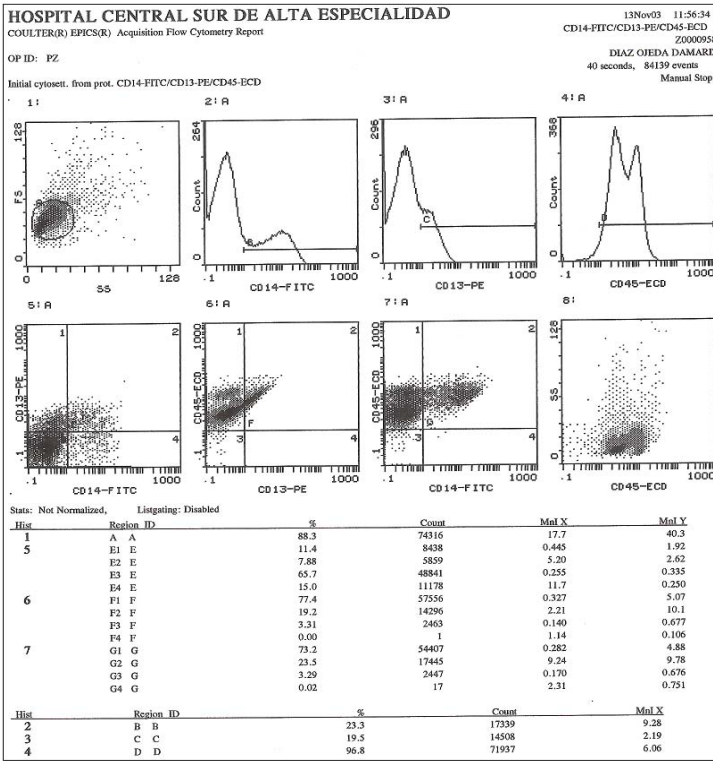
CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
23.3	19.4	96.8		29.7	1.18	0	0	4.8	1.57	3.97	6.82	NR	

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3

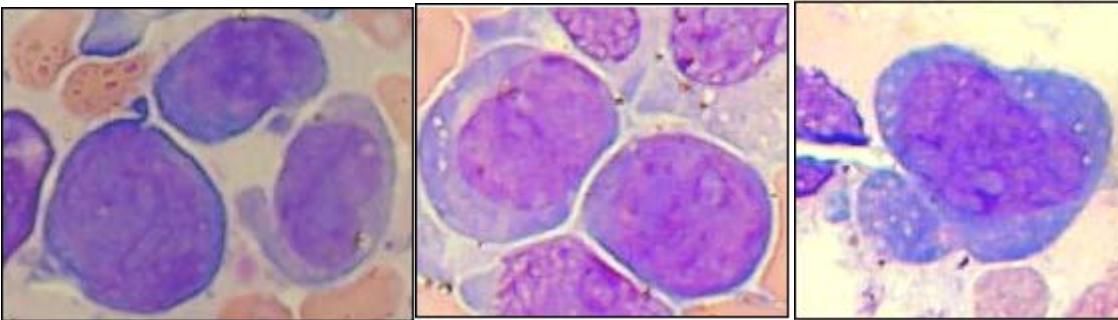
NO SE REALIZARON

Resultado de histogramas



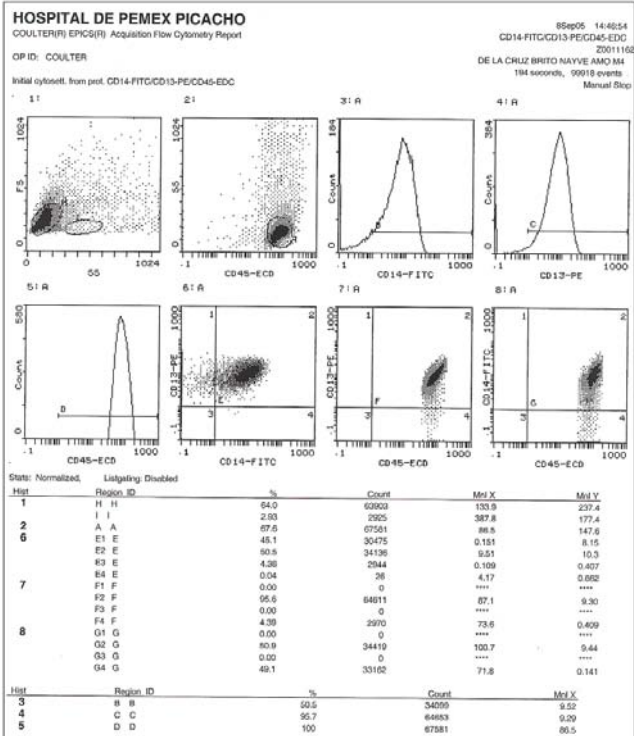
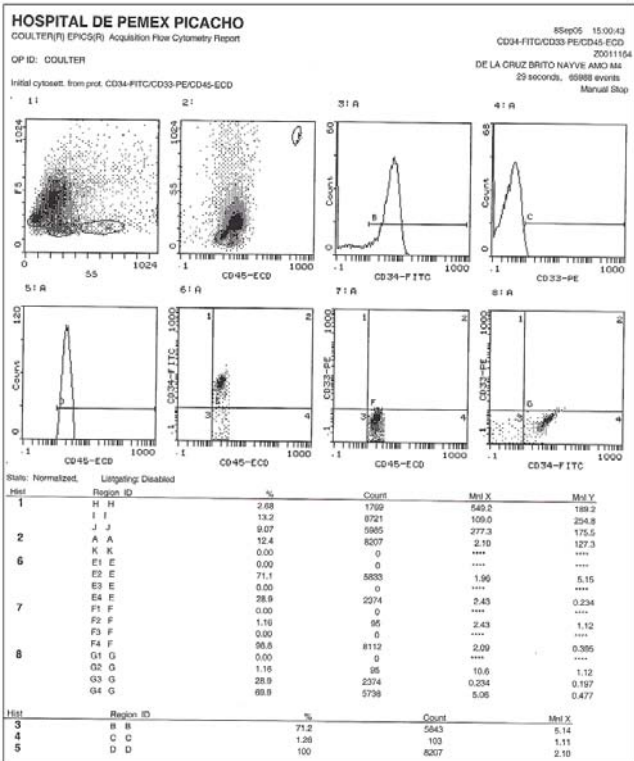


Paciente de 51 años asintomático a la hora de la visita, con adenopatías cervicales y supraclaviculares de hasta un 1 cm de diámetro, móvil no dolorosa, cardiopulmonar sin compromiso, abdomen con hepatoesplenomegalia, equimosis aisladas antiguas en miembros superiores e inferiores no se aprecian petequias, se refiere con AMO, celularidad aumentada con 93 % de blásts de estirpe mieloide

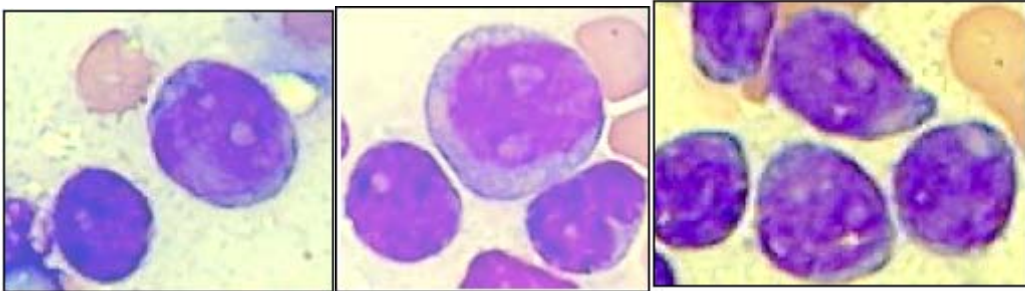


DE LA CRUZ BRITO NAGIVE (14). Por morfología se observan mieloblastos y monoblastos clasificándose como LAM M4 y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 como se observa en la tabla 3. El análisis molecular fue positivo para inv 16 y es la que normalmente se encuentra en pacientes con LAM M4.

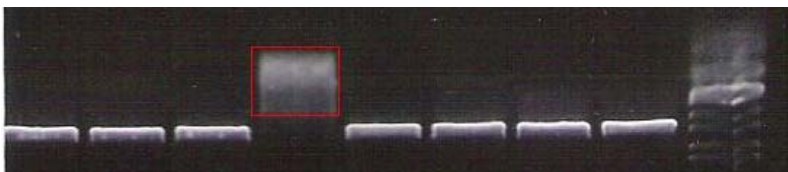




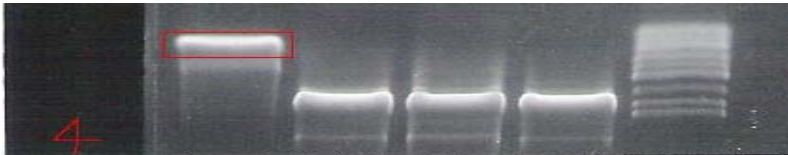
Paciente de años de edad con leucemia Linfoblástica Aguda Pre-B que ha sido manejado con quimioterapia y que ha presentado recaída en medula ósea y ahora en testículo en forma bilateral, sin dolor , no hay ataque general, ni síntomas de actividad tumoral. Sin adeno ni viceromegalias, sin dolor óseo LLA.



DOMINGUEZ BAUTISTA ERICK EDUARDO (19) LINFOBLASTOS PRO- PRE-B, por morfología se observan linfoblastos clasificándose como LAL L2 y el resultado de su inmunofenotipo es compatible con LAL Pro-Pre-B como se observa en la tabla 4, el resultado de su análisis molecular fue positivo para t(8;21).



DOMINGUEZ BAUTISTA ERICK EDUARDO POSITIVO PARA M1



DOMINGUEZ BAUTISTA ERICK EDUARDO POSITIVO PARA M1 t(8;21)

Tabla 4

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
0.08	0.01	100	0	25	0.04	3.2	96.6	1.3	1.93	16.2	33.3	0	2.12
0.5	0.04	99.4		70.4		23	71.7	12	11	8.32	73.4	0.21	
0	0.29	100	0	58.4	0	0.9	17.5	4.3	9.53	23	20.8	NR	0
GLYCO	c.MPO	c.CD79	c.CD3										
0.86	0.23	97.5	1.72										
0	0.05	5.01	47.8										

HOSPITAL DE PEMEX PICACHO

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

10Dec04 15:51:18

CD34-FITC/CD33-PE/CD45-EC

Z0009711

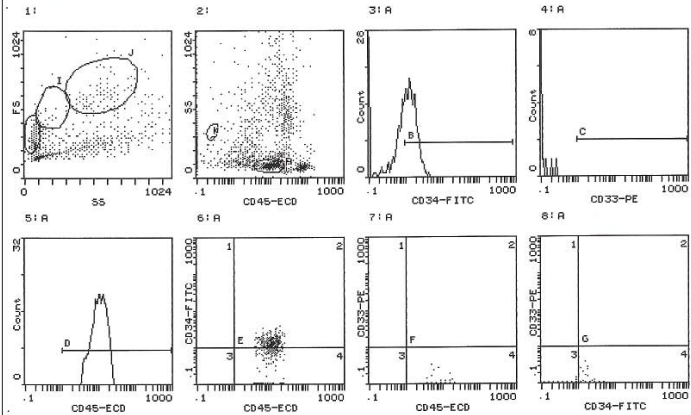
OP ID: COULTER

ERICK EDUARDO DOMINGUEZ AMO LLA

34 seconds, 2002 events

Manual Stop

Initial cytosect. from prot. CD34-FITC/CD33-PE/CD45-EC



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y
1	17.5	3522	67.0	286.2
2	13.6	2742	11.8	81.0
6	57.4	1575	12.1	1.73
7	42.6	1167	11.4	0.590
8	42.6	1167	0.590	0.107
3	58.4	1600	1.71	
4	0.00	0	****	
5	100	2742	11.8	

HOSPITAL DE PEMEX PICACHO

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

10Dec04 15:59:22

CD20-FITC/CD10PE/CD19-EC/CD45

Z0009714

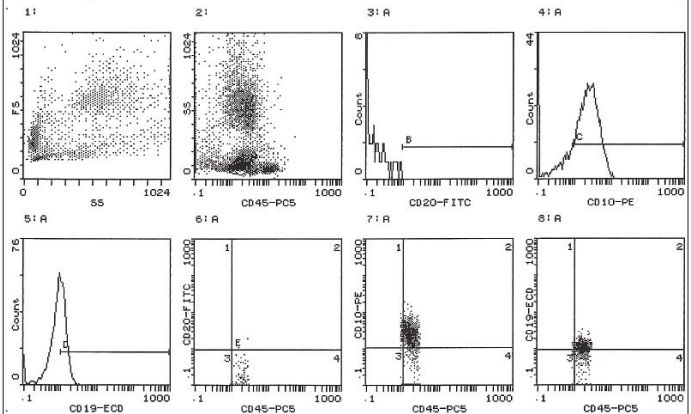
OP ID: COULTER

ERICK EDUARDO DOMINGUEZ AMO LLA

33 seconds, 4649 events

Manual Stop

Initial cytosect. from prot. CD20-FITC/CD10PE/CD19-EC/CD45



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y
6	0.27	17	2.18	1.42
7	4.88	311	0.967	3.73
8	28.1	1793	2.10	0.412
3	1.36	17	1.42	0.27
4	73.0	4653	2.75	3.21

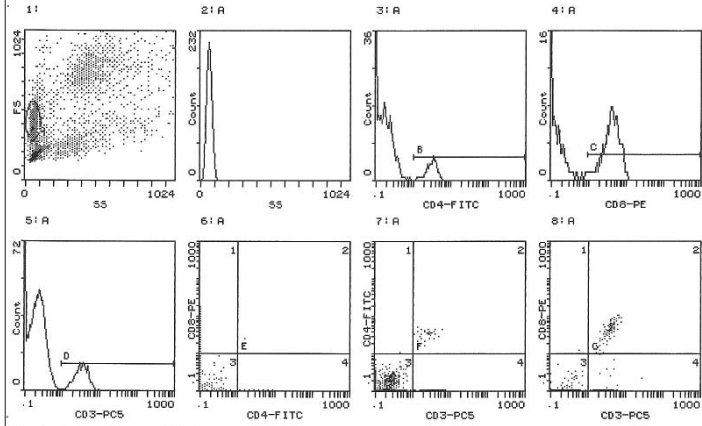
HOSPITAL DE PEMEX PICACHO

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

OP ID: COULTER

Initial cytosest. from prot. CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5

10Dec04 16:01:48
 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PC5
 Z0009715
 ERICK EDUARDO DOMINGUEZ AMO LLA
 18 seconds, 47858 events
 Manual Stop



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Region ID	Count	Mnl X	Mnl Y	%
1	9843	53.0	385.7	20.6
6	933	0.108	4.82	9.48
E1	2	1.39	1.83	0.02
E2	8485	0.134	0.115	86.2
E3	423	3.33	0.109	4.30
E4	22	0.542	2.21	0.22
F1	403	2.83	3.38	4.09
F2	8352	0.219	0.134	84.9
F3	1066	4.03	0.109	10.8
F4	6	0.675	1.65	0.06
G1	929	4.16	4.84	9.44
G2	8368	0.220	0.111	85.0
G3	540	2.92	0.162	5.49
G4				

Region ID	Count	Mnl X	%
3	424	3.33	4.31
4	938	4.81	9.53
5	1472	3.70	15.0

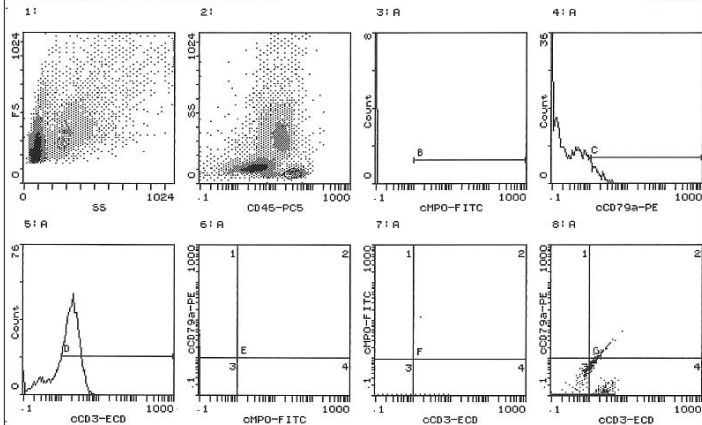
HOSPITAL DE PEMEX PICACHO

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

OP ID: COULTER

Initial cytosest. from prot. cMPO-FITC/cCD79a-PE/cCD3-ECD/45

16Dec04 13:14:12
 cMPO-FITC/cCD79a-PE/cCD3-ECD/45
 Z0009771
 ERICK EDUARDO DOMINGUEZ AMO LLA
 184 seconds, 157889 events
 Manual Stop



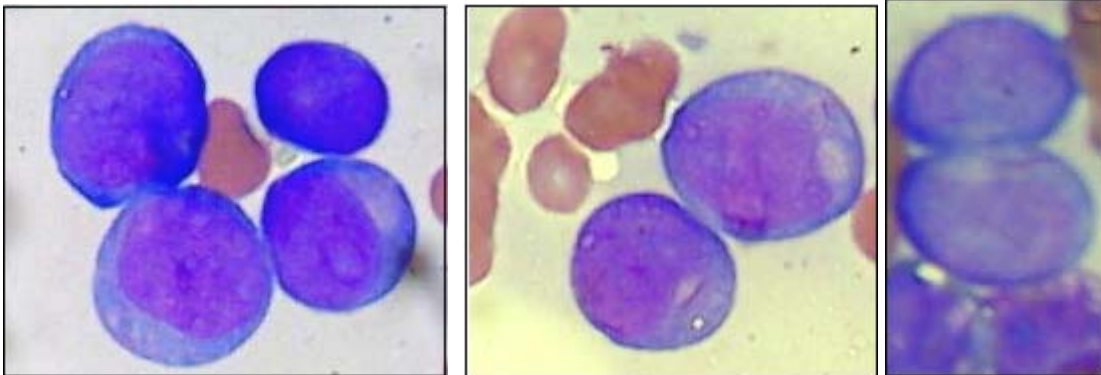
Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Region ID	Count	Mnl X	Mnl Y	%
2	7486	34.7	82.8	4.74
6	368	0.106	1.72	4.92
E1	0	****	****	0.00
E2	7114	0.106	0.184	95.0
E3	4	4.93	0.106	0.05
E4	0	****	****	0.00
F1	4	1.49	4.93	0.05
F2	1889	0.506	0.107	25.2
F3	5593	2.33	0.106	74.7
F4	0	****	****	0.00
G1	368	2.71	1.72	4.92
G2	1889	0.506	0.193	25.2
G3	5229	2.30	0.181	69.9
G4				

Region ID	Count	Mnl X	%
3	4	4.91	0.05
4	375	1.71	5.01
5	5997	2.33	74.8

Masculino de 53 años de edad, diabético de larga evolución en manejo con metformina, padeció paludismo a los 6 años de edad, en junio del presente año 16-Agosto-2005, documentaron absceso inguinal derecho que se drenó quirúrgicamente y con múltiples manejo de antibiótico no especificados en el envío, lo refieren con anemia, que amerita transfusión en tres ocasiones actualmente reportan Hb 8.5 gr/dL

Hombre de 54 años de edad enviado al servicio de Hematología para recibir quimioterapia y se administra sin complicaciones



HERNANDEZ SORCIA CARLOS. En el frotis se observan mieloblastos con cuerpos de AUER y se clasifica como LAM M1 y el resultado de su inmunofenotipo es compatible para LAM M2 como se muestra en la tabla 5. El análisis molecular es positivo para t(8;21) y esta asociada a LAM M1 ó M2.



HERNANDEZ SORCIA CARLOS POSITIVO PARA M4



HERNANDEZ SORCIA CARLOS POSITIVO PARA M1 t(8;21)

Tabla 5

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P-gp(MDR)	CD41
0.24	95.8	100	64.1	51.6	44.1	0.25	0.46	0.117	0.141	0.36	1.09	1.12	1.06

GLYCO	c.MPO	c.CD79	c.CD3
0.72	78.1	2.24	1.52

HOSPITAL DE PEMEX PICACHO

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

7Mar06 13:50:23

CD34-FITC/CD33-PE/CD45-EC

20012229

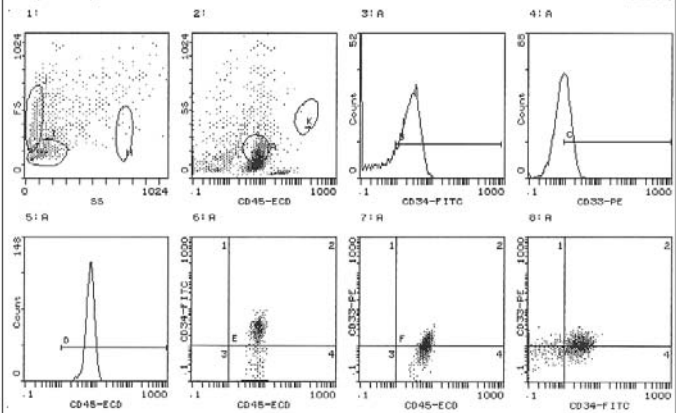
CARLOS REYES HERNANDEZ MD LMA

49 seconds, 28526 events

Manual Stop

OP ID: COULTER

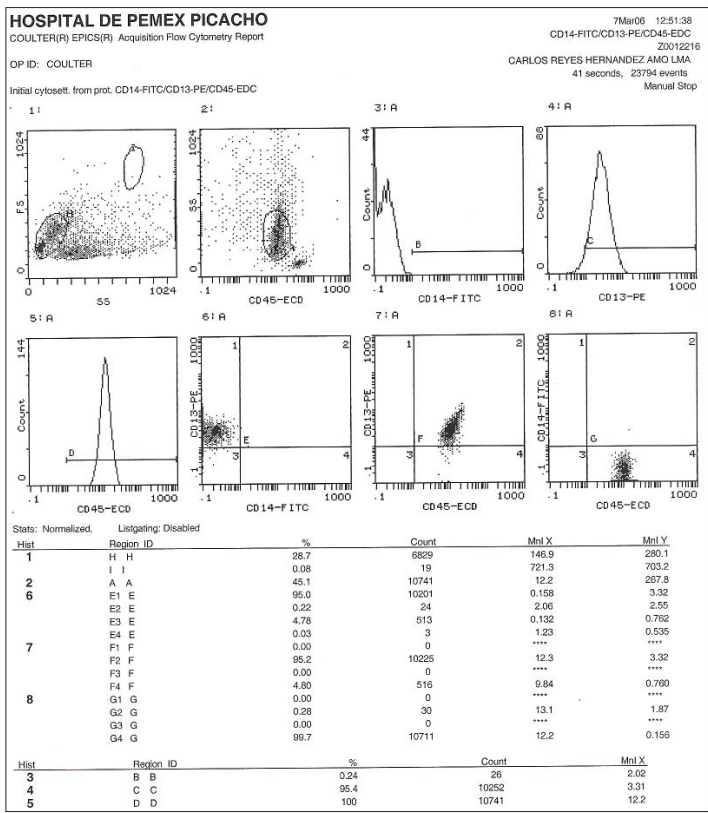
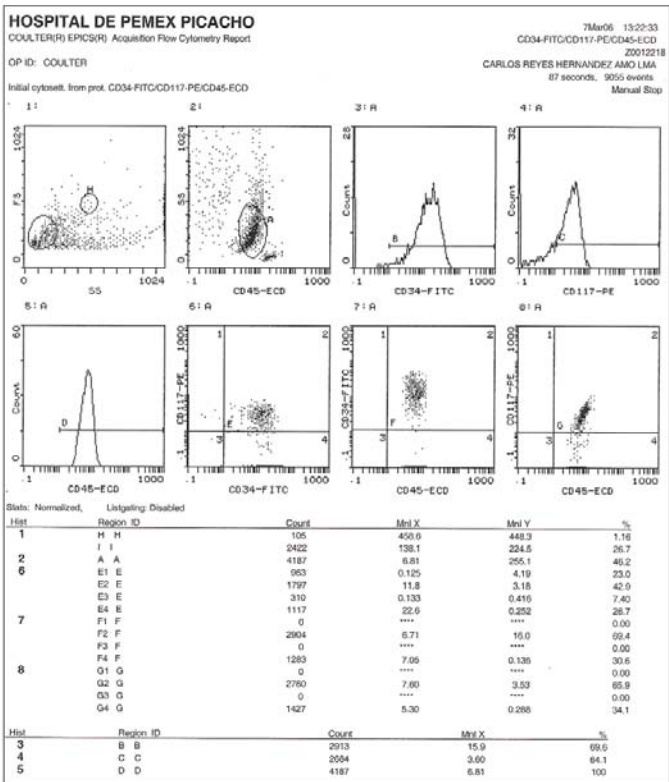
Initial cytostell. from prot. CD34-FITC/CD33-PE/CD45-EC



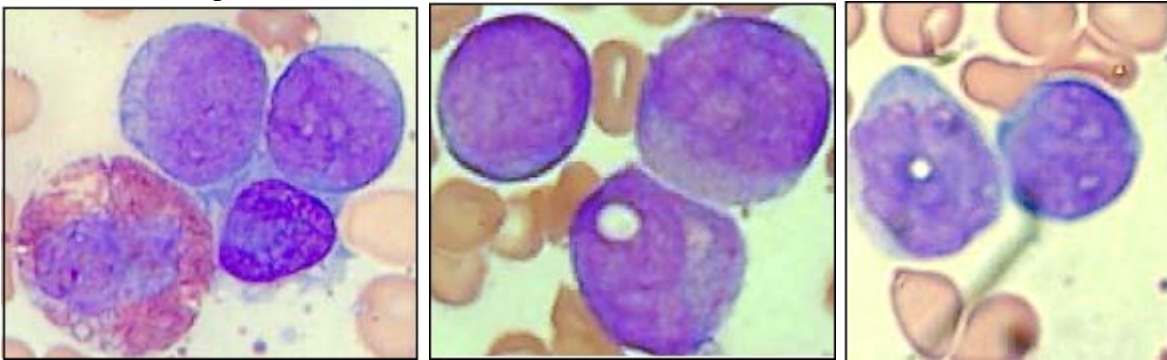
Stats: Normalized, Listgating Disabled

Gate	Region ID	%	Count	Med X	Med Y
1	H	0.25	70	697.4	381.6
	I	43.7	12470	122.5	181.4
	J	25.9	7284	88.4	376.2
	A	31.2	8886	7.22	161.2
	K	0.01	3	84.8	410.7
6	E1	0.00	0
	E2	51.4	4565	7.40	3.14
	E3	0.00	0
	E4	48.6	4321	7.03	0.225
7	F1	0.00	0
	F2	42.0	3787	8.17	1.48
	F3	0.00	0
	F4	57.4	5099	6.51	0.662
8	G1	16.6	1300	0.239	1.42
	G2	27.0	2397	3.30	1.52
	G3	33.0	2931	0.219	0.028
	G4	24.4	2168	2.80	0.741

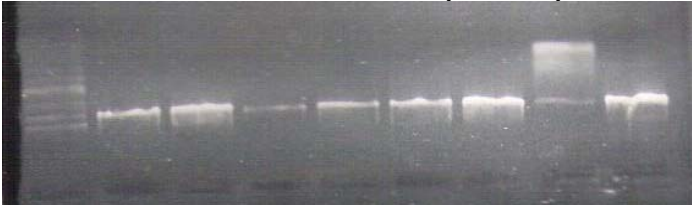
Gate	Region ID	%	Count	Med X
3	B	51.6	4585	3.13
4	C	44.1	3901	1.45
5	D	100	8886	7.22



Paciente de 6 años de edad, enviado de Salamanca con cuadros repetidos de faringoamigdalitis desde los 2 a 12 años de edad, además otitis media izquierda en el último año, recibiendo múltiples tratamientos con antibióticos y analgésicos anti inflamatorios, desde 2002 cuadro faringoamigdalino y otitis media izquierda sin resolución hasta la fecha 4-Enero-2003. La BH reporta leucocitos 30,300 mm³, con trombocitopenia, Hb 6.4 g/dL, HTO 18.3 %, y cuadro clínico: astenia, adinamia, hiporexia, y manifestaciones de sangrado en piel (hematomas pequeños y en sitios de venopunción, hieirtrpfia gingival , no hepato y esplenomegalias, solo pequeñas adenopatías cervicales. Se tomo sp y la laminilla reporta monoblastos y mieloblastos, ausencia de plaquetas y neutrófilos se tomo también AMO. Ultima consulta para valoración 4-Enero-2006.



HILTON MARTINEZ AUGUSTO (34); por morfología se observan mieloblastos y monoblastos clasificándose como LAM M4, el resultado de su inmunofenotipo es compatible con LAM M1, su translocacion es positiva para inv 16 que se observa en LAM M4Eo.



HILTON MARTINEZ AUGUSTO POSITIVO PARA M7

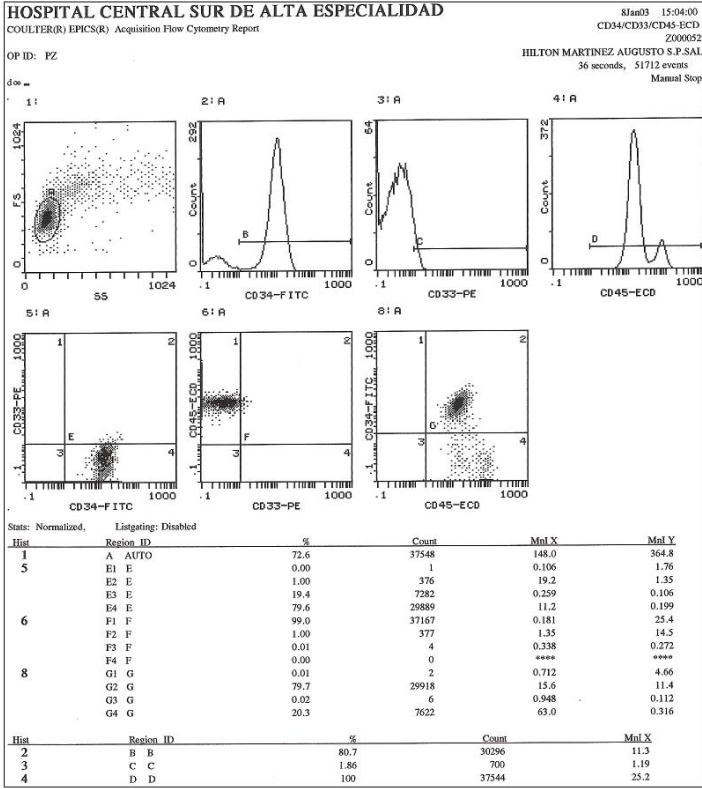


HILTON MARTINEZ AUGUSTO POSITIVO PARA M3 INV 16

Tabla 6

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P-gp(MDR)	CD41
1.01	77.6	100		80.7	1.86	7.8	2.82	4.4	0.04	5.33	4.74	0.19	0.15
0.35	98.8	99.9		0.8	99.7	71	0.08	33	0.05	15.2	16.8	0.21	0.3
0.02	43.1	100	36.3	66	0	0	0	0.1	0.04	0	0.02	NR	0.32
5.15	76.9	100	3.72	9.87	87.8	0.2	0.48	0.5	0	1.55	0.16	0.07	2.95

GLYCO	c.MPO	c.CD79	c.CD3
0.01	91.8	5.48	3.84
0	96	1.6	1.98
0	51.3	1.95	4.06
4.16	90.2	0.15	0.82



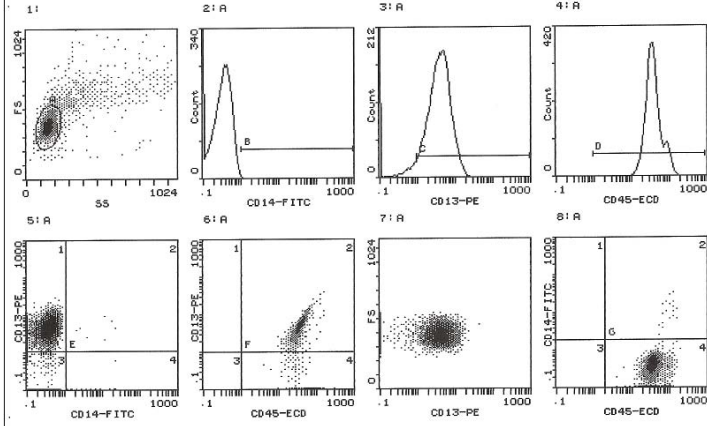
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

8Jan03 15:01:43
 CD14/CD13/CD45-ECD
 Z0000528
 HILTON MARTINEZ AUGUSTO S.P.SAL
 39 seconds, 56997 events
 Manual Stop

OP ID: PZ

Initial cytospin, from prot. CD14/CD13/CD45-ECD



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Gate	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y
1	A AUTO	72.5	41305	149.4	359.0
5	E1 E	76.3	31526	0.380	5.14
	E2 E	0.23	94	11.1	6.20
	E3 E	22.8	9402	0.275	0.232
	E4 E	0.69	283	8.09	0.133
6	F1 F	0.00	0	****	****
	F2 F	77.1	31857	38.6	5.11
	F3 F	0.00	1	0.689	0.919
	F4 F	22.9	9447	68.5	0.209
8	G1 G	0.00	0	****	****
	G2 G	0.65	270	102.4	11.8
	G3 G	0.00	2	1.05	0.247
	G4 G	99.3	41033	45.1	0.359

Gate	Region ID	%	Count	Mn X
2	B B	1.01	418	8.10
3	C C	77.6	32039	5.09
4	D D	100	41304	45.4

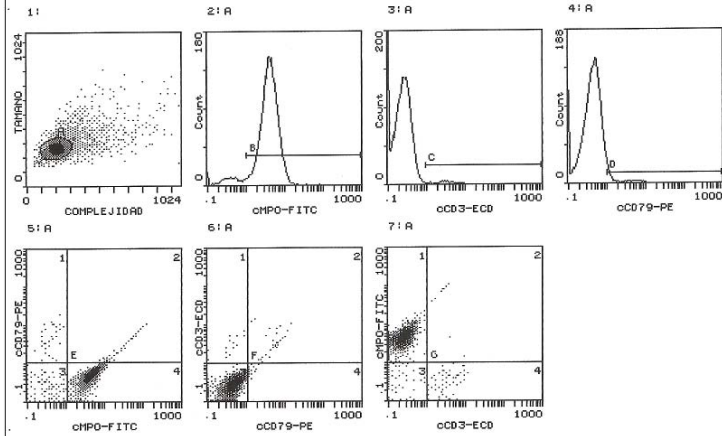
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

9Jan03 11:22:32
 cMPO-FITC/cCD79-PE/cCD3-ECD
 Z0000545
 HILTON MARTINEZ AUGUSTO S.P.SAL
 21 seconds, 35802 events
 Manual Stop

OP ID: PZ

de

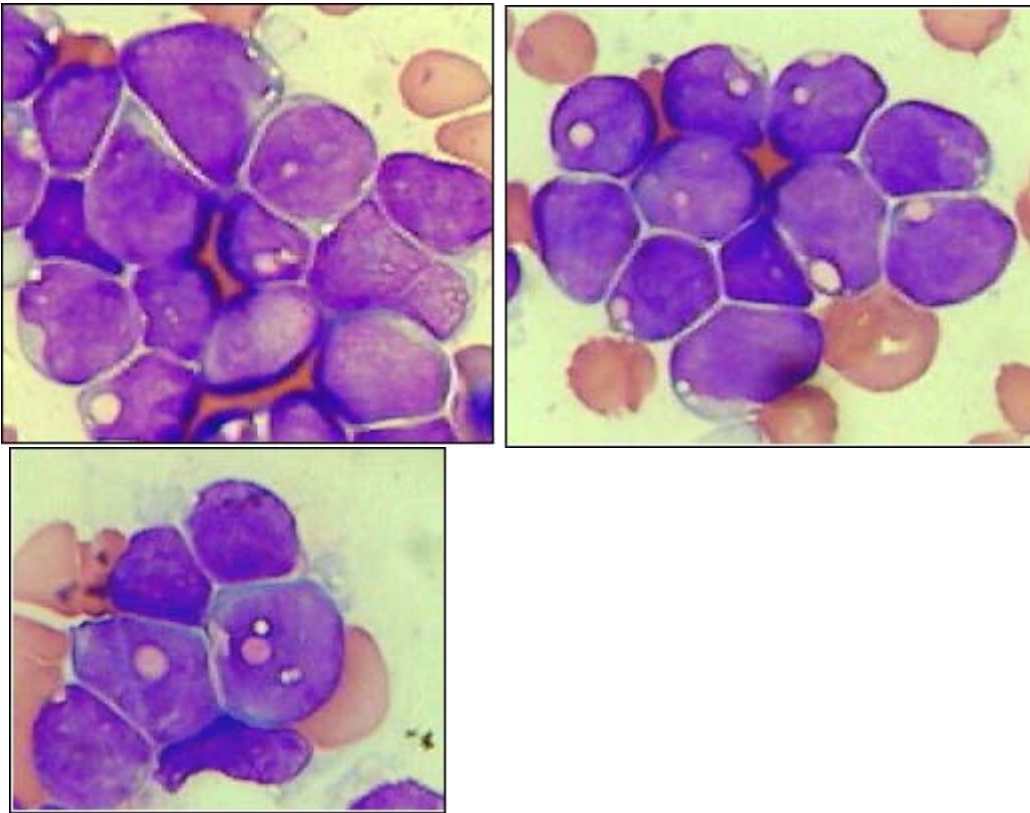


Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Gate	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A AUTO	59.1	21150	197.0	249.8	200.0	248.0	139	21.85	13.51
5	E1 E	1.99	421	0.365	4.54	0.102	2.61	4	53.29	67.18
	E2 E	2.74	580	18.4	1.79	11.0	1.10	21	76.33	63.63
	E3 E	6.48	1371	0.374	0.196	0.102	0.102	33	68.71	64.84
	E4 E	88.8	18778	4.06	0.410	5.76	0.536	128	46.65	50.81
6	F1 F	1.20	253	0.452	3.34	0.432	3.01	4	51.92	49.70
	F2 F	2.63	556	4.67	3.13	4.64	2.26	11	61.21	68.31
	F3 F	94.1	19896	0.390	0.223	0.102	0.102	485	55.27	49.66
	F4 F	2.10	445	1.30	0.579	1.10	0.499	17	18.67	28.80
7	G1 G	91.1	19270	0.232	4.15	0.102	3.01	192	50.36	50.12
	G2 G	0.76	160	2.16	42.3	2.61	71.5	8	49.77	105.97
	G3 G	5.06	1071	0.157	0.397	0.102	0.102	32	53.17	62.70
	G4 G	3.07	649	3.51	0.299	2.10	0.102	6	62.14	59.43

Gate	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
2	B B	91.8	19412	4.37	4.33	4.24	178	33.56	1.04	1006
3	C C	3.84	813	3.27	3.23	2.56	8	0.98	1.01	1006
4	D D	5.48	1158	2.40	1.67	1.06	34	77.44	1.04	996.7

Paciente masculino de 9 años de edad el cual es conocido por haber presentado LAL, de la cual llevaba 17 de cese electivo de quimioterapia. Referido de su unidad de adscripción por citopenias en las BH. Presenta palidez de tegumentos, sin adenomegalia, el hígado de palpa a 3 BRCD, no se palpa esplenomegalia, no se despierta dolor óseo. Recaída de leucemia en espera de inmunofenotipo Se tomo sangre periférica y se realizo AMO en la que presenta Blástos de origen linfoide. Al 01-Diciembre-2005 con probable recaída en SNC con punción lumbar en la que se reportan células totales de 2870 mm³ con leucocitos de 2840 mm³ con 95 % de MN, proteínas de 41mg/dL y glucosa de 5 mg/dL aspecto turbio después de centrifugar agua de roca. Se le dará QT IT 2 veces por semana para nagativizar.



MINERO RABATE EMANUEL (46); por morfología se clasifico como LAL L2, el resultado de su inmunofenotipo es compatible con LAL de células B tempranas como se muestra en la tabla 6. Su translocacion es positiva para t(12;21) que presenta en LAL de células B tempranas



MINERO RABATE EMANUEL POSITIVO PARA M3

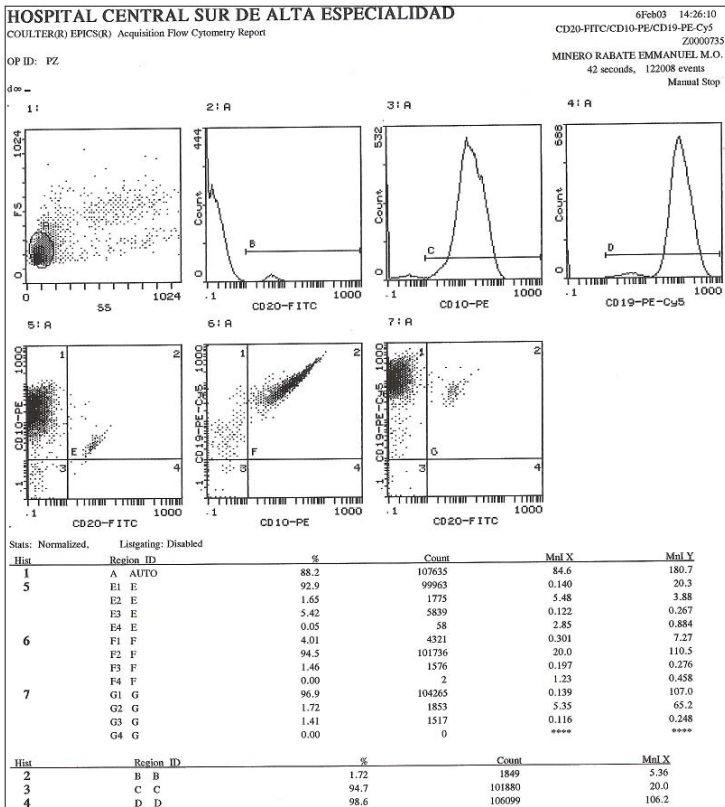


MINERO RABATE EMANUEL POSITIVO PARA M3 t(12;21)

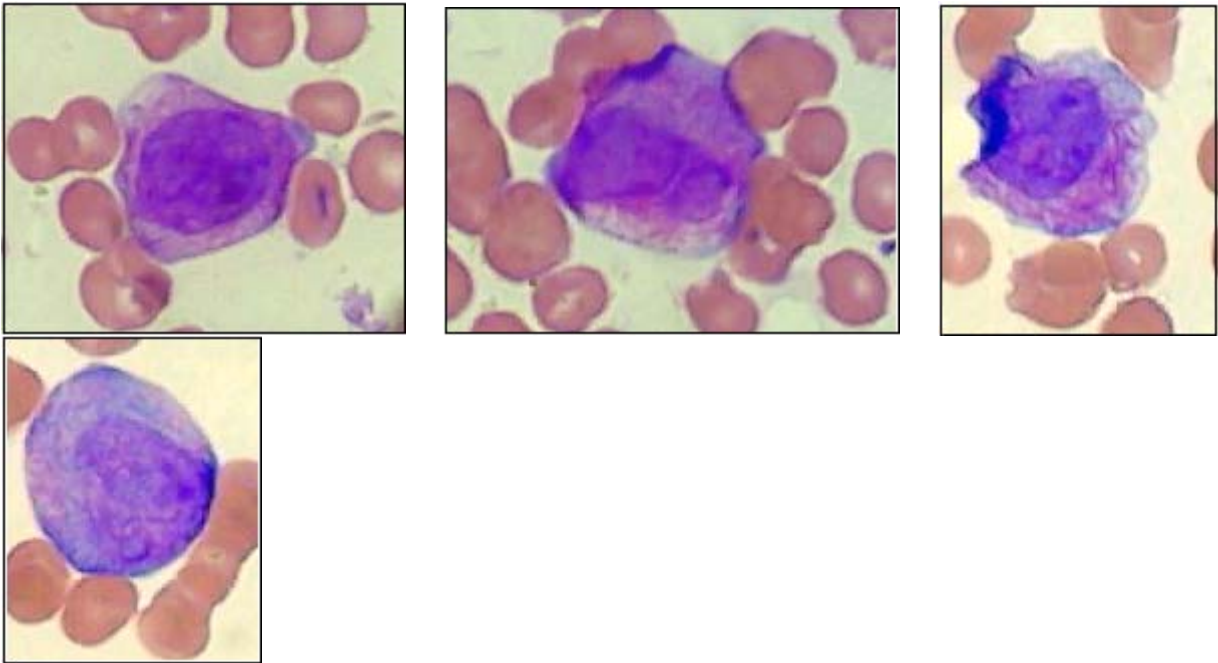
Tabla 6

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	gp(MDR)	CD41
0.1	0.02	99.1		0.79	0.01	2.9	0.42	1.9	0	1.72	94.7	7.72	2.68

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3
NO SE REALIZO



Ortiz José Alberto



ORTIZ RODRIGUEZ JOSE ALBERTO (49), por morfología se clasifico como LAM M3, su inmunofenotipo en la tabla 8 es compatible con LAM M3, su translocacion es positiva para t(15;17).



ORTIZ RODRIGUEZ JOSE ALBERTO POSITIVO PARA M4 Y M8



ORTIZ RODRIGUEZ JOSE ALBERTO POSITIVO PARA M4 t(15;17)

Tabla 8

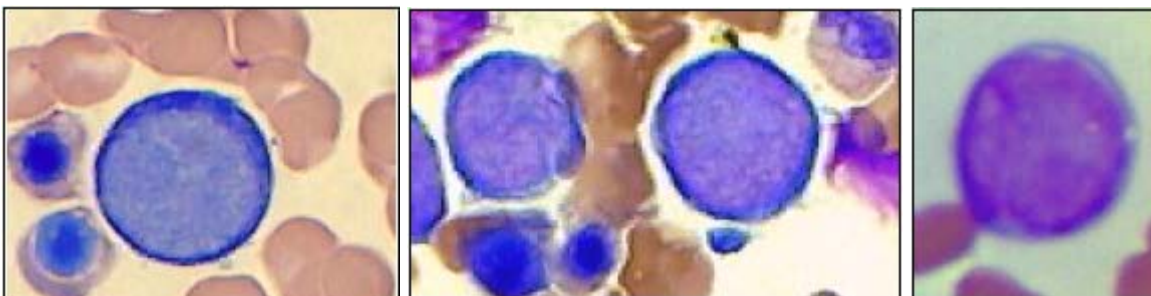
CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
14.9	98.8	99.9		2.11	51.7	6.6	4.84	2.3	2.66	18.2	4.74	NR	

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3

NO SE REALIZO

Varón de 12 años de edad radicado en Minatitlan Ver. Con LAL de alto riesgo de la cual lleva 15 meses de remisión y acude a valoración y a su ciclo de quimioterapia. En buenas

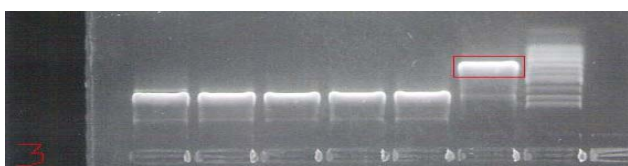
condiciones generales, adecuada coloración de tegumentos, no hay adenomegalias o viceromegalias ni datos de hemorragia, adecuada evolución, se hospitaliza para cu ciclo de quimioterapia. 25-Agoato-2005 Se encuentra en buenas condiciones generales sin manifestaciones hemorragica.



ORTIZ MONTAÑO CARLOS FRANCISCO (48); por morfología se clasifico como LAL L2, el resultado de su inmunofenotipo es compatible con LAL Pre-Pre-B temprana como se muestra en la tabla 7. Su translocacion es positiva para t(9;22).



ORTIZ MONTAÑO CARLOS FRANCISCO POSITIVO PARA M8



ORTIZ MONTAÑO CARLOS FRANCISCO POSITIVO PARA M6 t(9;22)

Tabla 7

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
4.58	0.15	98.3		89.2	0.02	6	88.6	5.3	0.08	7.77	27.2	NR	2.87

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3

HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

4Mar04 11:45:25

CD34-FITC/CD33-PE/CD45-ECD

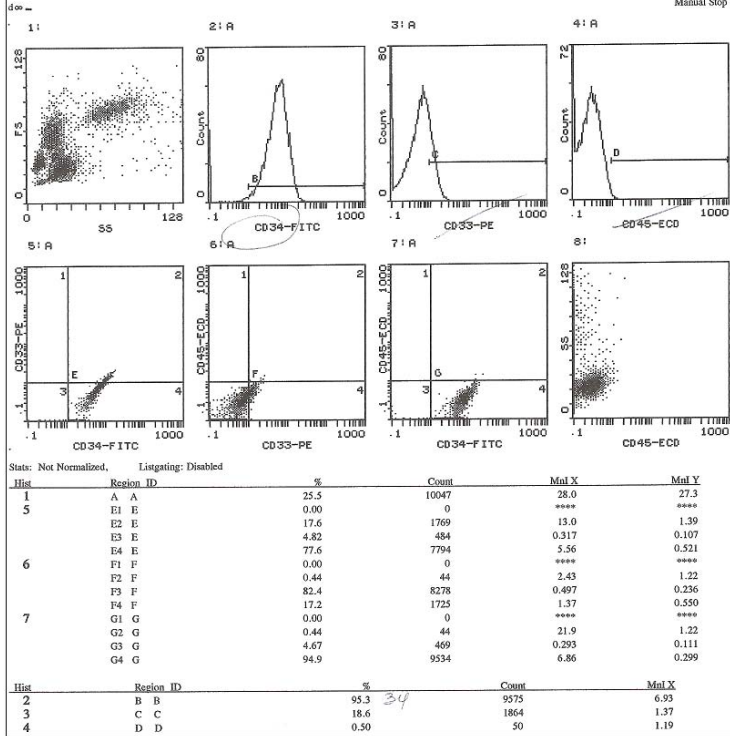
Z0001698

OP ID: PZ

CARLOS FRANCISCO ORTIZ M MO LLA

39 seconds, 39462 events

Manual Stop



HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD

COULTER(R) EPICS(R) Acquisition Flow Cytometry Report

4Mar04 12:09:38

CD20-FITC/CD10-PE/CD19-ECD

Z0001708

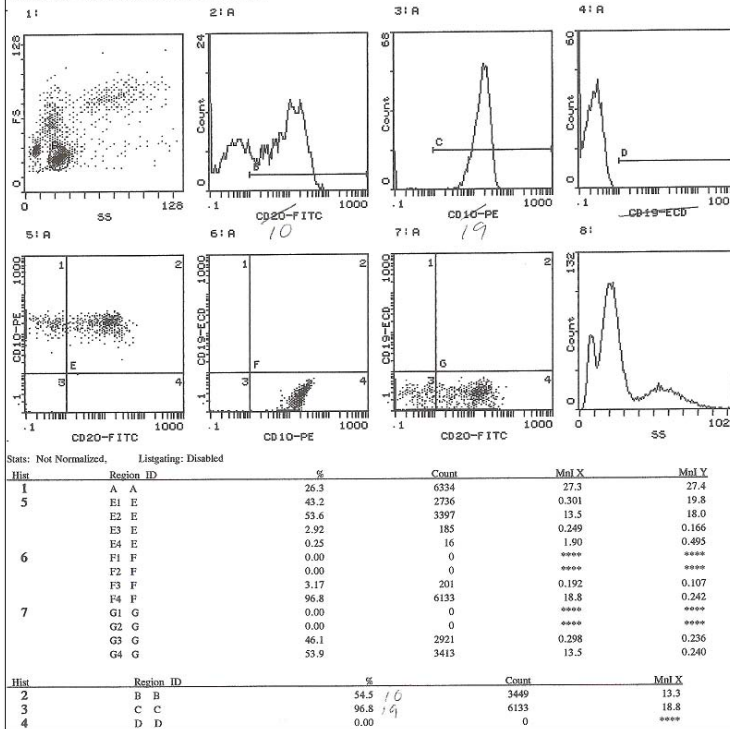
OP ID: PZ

CARLOS FRANCISCO ORTIZ M MO LLA

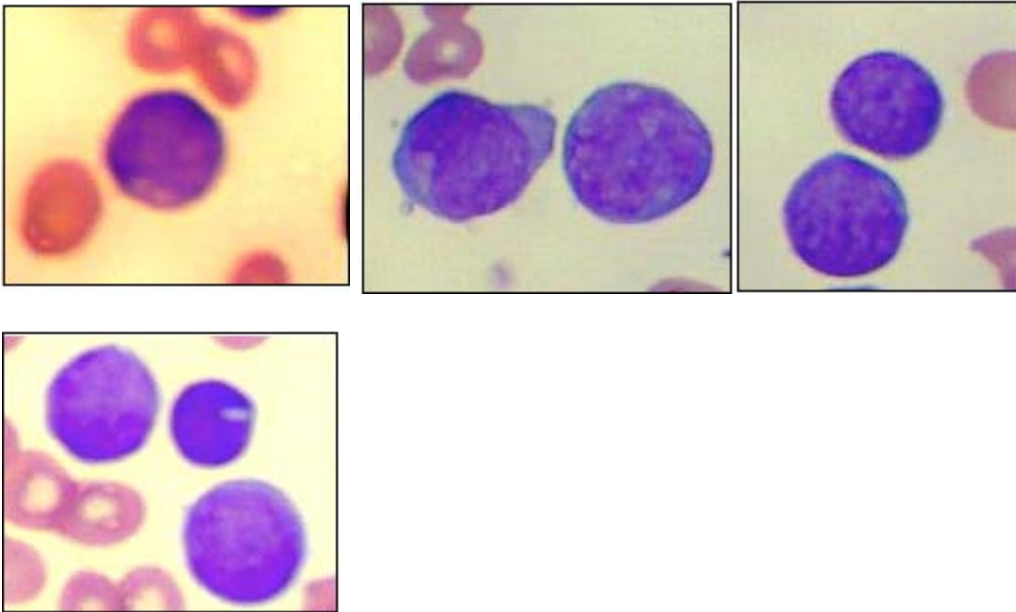
50 seconds, 24108 events

Manual Stop

Initial cytometr. from prot. CD20-FITC/CD10-PE/CD19-ECD



Paciente de 15 años de edad enviado por leucocitosis, se encuentra con moderado cansancio, no fiebre palidez moderada, EF conciente orientado hidratado con regular coloración, adenopatía cervical con ganglios 1 cm bilateral, no viceromegalia, no edemas, BH Hb 8.0 g/dL, leucocitos 559,000 mm³, plaquetas 136,000 mm³, tiene linfoblastos y con el cuadro clínico corresponde a LLA.

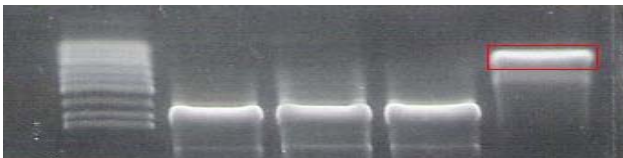


RODRIGUEZ BOLAÑOS JULIO EDGAR (54); por morfología se clasifica como LAL L1, el resultado de su inmunofenotipo es compatible con LAL Pre-Pre-B tempranas como se muestra en la tabla 9. Su translocacion es positiva para t(3;21) catalogada como no especifica de subtipo y esta relaciona con SMD y LMC se presenta en menos del 1 % de los pacientes que presentan LLA.



RODRIGUEZ BOLAÑOS JULIO EDGAR

RODRIGUEZ BOLAÑOS JULIO EDGAR POSITIVO PARA M7 Y M8

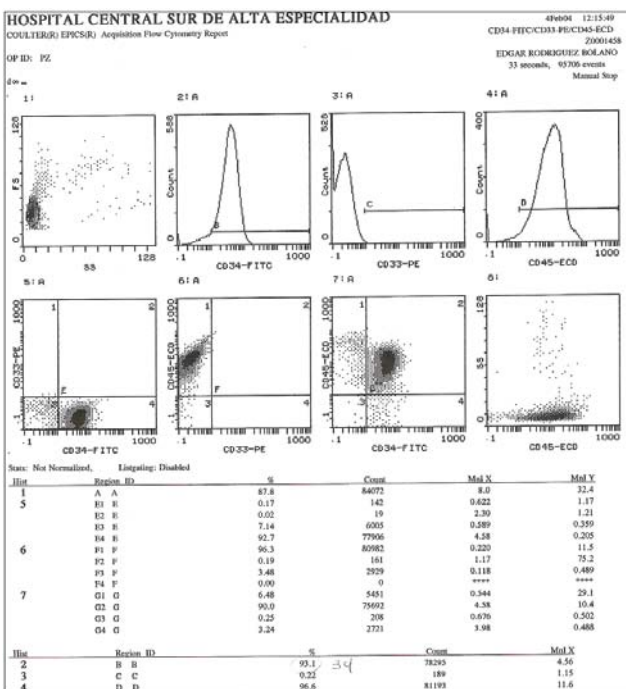


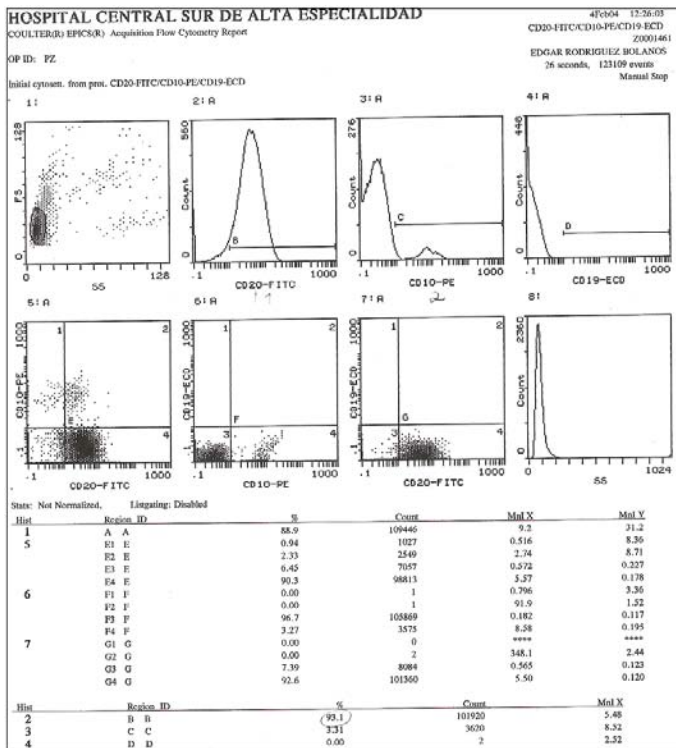
RODRIGUEZ BOLAÑOS JULIO EDGAR POSITIVO PARA M4 t(3;21)

Tabla 9

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	gp(MDR)	CD41
0.44	0.15	100	0.44	96.4	95	0	97.7	0.3	0.98	12.1	97.4	0.01	0.07
0	0	96.1	0.08	93.1	0.22	2.9	93.1	1.3	2.3			NR	

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3
 0.09 0 94.1 0.38
 NO SE REALIZO

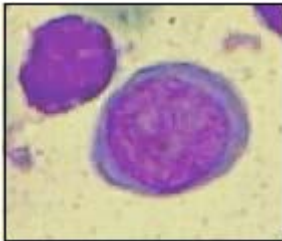
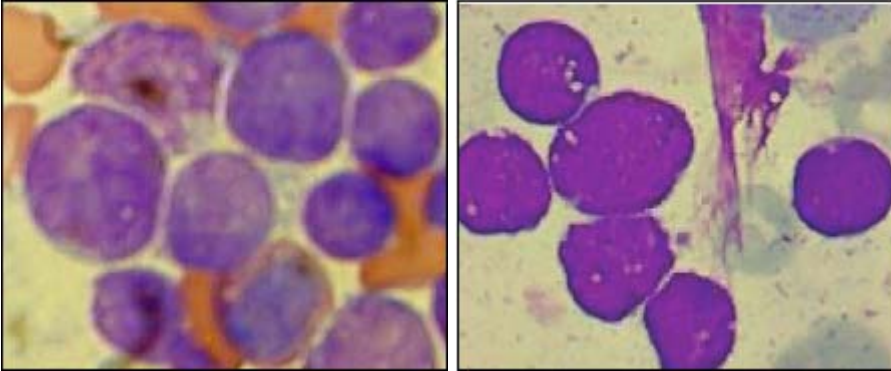




Paciente masculino de 3 años de edad, con antecedentes de mononucleosis infecciosa hace 2 meses, se hospitaliza por cuadro febril de 3 días de evolución, acompañado con ataque al estado general, mialgia y artralgias e hipoxia. Los padres niegan exposición con sustancias potencialmente mielotóxicas. Su Bh con Hb 5.2 g/dL, Hto- 15.8 %, con microcitosis, leucocitos 42,000 mm³, con linfocitosis y monocitosis, plaquetopenia 88,000 mm³, frotis se sangre periférica con 3 % de blásts, reticulocitos 2 %, con incremento de TGO- 68 UI, FA 245 , DHL- 1517 UI.

USG reporta hepatopatía difusa y esplenomegalia; se encuentra conciente, tranquilo, neurologicamente estable, bien hidratado, con palidez de tegumentos +++, con SV FC 133 * min., FR 28 * min., cuello con adenopatías cervicales bilaterales de 0.5 cm. A 1 cm. De diámetro, móviles no dolorosa, no se palpan adenopatías axilares cardiopulmonar con CsPs limpios bien ventilados, buena entrada y salida de aire, RsCs rítmicos y regulares no se auscultan soplos, abdomen blando depresible, no doloroso a la palpación con hepatoesplenomegalia 2-3 cm. Debajo de borde costal , no doloroso, peristalsis normal, adenopatías inguinales bilateral aproximadamente 1 cm. de diámetro, extremidades sin alteraciones, se realiza aspirado de médula ósea de cresta iliaca posterior izquierda , sin complicaciones para realizar inmunofenotipo, citogenética y biología ,molecular. Referido en Noviembre del 2002. Al 11-Septiembre-2004 con Bh con Hb 11.4 g/dL, leucocitos 7,171 mm³ con 30% de linfocitos, linfocitos atípicos de 2 %, monocitos de 5 %, metamielocitos 1 %, segmentados de 54 %, prolinfocitos de 2 %, blásts del 2 %, química sanguínea dentro de los parámetros normales con DHL 532 UI. Citológico de LCR positivo a actividad leucémica,

Biopsia testicular realizada el 8-Septiembre-2004 positiva a actividad leucemica, Estudio de LCR 2_Septiembre-2004 con pleocitosis con 30 leucocitos mm3 Glucosa normal.



RICARDEZ GARCIA RONNY (53). Por morfología se clasifico como LAL, su inmunofenotipo es compatible con LAL Pre-B tempranas como se ve en la tabla 10.El análisis molecular fue positiva para t(12;21) y esta se manifiesta en solo 0.05 % de LAL.



RICARDEZ GARCIA RONNY POSITIVO PARA M3



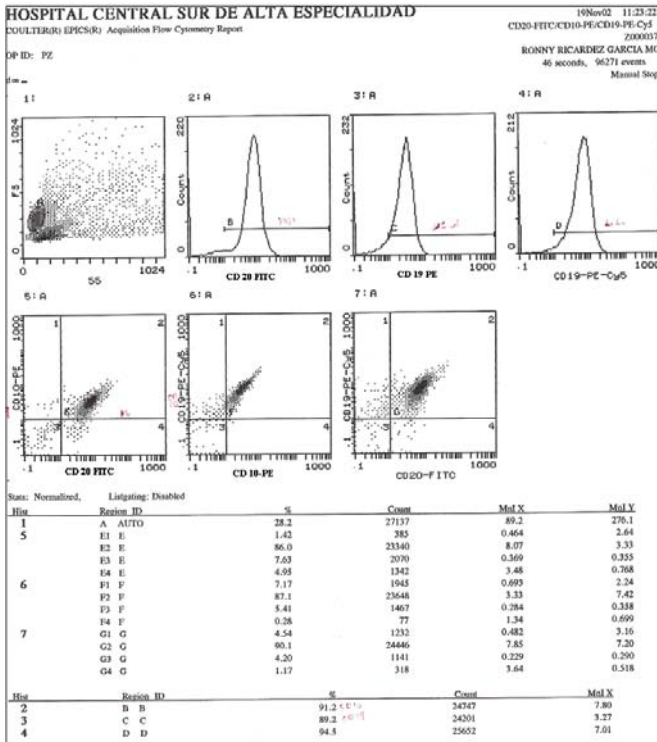
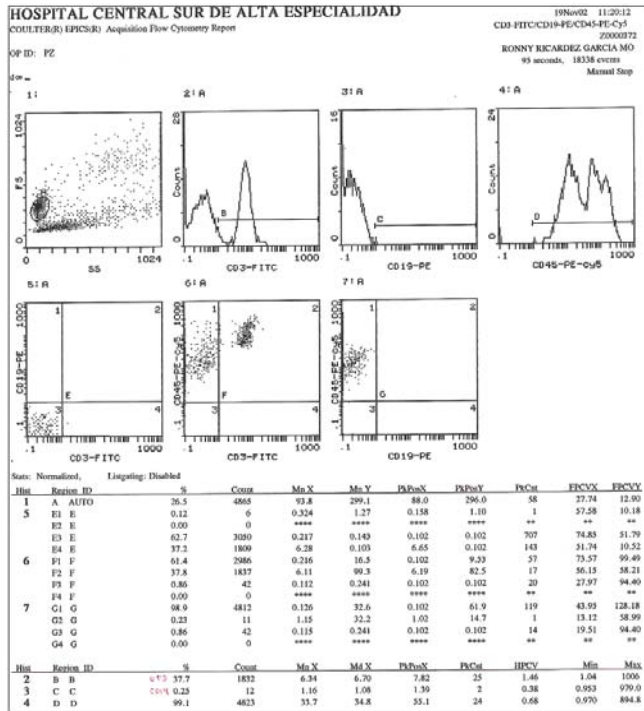
RICARDEZ GARCIA RONNY POSITIVO PARA M3 t(12;21)

Tabla10

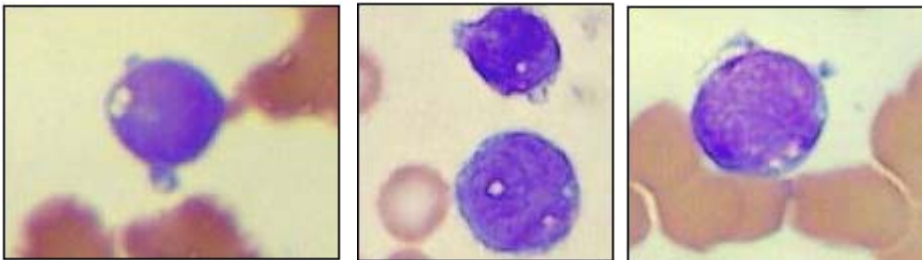
CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
3.67	0.04	96.6		0.32	0.37	38	89.2	21	14.4	20.5	91.2	12.7	0.87
0	0.05	100	0.1	29.1	0	0	96			0.1	99.9		0.01

GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3

0.2
0.04 0 100 0



Masculino de 2 años de edad con antecedentes de. Producto de gesta II obtenido por parto eutocico, alérgicos quirúrgicos negados, transfusionales positivos, en contacto siempre con taller de carpintería. P. A. lo inicio hace un mes con cuadro de vías aéreas inferiores y fiebre persistente, hace dos semanas notan palidez importante por lo que acuden al Hospital de Salina Cruz en donde su Bh tiene Hb 4.9 g/dL, Hto- 15.5 %, leucocitos 2,000 mm³, hemotransfundiendolo. Consiente tranquilo, no se aprecia gingivorragia, abdomen y extremidades sin datos, no adenopatías. Preescolar con cuadro de anemia aplasica a determinar. Al 27-Enero-2004 tiene antecedente de hace un mes con cuadro de vías aéreas (bronquitis) se dio manejo y además con fiebre persistente, hiporexia, hipodinamia, disminución de peso no cuantificada, predominantemente por la tarde, hace 15 días con palidez generalizada ,leucopenia y trombocitopenia siendo manejado en su lugar de origen y es enviado a esta unidad para continuar su estudio con Hematología Pediátrica a su ingreso con Fc de 134 * min., Fr 26 * min., temperatura de 38 C, con poca ingesta de vía oral, con presencia de halitosis referido por la madre y respiración oral.. Buen estado de hidratación, febril, narinas poco congestivas, orofaringe hiperemica ++, sin descarga retronasal, con ulcera en mucosa oral a nivel de carrillo izquierdo , con palpación de ganglios cervicales y axilares menores de 1 cm., el mayor del lado axilar izquierdo doloroso a la palpación, movil, con campos pulmonares limpios bien ventilados, RsCs con soplo sistólico grado II de Vi, abdomen blando y depresible, con peristalsis adecuada, no se palpan masas, con palpación de borde hepático a 2-3-2 cm. no doloroso, con palpación de ganglios inguinales no dolorosos menores de 0.5 cm., palpación de área genital con testículo derecho palpable descendido y el izquierdo retráctil, pene sin compromiso, extremidades sin compromiso.



TOLEDO ANTONIO ISAIAS (62); por morfología se clasifico como LAL L2 y su inmunofenotipo es compatible con LAL de células B tempranas como se muestra en la tabla 11, su análisis molecular fue positiva para t(12;21) que se presenta en LAL B.



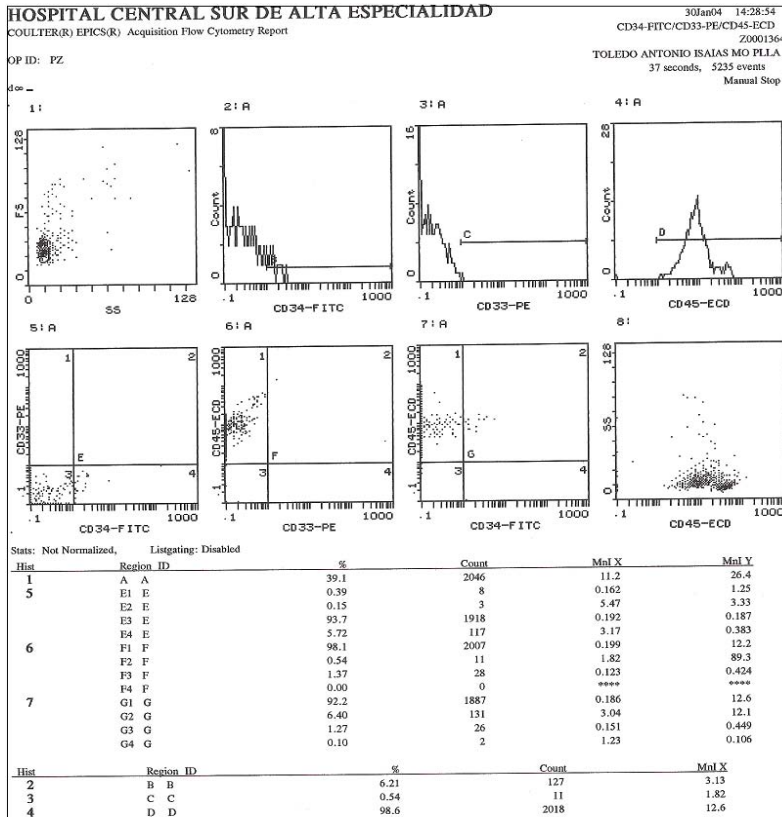
TOLEDO ANTONIO ISAIAS POSITIVO M3

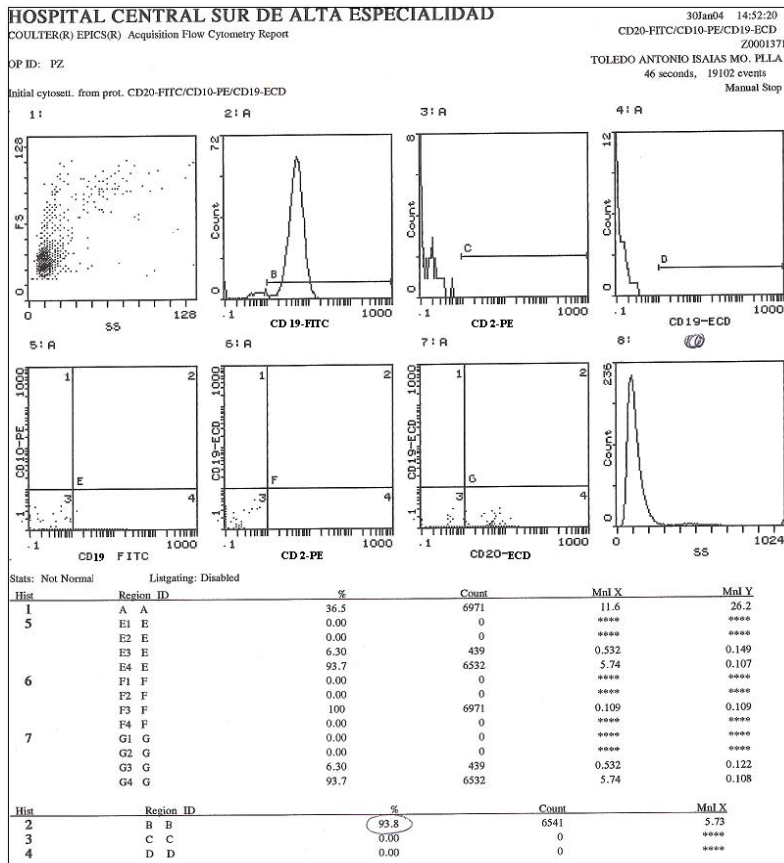


TOLEDO ANTONIO ISAIAS POSITIVO PARA M3 t(12;21)

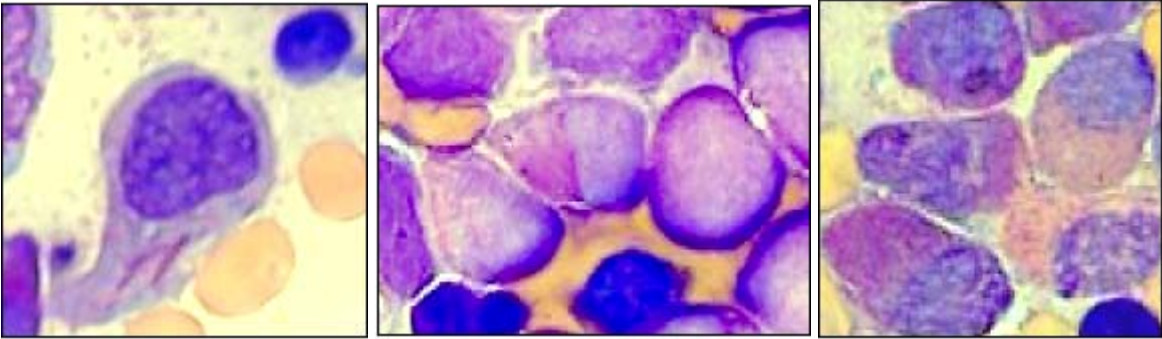
Tabla 11

CD14	CD13	CD45	CD117	CD34	CD33	CD3	CD19	CD4	CD8	CD20	CD10	P- gp(MDR)	CD41
0.34	0.33	98.6	0.04	0.54	6.2	6	95.8	3.3	2.99			NR	0.33
GLYCO c.MPO c.CD79 c.CD3													
0.24													

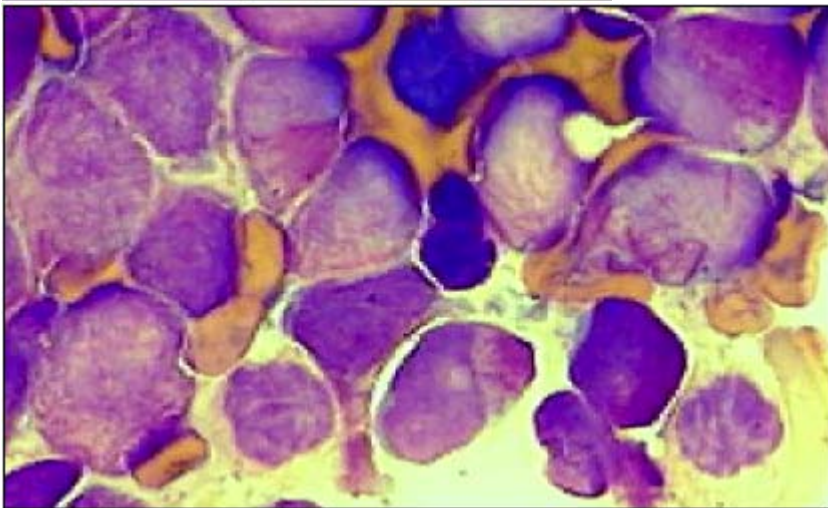
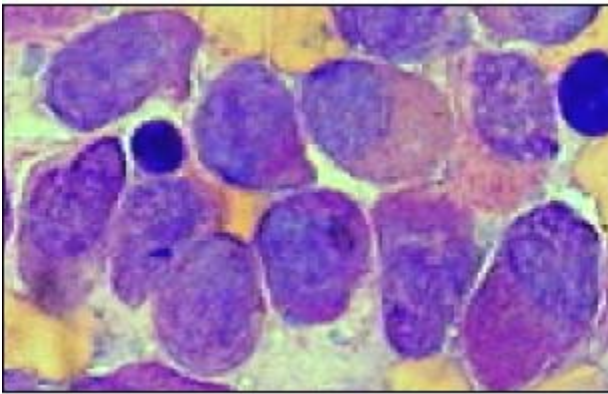




Menor de 11 años de edad y residente de Unión Hidalgo Oaxaca, es producto de la gesta I obtenida por parto, con peso de 56 Kg. A la fecha se niegan antecedentes perinatales relevantes, alimentación al seno materno y desarrollo adecuado, esquema completo de vacunación para la edad. Se niego consanguinidad de los padres, enfermedades DM y HAS en abuelos, vive en medio rural, se niega fuente de energía electromagnética cercana, se refiere que existe uso de insecticidas en casa en forma continua, lavan el piso con cloro. Se niega uso de solventes y contacto con los mismos. Hace un año por cuadro de faringitis recibió naproxen, 48 horas después padeció gingivorragia, cede en forma espontánea, hace 3 a 4 meses con malestar general, cefalea intermitente, fatiga desde noviembre, cefalea intermitente, adinamia, manejo con migraña con Sibelium. Presenta síndrome hemorragiparo, gingivorragia, equimosis, se niega fiebre, dolor óseo ocasional. por continuar con cefalea el viernes 16-Diciembre- 2005 se realiza Bh con pancitopenia. Paciente que desde 09-Agosto-2005 inicio con padecimientos de faringoamigdalitis. Al 20-Diciembre-2005 inicio hace dos semanas con gingivorragia y equimosis, febrículas sin otros datos. Pálida con FC 90 * min. FR 23 * min. T 36.8 C. Sin adenomegalias y viceromegalias. El laboratorio reporta anemia moderada, leucopenia y trombocitopenia importante, blástos en sangre periférica y bastoncillos con cuerpos de Auer. LCR normal el día 21-Diciembre-2005, citológico de LCR negativo a infiltración 31-Diciembre-2005. LAM M3 con translocacion t(15;17) positiva.



SHUNASHI



SHUNASHI (40)

Por morfología se clasifico como LAM M3, que se confirmo con translocacion t(15;17).

Resultados

CLASIFICACION POR MORFOLOGIA

Los resultados de la observación morfológica de las leucemias agudas, basados en los criterios de la FAB fue el siguiente, de los 77 pacientes, 2/ 2.59 % se clasifico como LAM M0, 2/2.59 % como LAM M1, 8/ 10.38 % como LAM M2, 7/ 9.09 como LAM M3, 8/ 10.38 % como LAM M4, 3/ 3.89 % como LAM M5, M6 y M7 no llego ningún caso, de las leucemias linfoides el resultado fue el siguiente: 29/37.66 se clasifico como LAL L1, 15/ 19.48 como LAL L2 y 3/ 3.89 % como LAL L3, en conclusión fue 38.96 % de leucemias agudas mieloides y 61.03 % de leucemias agudas linfoides. De las leucemias linfoides agudas de linaje B corresponde el 89.37 % y de linaje de células T 10.63 %, esto con ayuda del inmunofenotipo. Aquí los porcentajes son diferentes con los resultados obtenidos por inmunofenotipo, y esto obedece a que en la observación morfológica nosotros la clasificamos como LAM M0 o LAL, y fue finalmente con la ayuda del inmunofenotipo cambio su clasificacion, que son los menos de los casos pero si se tiene que aclarar porque los porcentajes no son los mismos.

CLASIFICACION POR INMUNOFENOTIPO

Los resultados obtenidos del estudio de inmunofenotipo, en pacientes con leucemia agudas fue el siguiente: se analizaron un total de 137 pacientes en 5 años, de los cuales solo 91 cumplen con estudios completos es decir morfología, inmunofenotipo y screening de translocaciones, del total de 91 existen algunos pacientes que están repetidos, porque son pacientes que se diagnosticaron como nuevos casos y después se realizo su seguimiento hasta la remisión y en algunos casos a su resultado final (fallecimiento) o recaída quedando solo 77 pacientes en total. Basándose en los criterios de FAB y el inmunológico así como del molecular, se clasificaron de la siguiente manera 33 casos de LAM y 41 casos de LAL y 2 casos Bilinéales y 1 caso no clasificable cuadro 1. De las translocaciones se obtuvieron de 77 pacientes 37/48.05 % con alguna de las translocaciones que se presentaron en las tablas (1) y 40 51.95 % no se les detecto translocaciones a continuación se mencionan las translocaciones encontradas cuadro 2.

Cuadro1

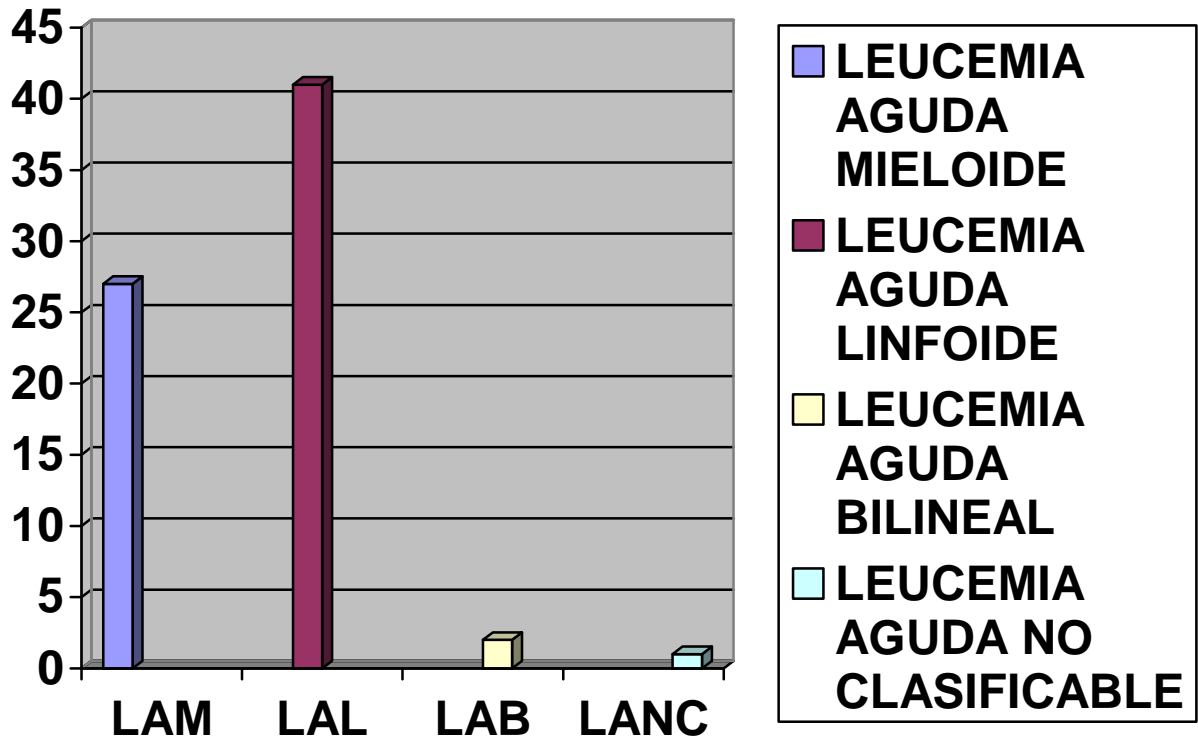
TIPO	No DE CASOS	%
LEUCEMIAS MIELOIDES	33	42.85
LEUCEMIAS LINFOIDES	41	53.24
BILINEALES	2	2.81
NO CLASIFICACBLE	1	1.40

Cuadro 2

TRANSLOCACIONES	CANTIDAD	%	Origen
t(15;17)	6	7.79	Mieloide
t(9;22)	6	7.79	Linfoide y mieloide
t(12;21)	7	9.09	Linfoide
t(16;21)	1	1.29	No especificado
t(8;21)	3	3.89	Mieloide
Tal 1d	2	2.59	Linfoide
t(5;12)	1	1.29	Mieloide
Inv 16	3	3.89	Mieloide
t(11;19)	1	1.29	Mieloide
t(X,11)	1	1.29	Mieloide
t(1;19)	2	2.59	Linfoide
t(17;19)	2	2.59	Linfoide
t(3;21)	2	2.59	No especificado
NO DETECTABLE	40	51.94	Linfoide y Mieloide

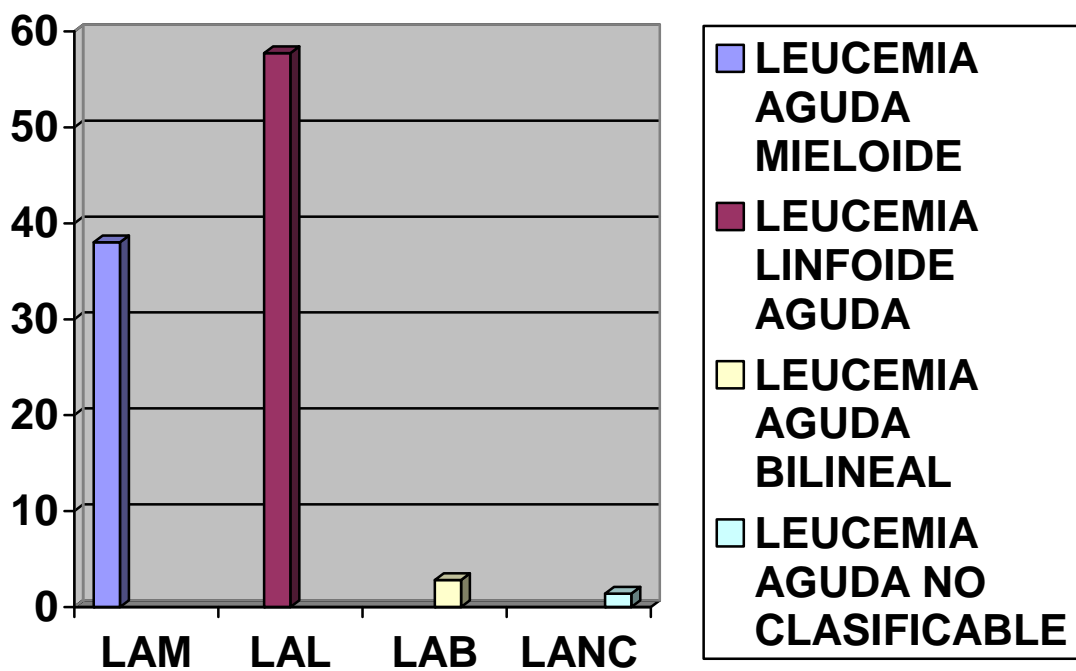
Como se observa en el cuadro 2 el porcentaje más alto lo tiene la translocación t(12;21) 12p13/TEL (ETV6)b , 21q22/AML1(CBFA2), que su origen es linfoide de pre-B temprano y pre-B. Después le siguen la t(15;17) 15q22/PML, 17q12-21/RARA de origen mieloide y t(9;22) 9q34/ABL, 22q11.2/BCR en el 90% de los casos es de linaje B cuando hablamos de LLA; no olvidar que también se presenta en los casos de Leucemia mieloide crónica.

Número de casos de leucemias agudas tabla 1.



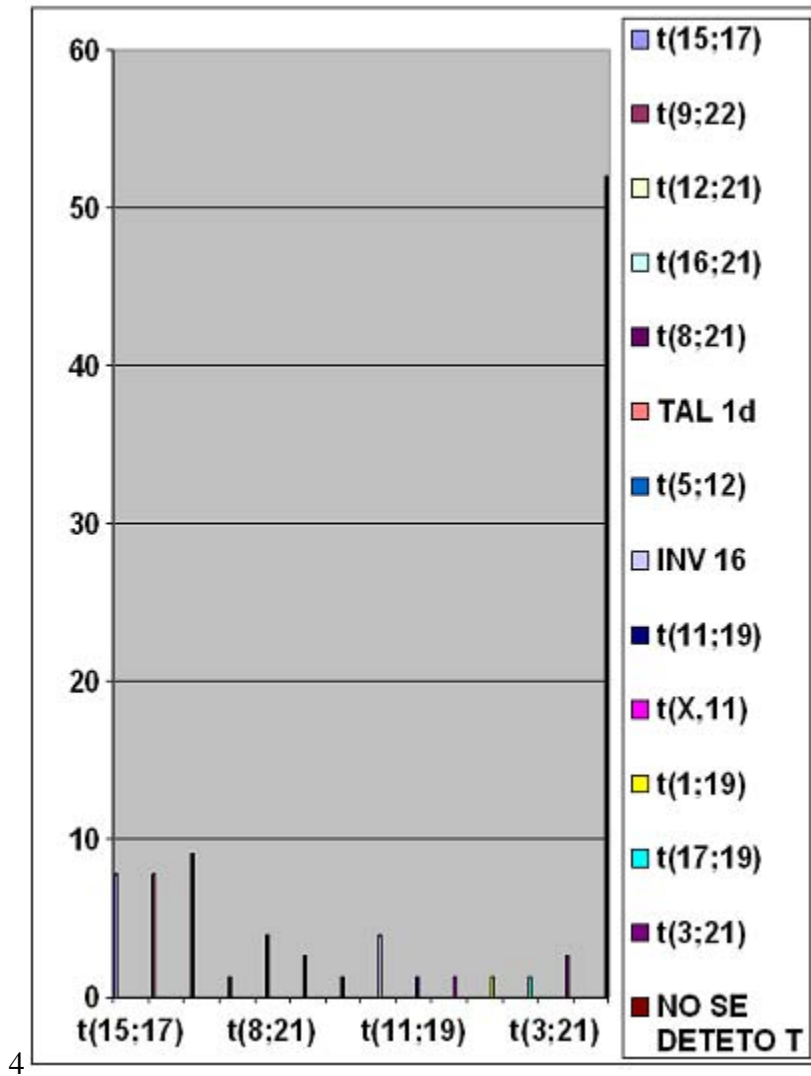
Con esta tabla determinamos que la leucemia que más se presentó fue la leucemia linfoblástica aguda, seguida de la leucemia mieloide aguda, y los menos casos la bilineal y la no clasificable.

Porcentajes de casos de leucemias tabla 2.



Como consecuencia de los mayores números de casos presentados de leucemias agudas linfoblásticas su porcentaje también es el más alto en comparación con la leucemia aguda mieloide y los menores porcentajes a Bilineales y no clasificable.

Tabla de porcentajes de translocaciones tabla

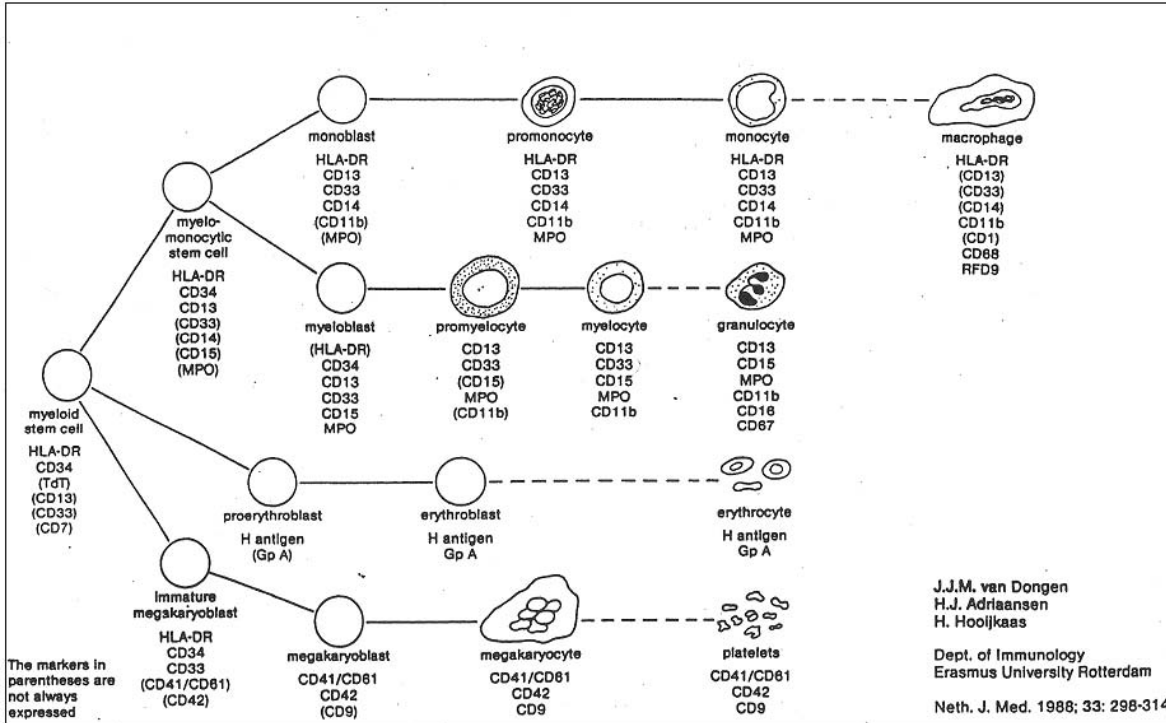


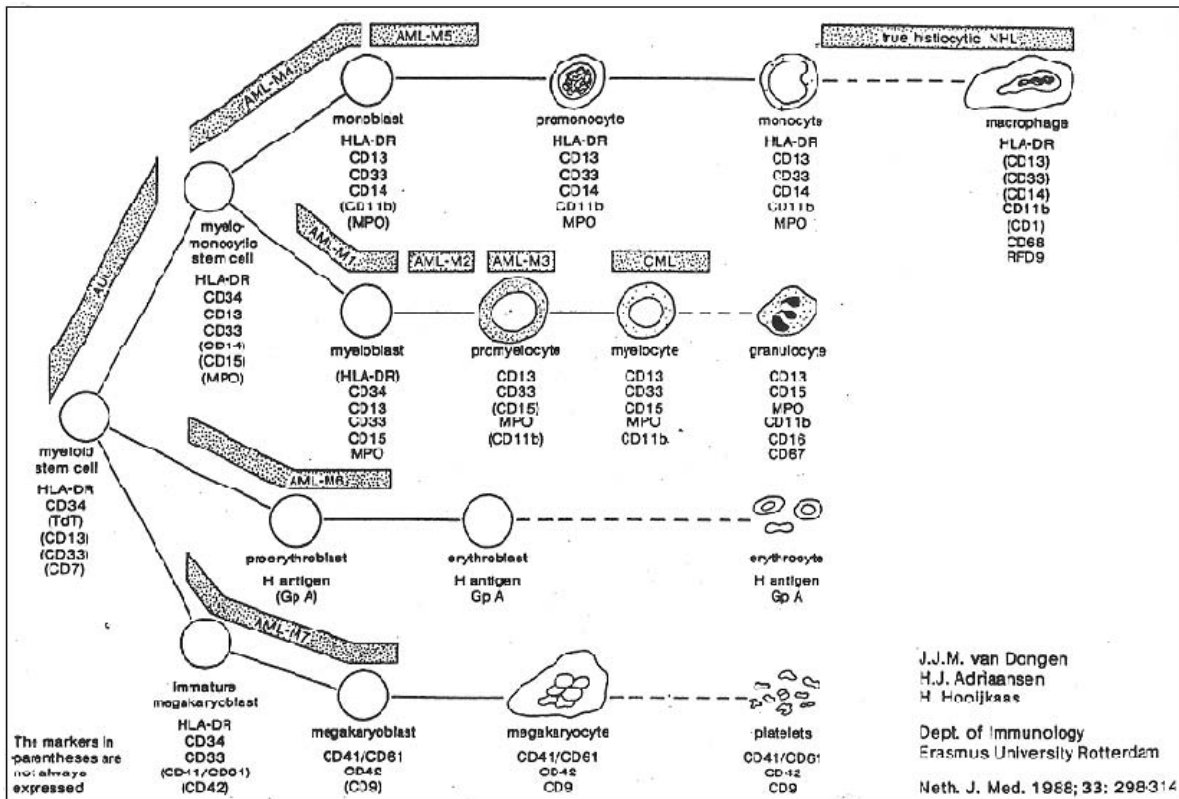
Estos resultados ya fueron comentados en el cuadro 2.

Con las tablas siguientes, se muestra como en base a la expresión de antígenos en la membrana y en su citoplasma de la célula, que se expresan de acuerdo al estado de maduración de las células, se clasifican a las leucemias agudas, en las tablas 1 se muestran las leucemias agudas mieloides, en la tabla 2 las leucemias agudas linfoides.

En las siguientes tablas se muestra como y en que etapa de maduración van apareciendo ó desapareciendo los antígenos de superficie así como los intracitoplásmaticos.

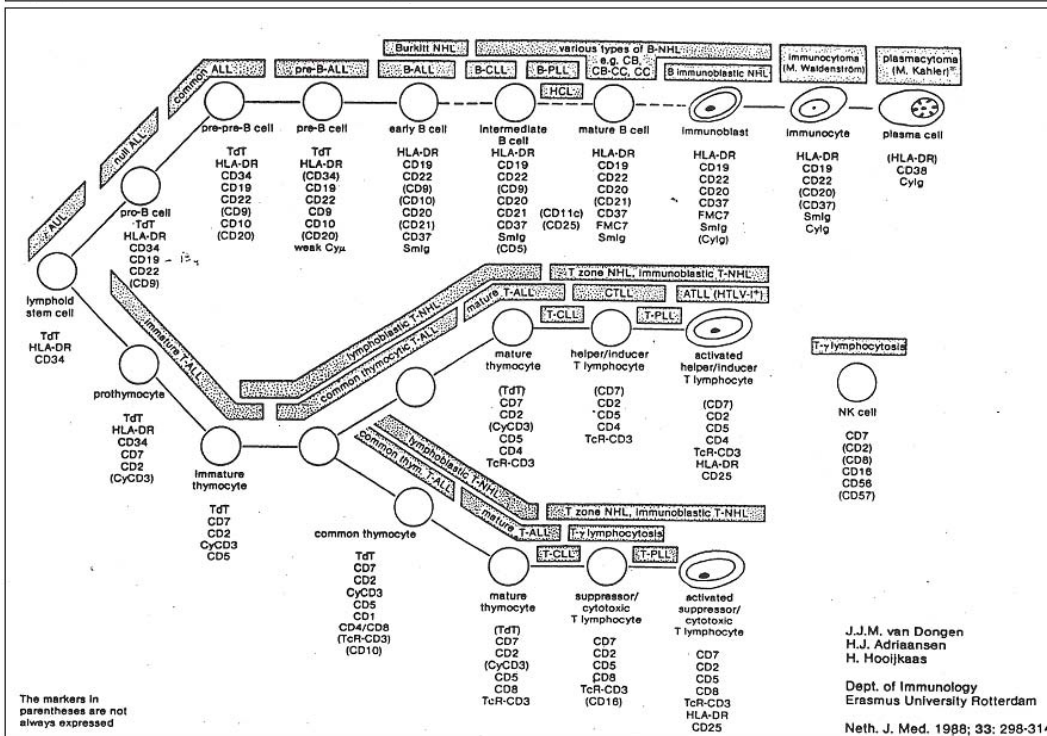
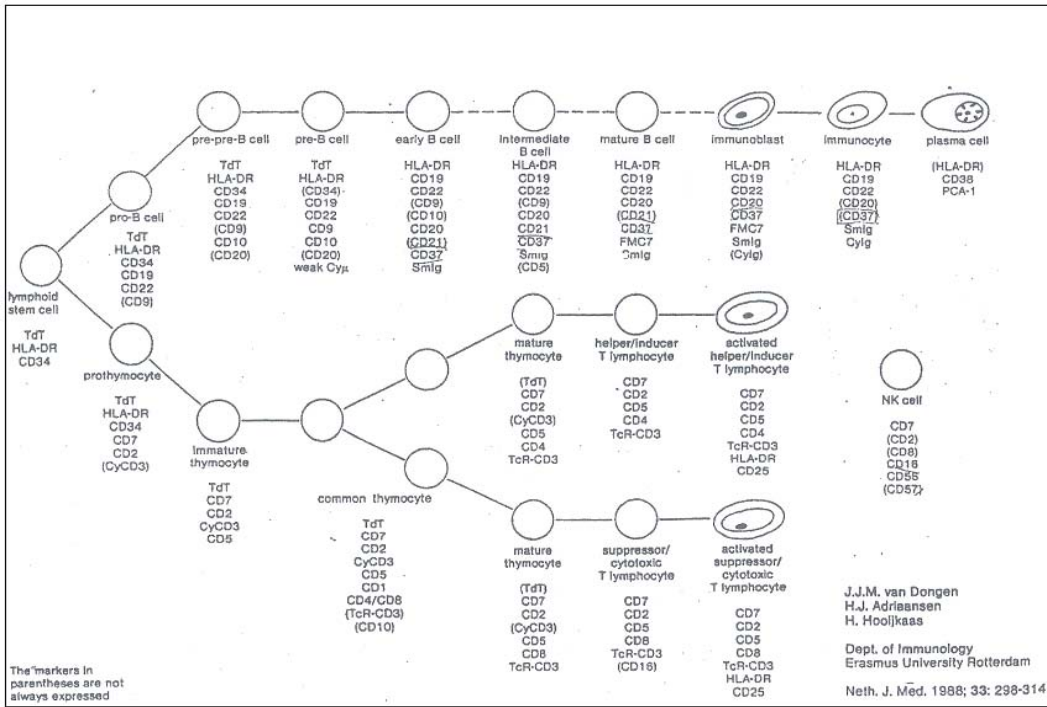
TABLE 1





En base a la expresión de antígenos que van apareciendo conforme la célula va madurando, es como se clasifican las leucemias agudas linfoides además de establecer el linaje al cual pertenecen como se ven en la tabla 2.

TABLA 2



El diagnóstico de los 77 pacientes con leucemia aguda mieloide ó linfóide, del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de PEMEX. Se realizó por tres métodos en primer lugar por morfología, seguido por inmunofenotipo y tercero por RTPCR (Screening de translocaciones). Por morfología de los 77 pacientes 65 (84 %) de ellos coincidieron con el diagnóstico realizado por morfología e inmunofenotipo; en 12 (15.58 %) de ellos no hubo coincidencia con la morfología e inmunofenotipo y fue necesario el análisis molecular para dar un diagnóstico más preciso como por ejemplo tenemos a los siguientes casos: Paciente No 2 por morfología se clasificó como LAM M3 y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 por presentar un marcador específico de linaje llamada glicoproteína rica en leucina CD14 que es un receptor de lipopolisacáridos bacteriano gram negativos, su análisis molecular fue positiva para t(16;21), que es una de las translocaciones que no se presenta en subtipo de LAM M3. A la translocación t(16;21) se le ha asociado con las LAM sin especificar el subtipo, SMD y fase blástica de las LGC. Esta translocación es muy rara y esta relacionada con la terapia recibida por LAM o SMD. (11,93,94).

Pacientes No 6, 22, 65 por morfología se les clasificó como LAL; su inmunofenotipo fue compatible con LAM M0 por presentar marcadores específicos de clona CD13 +, CD34+, CD117+, CD33+ y cMPO+ en el estudio molecular no se detectó ninguna translocación.

Paciente No 21 por morfología se clasificó como LAM M3 y su inmunofenotipo es compatible con LAM M2 y el análisis de su estudio molecular no demostró la existencia de una translocación, este es un paciente del cual no se pudo confirmar por translocación su diagnóstico, pues este tipo de leucemia LAM M3 se presenta en un 95 % de los casos la translocación t(15;17), en el otro 5 % de los casos pueden presentar otro tipo de translocaciones que con nuestro método, no estamos detectando como lo son las siguientes translocaciones; t(5;17) (q32;q21), t(11;17) (q13;q21). Este tipo de leucemia LAM M3 tiene la particularidad de expresar CD34 + ó -, en caso de ser positivo es débil y expresa en mayor intensidad CD33+, CD13+, cMPO+. (88,89). Por lo que de acuerdo al inmunofenotipo que presentó para los siguientes marcadores específicos de linaje CD34+, CD117+, CD13+, cMPO +, es compatible con LAM M2.

Paciente No 25 por morfología se clasificó como LAL y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 por tener CD14+ y cMPO+, el resultado de su análisis molecular es positivo para t(8;21)(q22;q22). La translocación t(8;21) esta asociada a LAM M1 ó M2 de acuerdo a la literatura. (11,95,96). Por lo que su clasificación de acuerdo a la translocación que presentó y que es característica de LAM M1 ó M2 se clasifica como LAM M2. Esta translocación se presenta en el 40 % de estos casos de LAM M2, en donde el gen afectado es el AML1 del cromosoma 21 y el gen ETO del cromosoma 8 y no se asocia a LAL.

Paciente No 26 por morfología se clasificó como LAM M3 y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 por presentar marcadores específicos de clona como lo son, CD14+, CD13+, CD34+, cMPO+. El resultado de su análisis molecular es positivo para t(X;11)(q13;q22), y esta asociado a leucemia LAM M4 de acuerdo a la literatura. (60,124). En este caso observamos que el inmunofenotipo coincidió con la translocación identificada tomando una importancia sumamente relevante quedando su clasificación como LAM M4.

El paciente No 30 por morfología se clasifico linfoma versus LAL, y su inmunofenotipo es compatible con LAL pre-B, por presentar marcadores específicos de clona como lo son CD34+, CD19+, CD10+, cCD79a +, El resultado de su análisis molecular es positiva para t(9;22). Esta translocacion es característica de LAL o LGC. Cabe mencionar que se trata de un paciente de 3 años de edad, y que este tipo de translocacion t(9;22) se presenta en 3% al 5 % en estos pacientes. Esta translocacion es el resultado de la fusión de los genes BCR de cromosoma 9 y ABL del cromosoma 22, generando dos tipos de proteínas quiméricas una de 190 kDa llamada p190 y otra de 210 kDa llamada p210 (no hay que olvidar que esta translocacion se presenta en el 95 % de los casos de LGC leucemia granulocitica crónica de acuerdo con la literatura). Por lo anterior su clasificación es compatible con LAL pre –B (22, 24, 56, 57, 60).

Paciente 34 por morfología se clasifico como LAM M4, y su inmunofenotipo es compatible con LAM M1. El resultado de su análisis molecular es positivo para inv16; es una inversión que esta asociada a LAM M4E, en este caso en el inmunofenotipo en anticuerpo monoclonal CD14 específico para células monociticas es negativo. Por lo que el resultado de la translocacion es fundamental para que el paciente reciba una terapia correcta. En este caso observamos que la morfología y el resultado de la translocacion coincidieron para LAM M4 siendo esta su clasificación final.

Paciente 44 por morfología se clasifico como LAL y su inmunofenotipo es compatible con como LAL, con presencia de marcadores mieloides positivos como CD14, CD13, en la literatura existe un modelo que se basa en puntaje y se necesitan más de 2 puntos para decir que trata de una leucemia aguda bifenotipica, de acuerdo al marcador que presente para que de esta manera se pueda clasificar como bifenotipica, con presencia aberrante de marcadores mieloides y así es el mismo caso para las leucemia mieloides con marcadores linfoides (154). Por morfología, inmunofenotipo y el análisis molecular se llega a un buen diagnostico del tipo de leucemia. En este caso el análisis molecular es positivo para t(12;21), y esta asocia su presencia en las leucemias LAL en un escaso 0.05 % de los casos por lo que su clasificación final es LAL. Se presenta la tabla 1 de puntuación para dar una clasificación bifenotipica. (135, 136, 137)

Tabla1 criterios para el diagnóstico de leucemia bifenotipica aguda.

Puntos	Línea B	Línea T	Línea mieloide
2	cCD79a	cCD3	cMPO
	IgM cit	TCR $\alpha\beta$	
	CD22 cit	TCR $\gamma\delta$	
1	CD19	CD2	CD13
	CD10	Cd5	CD33
	CD20	CD8	CD117
		CD10	CD65
0.5	Tdt	TdT	CD14
	CD24	CD7	Cd15
		Cd1a	CD64

Paciente 64 por morfología se clasifico como LAM sin especificar el subtipo, y su inmunofenotipo es compatible con LAM M4 por presentar marcadores especificaos de clona como lo son CD34+, CD14+, CD13+, CD33+, cMPO+. El resultado de su análisis molecular positivo para t(3;21).Esta es una translocacion que esta asociada al tratamiento recibido de SMD y LMC en su fase blástica y su progresión a leucemia aguda.

CONCLUSIONES

Es importante tomar en cuenta que en conjunto estos tres estudios son muy valiosos, para el seguimiento del estado que guarda nuestro paciente, desde el momento en que es diagnosticado hasta que se logra la remisión parcial o completa, de la neoplasia hematológica, si no también por su información de cara al valor diagnóstico y pronóstico. La remisión parcial se dice que se ha alcanzado, cuando el paciente en sangre periférica como en medula ósea guarda valores dentro de rangos normales de celularidad, pero en caso de que se halla identificado alguna de las translocaciones que ya se mencionaron anteriormente, siga saliendo positiva y remisión completa cuando en sangre periférica como en medula ósea guarde valores dentro de rangos de normalidad y la translocación que antes era positiva sea negativa.

En este estudio realizado, observamos también como en muchas de las literaturas revisadas, que la leucemia que tuvo un predominio mayor guardando distancias debido al número de pacientes que se analizan, como por ejemplo () fue la linfocítica con 41 casos correspondiendo a un 57.74 %, en este tipo de leucemia aguda predominan las leucemias de células B con un 97 % en todos sus estados de maduración y leucemia linfoblástica de células T con un 3 %, también coincidiendo con la literatura, después las mieloides con 27 casos correspondiendo a 38.02 %, en cuanto a las translocaciones que se presentaron de los 77 pacientes analizados solo 37 que corresponden a 48.02 % presentaron alguna de las 28 translocaciones y sus más de 80 puntos de ruptura, observándose que el mayor porcentaje fue para la translocación t(12;21) con 7 casos y un 9.09 %, después la t(15;17) y t(9;22) ambas con 6 casos y un 7.79 %.

Por lo que podemos concluir que del 100 % de casos de leucemias en aproximadamente el 84 % se resuelve sin complicaciones con la morfología, inmunofenotipo y el análisis molecular coincide con los resultados anteriores, y el otro 16 %, es más complicado por lo que es indispensable realizar el análisis molecular y dependiendo del resultado sabremos si coincide con el diagnóstico morfológico o inmunológico.

En el estudio morfológico observamos que los mieloblastos LAM M1 y M2, se pueden confundir con los linfoblastos de LAL 2, pues son muy parecidos morfológicamente y es necesario el inmunofenotipo para establecer la estirpe celular y en algunas ocasiones el análisis molecular como sucedió con los pacientes 6,22,25,65. .

También es común que las células de LAM M2 y M4 se confundan con las de LAM M3 especialmente en el subtipo hipogranular y cuando el porcentaje de células blasticas apenas pasa del 30 % como lo vimos con los pacientes 21,26.

En el paciente 34 el diagnóstico morfológico fue LAM M4 y su inmunofenotipo fue compatible con LAM M1, su análisis molecular coincidió con el diagnóstico morfológico y resulta que en especial este caso se determino que se trata de células blasticas en una etapa más temprana, llamadas células stem mielomonociticas y que pueden o no expresar CD14 y en

este caso no lo estaban expresando.

Por lo que con estos pacientes es de suma importancia realizar los tres métodos, para dar un buen diagnóstico y de esa manera reciban una terapia de acuerdo a su padecimiento y que no por ahorrar unos cuantos pesos reciban una terapia inadecuada, haciendo que se gaste más por paciente, ya que esto implica dar dosis más altas por más tiempo, permanecer internado además de que la calidad de vida del paciente empeora rápidamente, sin darle una oportunidad de que este se recupere y se incorpore a la vida laboral, estudiantil o familiar dependiendo del caso.

Por lo anterior concluimos que estos tres estudios en conjunto, nos dan un mejor resultado para el paciente que uno solo y que nunca hay que detenerse para llegar a dar un buen diagnóstico siempre y cuando se cuente con lo necesario para realizarlo.

Hoy en día con la tecnología de punta como lo es **RTPCR en Tiempo Real que se utiliza para cuantificar la translocación** se puede llevar un buen monitoreo desde el primer momento en que el paciente es diagnosticado, hasta llegar a la remisión completa, cuando los niveles de la translocación van disminuyendo hasta que ya no es detectable y entonces podremos decir que el paciente está en remisión ó bien si estos niveles empiezan a aumentar podremos decir que el paciente está en recaída, y al hematólogo también le puede decir si su tratamiento está funcionando o tiene que cambiar su esquema de terapia.

Esta técnica está disponible para las siguientes translocaciones: t(9;22), t(15;17) (esto no se realizó en estudio pero se comenta)(154,155,156,157)

Nota:

Las translocaciones que están no detectables, no se quiere decir que no exista alguna, si no que simplemente con nuestro método no lo estamos haciendo, algunas otras y solo por mencionar algunas como son: t(16;16)(p13;q22) que se presenta en LAM M6, Del 9 (q22) que se presenta en LAM M1, 11(q23) que se presenta en LAM M4a y M4b y rara vez en LAM M1 ó LAM M2, afección del cromosoma 5 y 7 por la terapia recibida, t(1;22) que se presenta en LAM M7 y que con el método que utilizamos no la estamos detectando, cabe mencionar que en nuestro estudio no encontramos una LAM M7, existen otras anormalidades cromosómicas como lo son las aneuploidias e hiperploidias que solo se pueden detectar por citogenética.

Se mencionan las translocaciones y las referencias que no se escribieron en este trabajo.

t(8;14) 76,78; **t(1;14)** 11,71,72,73,74 ,75,76; **t(10;14)** 76,80,81,82; **t(5;14)** 83; **t(7;9)** 84,85; **11q23** 97,98,99,100; **t(6;9)** 11,108,109,110; **t(1;11)** 111; **t(6;11)** 112,113; **t(10;11)** 114,115,116; **t(3;5)** 110,117,118,119; **t(12;22)** 111,112,112,120,121, **t(9;12)** 122,123; **t(9;11)** 125,126,127; **t(17;19)** 132,133,134; **t(3;11)** 142,143.

Lista de los CD (152).

GLOSARIO

Anticuerpo.- Tipo de proteína glucoproteica, también denominada Ig, producida por los linfocitos B y que se une a antígenos, a menudo con un elevado grado de especificidad y afinidad. La unidad estructural básica de un anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Las regiones variables n-terminales de las cadenas pesadas y ligeras forman los sitios de unión al antígeno, mientras que las regiones constantes C-terminales de las cadenas pesadas interactúan funcionalmente con otras moléculas del sistema inmunitario. Cada individuo tiene millones de anticuerpos diferentes, cada uno con un sitio de unión al antígeno exclusivo. Los anticuerpos secretados realizan diversas funciones efectoras, como la neutralización de antígenos, la activación del complemento y la promoción de la destrucción de microorganismos dependientes de los leucocitos.

Anticuerpo monoclonal.- Anticuerpo que es específico y que es producido por un hibridoma de células B (una línea celular derivada por la fusión de una célula B normal con una línea de células B mortales). Los anticuerpos monoclonales se usan extensamente en investigación y en el diagnóstico clínico y el tratamiento.

Antígeno.- Molécula que se une al anticuerpo o a un TCR. Los antígenos que se unen a los anticuerpos son todas las clases de moléculas. Los TCR sólo se unen a fragmentos peptídicos de proteínas que forman un complejo de moléculas del MHC.

ARN.- Acido ribonucleico.

ARNm.- Clase de moléculas de RNA, cada una de las cuales es complementaria de una cadena de DNA, es portador del mensaje genético desde el cromosoma a los ribosomas.

Ácidos nucleicos.- Polinucleótidos que se encuentran en la naturaleza en los que los residuos nucleotídicos están unidos en una secuencia específica mediante enlaces fosfodiéster; DNA y RNA.

Cadena ligera de la inmunoglobulina.- una de dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en una molécula de anticuerpo. La unidad estructural básica de un anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras idénticas, cada una unida mediante un puente disulfuro a una de las dos cadenas idénticas. Cada cadena ligera se compone de un dominio de Ig variable (V) y de un dominio de Ig constante (C). Existen dos isotipos de cadenas ligeras denominadas κ y λ , ambos idénticos desde el punto de vista funcional. Aproximadamente el 60 % de los anticuerpos humanos tienen cadenas ligeras κ y el 40 % tienen cadenas ligeras λ .

Cadena pesada de inmunoglobulina.- Una de dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en una molécula de anticuerpo. La unidad estructural básica de un anticuerpo consiste en dos cadenas pesadas idénticas unidas por puentes disulfuro y dos cadenas ligeras idénticas. Cada cadena pesada se compone de un dominio de Invariable (V) y de tres o cuatro dominios de Ig constantes (C). Los diferentes isotipos de anticuerpos, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, se distinguen por sus diferencias estructurales en las regiones constantes de las cadenas pesadas.

Estas regiones también median funciones efectoras, tales como la activación del complemento o de los fagocitos.

Célula B madura.- Célula B no estimulada (“virgen”) funcionalmente competente que expresa IgM e IgD, que presenta el estadio final de la maduración de las células B en la médula ósea y que puebla los órganos linfoides periféricos.

Célula madre.- Célula diferenciada que se divide continuamente y que da origen a nuevas células madre y a células de muchas estirpes distintas. Por ejemplo, todas las células sanguíneas se originan de una célula madre hematopoyética común.

Célula madre pluripotencial.- Célula indiferenciada de la médula ósea que se divide continuamente y que da lugar a nuevas células madre y a células de numerosas diferentes. Una célula madre hematopoyética de la médula ósea origina células de las estirpes linfoides, mieloides y eritrocíticas.

Célula plasmática.- linfocito B secretor de anticuerpos terminalmente diferenciado con un aspecto histológico característico, consistente en una forma oval, un núcleo excéntrico y un halo perinuclear.

Célula pre-B.- Célula B en desarrollo presente solo en los tejidos hematopoyéticos que se encuentra en un estadio de maduración caracterizado por la expresión de cadenas pesadas citoplasmáticas μ y por cadenas ligeras sustitutivas de Ig, pero no cadenas ligeras. Los receptores de las células pre-B compuestos de cadenas μ y de cadenas ligeras sustitutivas hacen llegar señales que estimulan la maduración de la célula pre-B hasta el estadio de célula B inmadura.

Célula pre-T.- linfocito en desarrollo en el timo en un estadio de maduración caracterizado por la expresión de la cadena β del receptor de la célula T (TCR), pero no de la cadena α ni de las moléculas CD4 ni CD8. En las células pre-T, la cadena β del TCR se encuentra en la superficie celular como parte del receptor de la célula pre-T.

Célula pro-B.- célula B en desarrollo en la médula ósea que es la primera célula comprometida a la estirpe de linfocitos B, las células pro-B no producen Ig, pero pueden diferenciarse de otras células inmaduras por la expresión de moléculas de superficie restringidas para las células de estirpe B, como CD19 y CD10.

Célula pro-T.- Célula T en desarrollo en la corteza tímica que ha llegado recientemente de la médula ósea y que no expresa TCR, CD3, cadenas ζ ni moléculas CD4 y CD8. Las células pro-T también se denominan timocitos doblemente negativos.

Citometría de flujo.- Método para el análisis del fenotipo de las poblaciones celulares que requieren un instrumento especializado (citómetro de flujo) que destaca la fluorescencia en células individuales en una suspensión y, por lo tanto, determina el número de células que expresan la molécula a la que se une la sonda fluorescente. Las suspensiones de células se

incubaban con anticuerpos marcados fluorescentemente o con otras sondas, y la cantidad de sonda unida por cada célula de la población se mide haciendo pasar las células una a una a través de un fluorímetro con un haz incidente generado por láser.

Citoquinas.- Proteínas producidas por muchos tipos de células distintos que median las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Las citoquinas son unos de los principales mediadores de las comunicaciones entre las células del sistema inmunitario.

CD3.- Un complejo trimérico de cadenas γ , δ y ϵ que, junto con un hemodímero $\zeta\zeta$ o un heterodímero $\zeta\eta$, actúa como una unidad transdutora de señales para el receptor celular T.

CD4.- Glucoproteína de la superficie celular, usualmente en las células T cooperadoras, que reconoce las moléculas de la clase II del MHC en las células presentadoras de antígenos.

CD8.- Glucoproteína de la superfamilia celular, usualmente presente en la célula T citotóxica que reconoce las moléculas de clase I del MHC en las dianas celulares.

Código genético.- conjunto de palabras codificadas en forma de tripletes en el DNA (o mRNA) que codifica los aminoácidos de las proteínas.

Codón.- Secuencia de tres nucleótidos adyacentes a un ácido nucleico que codifica a un aminoácido específico.

Cromatina.- complejo filamentoso de DNA, histonas y otras proteínas que constituyen al cromosoma eucariótico.

Cromosoma.- Molécula única y grande de DNA y sus proteínas asociadas, que contiene muchos genes, almacena y transmite información genética.

DNA complementario.- (cDNA).- DNA utilizado en la clonación de DNA producido normalmente por la transcriptasa inversa; es complementario de un mRNA determinado.

Ganglio linfático.- Agregados nodulares encapsulados de pequeño tamaño de tejido rico en linfocitos, situados a lo largo de conductos linfáticos de todo el organismo, en los que se inician las respuestas de inmunidad adaptativa a los antígenos transportados por la linfa.

Hematopoyesis.- Desarrollo de células sanguíneas maduras (eritrocitos, leucocitos, y plaquetas), a partir de células madre pluripotenciales en la médula ósea y en el hígado fetal. La hematopoyesis está regulada por diferentes citocinas producidas por células del estroma de la médula ósea, células T y otros tipos celulares.

Hibridoma.- Línea celular derivada mediante fusión celular, o hibridación de células somáticas, entre un linfocito normal y una línea tumoral de linfocito inmortalizada. Los hibridomas de las células B creados mediante fusión de células B normales con una especificidad antigénica definida con una línea de células de mieloma se utilizan para producir

anticuerpos monoclonales. Los hibridomas de células T creados mediante la fusión de una célula T normal de una especificidad definida con una línea tumoral de células T se utilizan habitualmente en investigación.

Leucemia.- Neoplasia maligna de los precursores de la medula ósea de las células sanguíneas, en la que un elevado número de células leucémicas suele ocupar la medula ósea y a menudo circula en el torrente sanguíneo. Las leucemias linfocíticas derivan de los precursores B o T, mientras que las leucemias eritroides derivan de los precursores eritrocíticos.

Ligando de c-kit (factor de las células madre).- Proteína necesaria para la hematopoyesis, las etapas iniciales del desarrollo de las células T en el timo y el desarrollo de los mastocitos. El ligando c-kit es sintetizado por las células del estroma de la medula ósea y del timo como proteína unida a la membrana y como proteína soluble, y se une a un receptor de membrana de tipo tirosina quinasa (c-kit) expresado por las células madre pluripotenciales.

Ligando de Fas (CD).- Proteína de membrana que es un miembro de la familia de proteínas del TNF que se expresa en las células T activadas. El ligando de Fas se une al Fas, con lo que estimula una vía de señalización que conduce a la muerte celular apoptótica de la célula que expresa Fas. Las mutaciones en el gen que codifica el ligando de Fas causan una enfermedad autoinmunitaria sistémica en el ratón.

Linfocitos B.- El único tipo de célula capaz de producir moléculas de anticuerpo y, por consiguiente, el componente celular fundamental de las respuestas de la inmunidad humoral. Los linfocitos B o células B, se desarrollan en la medula ósea, y las células B maduras se encuentran fundamentalmente en los folículos linfoides de los tejidos linfoides secundarios, en la medula ósea y, en escasa cantidad, en la circulación.

Linfocito B maduro.- Célula B con negatividad para IgD y positividad para IgM de membrana, recientemente derivada de los precursores de la medula ósea, que no prolifera y se diferencia en respuesta a los antígenos, si no que puede experimentar una muerte apoptótica o perder la capacidad de respuesta funcional. Esta propiedad es importante para la selección negativa de las células B que son específicas de los antígenos propios presentes en la medula ósea.

Linfocito no estimulado.- linfocito B o T maduro que no se ha encontrado previamente con un antígeno, ni es la progenie de un linfocito maduro estimulado por un antígeno. Cuando los linfocitos vírgenes son estimulados por un antígeno, se diferencian en linfocitos efectores, como las células B secretoras de anticuerpos o las células T colaboradoras y los linfocitos T citolíticos (CTL). Los linfocitos no estimulados tienen marcadores de superficie y patrones de recirculación que son diferentes de los linfocitos previamente activados.

Linfocito T.- Tipo de célula que media las respuestas inmunitarias celulares en el sistema de inmunidad adaptativa. Los linfocitos T maduran en el timo, circulan en la sangre, pueblan los tejidos linfoides periféricos y son reclutados a sitios periféricos de exposición al antígeno. Expresan receptores para el antígeno (TCR) que reconocen fragmentos peptídicos de proteínas extrañas unidas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH). Las

subpoblaciones funcionales de los linfocitos T son las células T CD4+ colaboradoras y los linfocitos T citolíticos (CTL) CD8+.

Medula ósea.- Cavity central del hueso que es el lugar de generación de todas las células sanguíneas circulantes del adulto, incluidos en los linfocitos T inmaduros, y el sitio de maduración de las células B.

Moléculas CD.- Moléculas de la superficie celular expresadas en diversos tipos de células del sistema inmunitario que se distinguen en función del “grupo de diferenciación” (“cluster of differentiation”) o número CD.

Monocito.- Tipo de célula sanguínea circulante derivada de la medula ósea que es el precursor de los macrófagos titulares. Los monocitos son reclutados activamente a los sitios de inflamación, donde se diferencian a macrófagos.

Neutrófilo.- Leucocito circulante más abundante. También denominado leucocito polimorfonuclear (PMN), que es reclutado a los sitios de inflamación y es capaz de fagocitar y de digerir enzimáticamente los microorganismos.

Nucleótidos CpG.- Secuencias citosina-guanina no metiladas presentes presentes en el ADN bacteriano que tiene propiedades adyuvantes en el sistema inmunitario de los mamíferos y que pueden ser importantes para la eficacia de las vacunas de ADN-

Nucleótidos N.- Nombre con el que se designan los nucleótidos que se añaden al azar en las uniones entre los segmentos génicos V, D y J en los genes de los Ig o de los TCR durante el desarrollo de los linfocitos. La adición de 20 de estos nucleótidos, que es mediada por la enzima desoxirribonucleotidil transferasa Terminal, contribuye a la diversidad de los repertorios de anticuerpos y TCR.

Nucleótidos P.-Breves secuencias nucleotídicas de repetición invertidas en las uniones VDJ de los genes reordenados de las Ig y los TCR, que se generan por intermediarios de orquilla y que contribuyen a la diversidad de la unión de los receptores para el antígeno.

Órgano linfóide generador.-Órgano en el que los linfocitos se desarrollan a partir de los precursores inmaduros. La medula ósea y el timo son los principales órganos linfoides generadores en los que se desarrollan los linfocitos B y T, respectivamente.

Órganos/tejidos linfoides periféricos.- grupos organizados de linfocitos y células accesorias, incluidos el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides asociados a las mucosas, donde se inician las respuestas inmunitarias adaptativas.

Placas de peyer.- Tejido linfóide organizado en la lamina propia del intestino delgado en el que pueden iniciarse respuestas inmunitarias a los antígenos ingeridos. Las placas de peyer se componen fundamentalmente de células B, con un número menor de células T y de células

accesorias, todas dispuestas en folículos similares a los de los ganglios linfáticos, a menudo con centros germinales.

Superfamilia de las inmunoglobulinas.- Extensa familia de proteínas que contienen un motivo estructural globular denominado dominio de Ig, o pliegue de Ig, descrito inicialmente en los anticuerpos. Muchas proteínas de importancia en el sistema inmunitario, como los anticuerpos, los TCR, las moléculas del MHC y las moléculas CD4 y Cd8, son miembros de esta superfamilia.

Tirosina quinasa de células B (Btk).- Tirosina quinasa de la familia Src que desempeña un papel esencial en la maduración de las células B. Las mutaciones en el gen que codifica a la Btk causan agammaglobulinemia, una enfermedad caracterizada por la ausencia de maduración de las células B más allá del estadio de célula Pre-B.

BIBLIOGRAFIA

- 1^a Shirlyn B Mckenzi, Hematologia Clinica, Manual Moderno, 1991, pp, 1,2,3,10,331.
- 2 Vierordt, K.: Zahlungen der Blutkörperchen des Menschen. Arch. Physiol. Heilk.,11:327,1852 (2)
- 3 Singer, S. J.;and Nicholson , G. L. ; The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, 175,720, 1972. (4)
- 4 Wolfe, S. I.: Biology of the cell, 2nd Ed. Belmont, Wadswort Publishing, 1981.(5)
- 5 Weiss, L. L The Blood Cells and Hematopoietic tissues. New York, Mcgraw-Hill, 1977. (6)
- 6 Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al.: Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds.: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001. World Health Organization Classification of Tumours, 3, pp 81-87.(10)
- 7 Caligiuri MA, Strout MP, Gilliland DG: Molecular biology of acute myeloid leukemia. Semin Oncol 24 (1): 32-44, 1997.(11)
- 8 Kwaan HC, Wang J, Boggio LN: Abnormalities in hemostasis in acute promyelocytic leukemia. Hematol Oncol 20 (1): 33-41, 2002. (21)
- 9 Barbui T, Falanga A: Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia. Semin Thromb Hemost 27 (6): 593-604, 2001. (22)
- 10 de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, et al.: The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature 347 (6293): 558-61, 1990. (23)
- 11 Melnick A, Licht JD: Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood 93 (10): 3167-215, 1999. (24)
- 12 Lo Coco F, Diverio D, Falini B, et al.: Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. Blood 94 (1): 12-22, 1999. (25)
- 13 Zaccaria A, Valenti A, Toschi M, et al.: Cryptic translocation of PML/RARA on 17q. A rare event in acute promyelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 138 (2): 169-73, 2002. (26)

- 14 Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al.: Acute myeloid leukaemia not otherwise categorised. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds.: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001. World Health Organization Classification of Tumours, 3, pp 91-105. (48)
- 15 Benditti A, Del Poeta G, Stasi R, et al.: Minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0): cytochemical, immunophenotypic and cytogenetic analysis of 19 cases. *Br J Haematol* 88 (4): 784-93, 1994. (49)
- 16 Roumier C, Eclache V, Imbert M, et al.: M0 AML, clinical and biologic features of the disease, including AML1 gene mutations: a report of 59 cases by the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Blood* 101 (4): 1277-83, 2003. (50)
- 17 Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al.: The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98 (6): 1752-9, 2001. (51)
- 18 Béné MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al.: Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. *Br J Haematol* 113 (3): 737-45, 2001. (52)
- 19 Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, et al.: FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *Br J Haematol* 111 (1): 190-5, 2000. (53)
- 20 Alsabeh R, Brynes RK, Slovak ML, et al.: Acute myeloid leukemia with t(6;9) (p23;q34): association with myelodysplasia, basophilia, and initial CD34 negative immunophenotype. *Am J Clin Pathol* 107 (4): 430-7, 1997. (54)
- 21 Stanley M, McKenna RW, Ellinger G, et al.: Classification of 358 cases of acute myeloid leukemia by FAB criteria: analysis of clinical and morphologic features. In: Bloomfield CD, ed.: Chronic and Acute Leukemias in Adults. Boston, Ma: Martinus Nijhoff Publishers, 1985, pp 147-74. (55)
- 22 Cigudosa JC, Odero MD, Calasanz MJ, et al.: De novo erythroleukemia chromosome features include multiple rearrangements, with special involvement of chromosomes 11 and 19. *Genes Chromosomes Cancer* 36 (4): 406-12, 2003. (59)
- 23 Domingo-Claros A, Larriba I, Rozman M, et al.: Acute erythroid neoplastic proliferations. A biological study based on 62 patients. *Haematologica* 87 (2): 148-53, 2002. (60)

- 24 Olopade OI, Thangavelu M, Larson RA, et al.: Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of 26 patients with acute erythroblastic leukemia. *Blood* 80 (11): 2873-82, 1992. (61)
- 25 Bernstein J, Dastugue N, Haas OA, et al.: Nineteen cases of the t(1;22)(p13;q13) acute megakaryoblastic leukaemia of infants/children and a review of 39 cases: report from a t(1;22) study group. *Leukemia* 14 (1): 216-8, 2000. (62)
- 26 Nichols CR, Roth BJ, Heerema N, et al.: Hematologic neoplasia associated with primary mediastinal germ-cell tumors. *N Engl J Med* 322 (20): 1425-9, 1990.(63)
- 27 Carroll A, Civin C, Schneider N, et al.: The t(1;22) (p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 78 (3): 748-52, 1991. (64)
- 28 Pagano L, Pulsoni A, Vignetti M, et al.: Acute megakaryoblastic leukemia: experience of GIMEMA trials. *Leukemia* 16 (9): 1622-6, 2002. (66)
- 29 Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, et al.: Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood* 97 (12): 3727-32, 2001. (67)
- 30 Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DN. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999; 12: 3997-4010. (3)
- 31 Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 1999; 36: 373-389. (4)
- 32 Harrison CJ. The management of patients with leukemia: the role of cytogenetics in this molecular era. *Br J Haematol* 2000; 108: 19-30. (20)
- 33 Le Beau MM. One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 341-334. (21)
- 34 Kallionemi OP, Kallionemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridisation - a rapid new method for detecting and mapping DNA amplifications in tumours. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 41-46. (22)
- 35 Schrök E, du Manoir S, Veldman T, Schoel B, Weinberg J, Ferguson-Smith MA et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.(23)
- 36 Bagg A, Kallakury BVS. Molecular Pathology of Leukemia and Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 112 (suppl 1): S76-S92. (24)

- 37 Medeiros LJ, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1189-1207.(25)
- 38 Cross NCP. Quantitative PCR techniques and applications. *Br J Haematol* 1995; 89: 693-697. (26)
- 39 Wittwer CT, Hermann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplifications. *BioTechniques* 1997; 22: 130-138.(27)
- 40 Willman, CL. Acute Leukemias: a paradigm for the integration of new technologies in diagnosis and classification. *Mod Pathol* 1999; 12: 218-228.(28)
- 41 Going JJ, Gusterson BA. Molecular pathology and future developments. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1895-1904. (29)
- 42 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-458. (30)
- 43 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981; 47: 553-561. (31)
- 44 Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392. (32)
- 45 Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink K, Vardiman J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-3849. (33)
- 46 Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, et al.: Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 118 (2): 426-31, 2002.
- 47 BcMAN COULTER
- 48 DNA Tecnology A/S HemaVision Manual, Multiplex RT-PCR System for Typing/Subtyping of Leukemia (ROCHE).
- 49 Panagopoulos I, Isaksson M, Lindvall C, et al.: Genomic characterization of MOZ/CBP and CBP/MOZ chimeras in acute myeloid leukemia suggests the involvement of a damage-repair mechanism in the origin of the t(8;16)(p11;p13). *Genes Chromosomes Cancer* 36 (1): 90-8, 2003.

- 50 G. Rothel y G. Schmitzl, for the Group on Flow Cytometry and Image Analysis, Consensus Document on Leukemia Immunophenotyping, *Leukemia* 1996;10:877-895 (1996). (50)
- 51 C. Darrell Jennings and Kenneth A. Foon Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic malignancy. Departaments of Pathology and Laboratory Medicine and Internal Medicine, Division of Hematology and oncology, University of Kentucky, College of Medicine, and the Lucille Parker Cancer Center, Lexington, KY: (51)
- 52 Sanchez Garcia I. Consequences of Chromosomal Abnormalities in Tumor development. *Annual Review of Genetics*; 1997; 1/1. (52)
- 53 Charles L Sawyers, *Molecular Genetics of Acute Leukemia*, *Lancet* 1997; 349: 196-200. (53)
- 54 Rowley, Janet D. The critical role of chromosome translocations in human 11 leukemias. *Annual Review of Genetics*1998/1/1. (54)
- 55 Maureen D. Megonigal, Eric F. Rappaport, et al. Panhandle PCR for cDNA : A rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. *Medical Sciences*. August 15, 2000 /vol. 97/no. 17/ 9597-9602. (55)
- 56 Stefan Faderl, M. D; Moshe Talpaz, M. D; Zeev Estrov. et al. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*. July 15, 1999/vol. 341/no.3/164-171. (56)
- 57 Michael W. N. Deininger, John M. Goldman, and Junia V. Melo. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 15 November 2000/vol. 96/ no. 10/ 3313-3356 (57)
- 58 BI-Ching Sang, Liangru Shi, Peter Dias, Li Liu, Jia Wei. Et al. Monoclonal Antibodies Specific To the Scute Lymphoblastic Leukemia t(1 ;19)-Associated E2A/pbx1 Chimeric Protein: Characterization and Diagnostic Utility. *Blood*/vol. 89/ no. 8 (April15) /1997:pp. 2909-2914. (58)
- 59 S. Izraeli, H. Kovar, H. Gardner and T. Lion. Unexpected heterogeneity in E2A/PBX1 fusion messenger RNA detected by the polymerase chain reaction in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Vol. 80, Issue 6, pp 1412-1417, 09/15/1992*. (59)
- 60 Ching-Hon Pui . *Childhood leukemias*. Cambridge University Press 1999, edited United States of America pp. 111,144,145,190,197,198,199,201,205,220,226,230,231,232,234. (60)

- 61 Ching-Pin Chang, Immaculata de Vivo and Michael L. Cleary. The Hox Cooperativity Motif of the Chimeric Oncoprotein E2a-Pbx1 is Necessary and Sufficient for Oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. Jan. 1997, vol. 17/no. 1/pp. 81-88.(61)
- 62 Toshiya Inaba, Takeshi Inukai, Takao Yoshihara. Et al. Reversal of apoptosis by the leukemia-associated E2A-HLF chimaeric transcription factor. *Nature* Vol. 382/8 August 1996 /541-544. (62)
- 63 Kazuhito Yamamoto, Masao Seto, Shinsuke Lida, Hirokazu Komatsu, et al. A Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction Detects Heterogeneous Chimeric mRNAs in Leucemias with 11q23 Abnormalities. *Blood*, Vol. 83/No. 10 (May15), 1994 : pp.2912-2921. (63)
- 64 Jeffrey E. Rubnitz, Joseph Morrissey, Peter A. Savage, and Michael L. Cleary. ENL, the Gene Fused With HRX in t(11;19) Leukemias, Encodes a Nuclear protein With transcriptional Activation Potential in Lymphoid. *Blood*, Vol. 84, No. 6 (September 15) , 1994:pp. 1747-1752. (64)
- 65 Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine University of Tokio Japan vol.85, Issue 8, pp. 2017-2024, 15-04-1995. (65)
- 66 K. Mitani, Y. Kanda, S. Ogawa, Y. Yazaki and H. Iría. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. Vol. 87, Issue 11, pp. 4804-4808, 06-01-1996. (66)
- 67 S.P. Romana, M. Mauchauffé, M. Le Coniat, et al. The t(12 ;21) of Acute Lymphoblastic Leukemia Results in a tel-AML1 Gene Fusion. *Blood*, Vol. 85, No.12 (June 15),1995: pp. 3662-3670. (67)
- 68 Xiao-Tang Kong, Kohmei Ida, Hotishi Ichikawa, Consistent detection of TLS/FUS-ERG Chimeric Transcripts in Acute Myeloid Leukemia With t(16;21)(p11;q22) and Identification of a Novel Transcript, *Blood*, Vol. 90, No. 3 (August 1), 1997: pp. 1192-1199.
- 69 Florence Bernardin, Yandan Yang, Rebecca Cleaves, Marianna Zahurak, et al. AML1, Expressed from t(12;21) in Human Acute Lymphoblastic Leukemia, Induces Acute leukemia in Mice. *Blood*. 1 March 2002, Vol. 99, No. 5,pp. 1776-1784. (69)
- 70 Victoria J. Weston, Carmel M. McConville, Jullian R. Mann, et al. Molecular Analysis of Single Colonies Reveals a Diverse Origin of Initial Clonal Proliferation in B-Precursor Acute lymphoblastic Leukemia that Can Precede the t(12;21) Translocation. *Blood*,15-july-202, Vol. 100, No. 2, pp. 640-666. (70)

- 71 David S. Chervinsky, Xian-Feng Zhao, Du H. Lam, Disordered T-Cell Development and T-cell Malignancies in SCL LMO1 Double-Transgenic Mice : Parallels With E2A-Deficient Mice, *Molecular and Cellular Biology*, July 1999, p. 5025-5035, Vol.19, No. 7. (71)
- 72 Fenaux P, Vanhaesbroucke C, Estienne MH, et al.: Acute monocytic leukaemia in adults: treatment and prognosis in 99 cases. *Br J Haematol* 75 (1): 41-8, 1990.
- 73 A. Lolascon, M. F. Faienza, B. Coppola, A. Moretti, G. Basso, Frequent clonal loss of heterozygosity (LOH) in the chromosomal region 1p32 occurs in childhood T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) carrying rearrangements of the TAL1 gene, *Leukemia*, March 1997, Vol.11, Number 3, Pages 359-363. (73)
- 74 C.G. Begley, P.D. Aplan, M.P. Davey, K.Nakahara, K.Tchorz, J. Kurtzberg, Chromosomal Translocation in a Human Leukemic Stem-Cell Line Disrupts the T Cell Antigen Receptor α -Chain Diversity Region and Results in a Previously, *PNAS*, March 15, 1989, Vol. 86, No. 6, p. 2031-2035. (74)
- 75 Finger, L.R.; Kagan, J. ; Christopher, G.; Kurtzberg, J. ; Herhfield, Involvement of the TCL5 gene on human Chromosome 1 in T-Cell leukemia and me, *Journal Article*, 1989 July 01, ISSN0027-8424; CODEN: PNASA, Pages 5039-5043. (75)
- 76 Fatih M. Uckum, Martha G. Sensel, Lei Sun, Peter G. Steinherz, Michael E. Trigg, Biology and treatment of Childhood T-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia, *Blood*, Vol. 91, No. 3 (February 1), 1998: pp. 735-746. (76)
- 77 Reiner Siebert, Peter Matthiesen, Svetlana Harder, Yanming Zhang, Annkathrin, Borowski, Application of Interphase Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B.cell Lymphomas, *Blood*, Vol. 91, No. 3 (February 1), 1988: pp. 948-990. (77)
- 78 Katia Basso, Emanuela Frascella, Luigi Zanesco and Angelo Rosolen, Improved Long-Distance Polymerase Chain Reaction for the Detection of t(8;14)(q24;q32) in burkitt's Lymphomas, *American journal of Pathology* 1999;155:1479-1485. (78)
- 79 M R Velangi, M M Reid, N Bown, G H Jackson, G P Summerfield, Acute Lymphoblastic Leukemia of the L3 subtype in adults in the Northern health region of England 1983-99, *Journal of Clinical Pathology* 2002; 55:591-595. (79)
- 80 Lu M, Dube I, Raimondi S, Carroll A, Zhao Y, Minden M, Sutherland P, Molecular Characterization of the t(10;14) translocation breakpoints in T-cell acute lymphoblastic leukemia: further evidence for illegitimate physiological recombination, *Genes Chromosomes Cancer*, 1990 Sep;2(3):217-22. (80)
- 81 Dube ID, Kamel-Reid S, Yuan CC, Lu M, Wu X, Corpus G, Raimondi S, A novel

- human homeobox gene lies at the Chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with Chromosomal translocation t(10;14), *Blood*, 1991 Dec 1;78(11):2296-3003. (81)
- 82 Kagan J, Finger LR, Letofsky J, Finan J, Nowell PC, Croce CM, Clustering of breakpoints on chromosome 10 in acute T-Cell leukemias with the t(10;14) chromosome translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jun; 89(11): 4161-5.(82)
- 83 Hélene Cavé, Stefan Sucie, Claude Preudhomme, Bruce Poppe, Alain Robert, Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5 ;14)(q35 ;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies : results of EORTC studies 58881 and 58951, *Blood*, 15 January 2004, Vol.103, No. 2, pp.442-450. (83)
- 84 Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, Calzavara E, Cecchinato V, Rossi V, Biondi A, Comi P, A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia, *Cancer Lett*, 2005 Feb 28;219(1):113-20. (84)
- 85 A K Stewart, A C Schuh, White cells 2: impact of understanding the molecular basis of haematological malignant disorders on clinical practice, *Lancet* 2000, 355:1447-53. (85)
- 86 Tiziano Barbui, Guido Finazzi, and Anna Falanga, The impact of All-trans-retinoic Acid on the Coagulopathy of Acute promyelocytic Leukemia, *Blood* Vol. 91, No. 9 (May 1), 1998:pp. 3093-3102. (86)
- 87 Francesco Lo Coco, Daniela Diverio, Brunangelo Falini, Andrea Biondi, Clara Nervi, Genetic Diagnosis and Molecular Monitoring in the Management of Acute promyelocytic Leukemia , *Blood*, Vol.94 No. 1 (July 1) 1999: pp. 12-22. (87)
- 88 Scott C. Kogan, Suk-hyun Hong, David B, Shultz, Martin L, Privatsky, Leukemia initiated by PMLRAR : the PML domain plays a critical role While retinoic acid-mediated transactivation is dispensable, *Blood*, 1 March 2000, Vol. 95, No. 5 ,pp.1541-1550. (88)
- 89 Robert L. Redner, Jianxiang Wang, Johnson M. Lui, Chromatin Remodeling and Leukemia: New Therapeutic Paradigms, *Blood*, Vol. 94 No. 2 (July), 1999: pp. 417-428. (89)
- 90 RL Redner, EA Rush, S Faas, WA Rudert and SJ Corey, The t(15;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion, *Issue 3*, 1996, Vol.87, pp. 882-886. (90)

- 91 JD Licht, C Chomienne, A Goy, A Chen, AA Scott, DR Head, Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17), Issue 4,1995, Vol.85,pp. 1083-1094. (91)
- 92 Mitsuhiro Osaka, Janet D. Rowley, Nancy J. Zeleznik-Le MSF (MLL-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;q25), Issue 11,1999,Vol. 96 (May 25), pp. 6428-6433. (92)
- 93 Toshie Gamou, Eiko Kitamura, Fumie Hosada, Kimiko Shimizu, Kenji Shinohara, The Partner Gene of AML1 in t(16;21) Myeloid Malignancies Is a Novel Member of the MTG8(ETO) Family, Blood, Vol.91, No. 11(June 1),1998; pp.4028-4037. (93)
- 94 Xiao-Tang Kong, Kohmei Ida, Hitoshi Ichikawa, Kimiko Shimizu, Misao Ohki, Consistent Detection of TLS/FUS-ERG Chimeric Transcripts in Acute Myeloid Leukemia with t(16;21)(p11;q22) and Identification of a Novel Transcript, Blood, Vol. 90. No. 3 (August 1) 1997 : pp. 1192-1119. (94)
- 95 JR Downing, DR Head, AM Curci-Briant, MG Hulshof, TA Motroni, SC Raimondi, AML1/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukemia containing the t(8;21)(q22;q22) translocation, Volume 81, Issue 11, pp. 2860-2865, 06/01/1993. (95)
- 96 K. Tobal, J. Newton, M. Macheta, J. Chang, G. Morgenstern, P. A. S. Evans, Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse, Blood, 2000; 95:815-819. (96)
- 97 K Mitani, S Ogawa, T Tanaka, H Miyoshi, M Kurokawa, H Mano, Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia, The EMBO Journal Vol. 13,pp. 504-510. (9)
- 98 T Tanaka, K Mitani, M Kurokawa, S Ogawa, K Tanaka, J Nishida, Y Yazaki, Dual functions of the AML1-Evi-1 chimeric protein in the mechanism of leukemogenesis in t(3;21) leukemias, Mol. Cell. Biol; May 1995,2383-2392, Vol. 15, No. 5. (98)
- 99 Zent, C. S., Matheiu, C.; Rowley, J. D., The chimeric genes AML1-DS1 and AML1/EAP inhibit AML1B activation at the CSF1R promoter, but only AML1/MDS1 has tumor-promoter properties, 06-02-06, PNASA6;ISSN 0027-8424, Journal, Vol. 93; Issue: 3, PBD, pp. 1044-1048. (99)
- 100 Mineo kurokawa, kinuko Mitani, Yoichi Imai, Seishi Ogawa, Yoshio Yazaki, The t(3;21) Fusion Product, AML1/Evi-1, Interacts With Smad3 and Blocks Transforming Growth Factor- β -mediated Growth Inhibition of myeloid Cells, Blood, Vol. 92 No. 11(December 1), 1998; pp. 4003-4012. (100)

- 101 Krzysztof Mrózek, Thomas W. Prior, Colin Edwards, Guido Marcucci, Comparison of Cytogenetic and molecular Genetic Detection of t(8;21) and inv(16) in a Prospective Series of Adults With De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study, *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 19, Issue 9 (May) ,2001; 2482- 2492.(92a) (101)
- 102 A.Gural, M. Shtalrid, P. Raanani, S. Ben Neriah, N. Goldschmidt, Inv (16) is not associated with favorable prognosis in Israeli AML patients-a multi-center retrospective analysis, 4th European Cytogenetics Conference, September 6-9, 2003- Bologna Italy. (93b)(102)
- 103 Bart Lutterbach, Yue Hou, kristie L. Durst, and Scott W. hiebert, The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional corepressor, Vol. 96, Issue 22, 12822-12827, October 26, 1999. (94b)
- 104 Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al: Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. In . Jaffe ES, Harris NL, Stein H , et al., eds.: *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France. IARC Press, 2001, World Health Organization Classification of Tumours, 3; pp. 81-7. (96b)
- 105 Kyoung Un Park, Dong Soon Lee, Hye Seung Lee, Chong Jai Kim, Granulocytic Sarcoma in MLL-Positive Infant Acute Myelogenous Leukemia, *American Journal of Pathology*. 2001, 159. 2011-2016. (97b)(105)
- 106 Claudia Schoch, Susanne Schnittger, Mirjam Klaus, Wolfgang Kern, AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases, *Blood*, October 2003 , Vol. 102, No.7 , pp 2394-2402. (98b)(106)
- 107 H Poirel, K Rack, E Delabesse, I Radford-Weiss, X Troussard, C Debert, D Leboeuf, Incidence and characterization of MLL gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5; Volume 87, Issue 6, pp. 2496-2505, 03/15/1996. (99B)(107)
- 108 Fornerod M, Boer J, van Baal S, Morreau H, Grosveld G; Interaction of cellular proteins with the leukemia specific fusionproteins DEK-CAN and SET-CAN and their normal counterpart, the nucleoporin CAN; oncogene, 1996 Oct. 17; 13():1801-8. (100)(108)
- 109 Judith Boer, Jacqueline Bonten-Surtel, and Gerard grosveld; Overexpression of the Nucleoporin CAN/NUP214 Induces Growth Arrest, Nucleocytoplasmic transport Defects, and Apoptosis; *Mol Cell Biol*, March 1998,p. 1236-1247, Vol. 28, No. 3 (109)
- 110 Hiroyuki Hamaguchi, Kaoru Nagata, Katsuya Yamamoto, Izumi

- Fujikawa; Establishment of a novel human myeloid leukemic cell line (FKH-1) with t(6;9) (p23;q34) and the expression of dek-can chimeric transcript, *British Journal of Haematology* Volume 102 issue 5 page 1249- August 1998. (103)
- 111 W Tse, W Zhu, HS Chen and A Cohen; Novel gene, AF1q, fused to MLL in t(1;11)(q21;q23) is specifically expressed in leukemic and immature hematopoietic cells, *The American Society of Haematology*, Volume 85, Issue 3, pp. 650-656, 02/01/1995. (104)
- 112 Roland P. Kuiper, Marga Schepens, Jose Thijssen, Martien van Asseldonk, Eva van den Berg; Upregulation of the transcription factor TFEB in t(6;11)(p21;q13)- positive renal cell carcinomas due to promoter substitution, *Human Molecular Genetics*, 2003, Vol. 12, No. 14 1661-1669. (105)
- 113 Ian J. Davis, Bae-Li His, Jasson D. Arroyo, Sara O Vargas, Y Albert Yeh; Cloning of an Alpha-TFEB fusion in renal tumors harboring the t(6;11)(p21;q13) chromosome translocation *Medical Sciences*, May 13, 2003, Vol. 100, No. 10, pp. 6051-6056. (106)
- 114 T choplin, P Ayton, OA Bernard, V Saha, V Della Valle, J Hillion, A Gregorini; Novel class of zinc finger/leucine zipper genes identified from the molecular cloning of the t(10;11) translocation in acute leukemia, *Medical Oncology*, Vol. 85, Issue 6, pp. 1435-1441, 13/15/1995. (107)
- 115 T Chaplin, o Bernard, HB Beverloo, V Saha, A Hagemmeijer, R Berger and BD Young; The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene; *Medical Oncology*, Volume 86, Issue, pp. 2073-2076, 09/15/1995. (108)
- 116 Ryoichi Ono, Tomohiko Taki, takashi Taketani, Masafumi Taniwaki; LCX, Leukemia-associated protein with a CXXC Domain, is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia with Trilineage Dysplasia Having t(10;11)(q22;q23)
- 117 Noriko Yoneda-Kato, Shirou Fukuhara and Jun-ya Kato; Apoptosis induced by the myelodysplastic syndrome associated NPM-MLF1 chimeric protein; *NATURE*, 24 June, 1999, Volume 18, Number 25, pages 3716-3724. (110)
- 118 James H. Williams, Louise N. Daly, Evan Ingley, Jennifer G. Beaumont, HLS7, a hemopoietic lineage switch gene homologous to the leukemia-inducing gene MLF1, *The EMBO journal* vol. 18, pp. 5559-5566, 1999. (11)
- 119 K Ohno, W. Sugano, Y. Nagai, N. Kato, J. Kato, M. Yamaguchi; Involvement of *Drosophila* myelodysplasia/myeloid leukemia factor in apoptotic cell death and

polyglutamine-induced neuronal cell death;

- 120 Buijs A, Sher S, van Baal S, van Bezouw S, van der Plas D, Geurts van Kessel A, translocation t(12;22)(p13;q11) in myeloproliferative disorder results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11; *oncogene*; 1995 Apr 20; 10 (8): 1511-9. (111)
- 121 Arjan Buijs, LUC van Rompaey, Anco C. Molijn, J. Nathan Davis, Alfred C. O.; The MN1-TEL Fusion Protein, Encoded by the Translocation t(12;22)(p13;q11) in myeloid Leucemia, Is a Transcription Factor with transforming Activity; *Molecular and Cellular Biology*, December 2000, p. 9281-9293, Vol. 20, No. 24. (112)
- 122 Ryan P. Million, Jon Aster, D. Gary Gilliland, and Richard A. Van Etten; The Tel-Abl (ETV-Abl) Tyrosine Kinase, product of complex t(9;12) translocation in human leukemia, induces distinct myeloproliferative disease in mice; *Blood*, 15 June 2002, Vol. 99, No. 12; pp 4568-1577. (114)
- 123 Yoshie Kuno, Akihiro Abe, Nobuhiko Emi, Minako Iida, Toshiya Yokozawa; Constitutive Kinase activation of the TEL-Syk fusion gene in myelodysplastic syndrome with t(9;12)(q22;p12), *Blood*, 15 February 2001, Vol. 97, No. 4, pp 1050-1055. (115)
- 124 Ryoichi Ono, Tomohiko Taki, Takashi Taketani, Hiroyuki Kawaguchi; SEPTIN6, a Human Homologue to Mouse Septin6, Is Fused to MLL in Infant Acute Myeloid Leukemia with Complex Chromosomal Abnormalities Involving 11q23 and Xq24; *Cancer Research* 62, 333-337, January 15, 2002.) 116)
- 125 Duggan, D. J. ; Baysal, B. E. ; Gollin, S: M; Cloning a balanced t(9;11)(p24;q23.1) chromosomal translocation breakpoint segregating with bipolar affective disorder in a small pedigree, *American Journal and Human Genetics*; Vol. 55; Issue: Suppl. 3; 44; Oct. 1994. (117)
- 126 Krzysztof Mrózek, Kristiina Heinonen, David Lawrence, Andrew J. Carroll, Adult Patients With De Novo Acute Myeloid Leukemia and t(9;11)(p22;q23) Have a Superior Outcome to Patients With Other Translocations Involving Band 11q23: A Cancer and Leukemia Group B Study; *Blood*, Vol. 90, No. 11 (December 1), 1997: pp. 4532-4538. (117)
- 127 Jeffrey E. Rubnitz, Susana C. Raimondi, Xin Tong, Deo Kumar Srivastava, Favorable Impact of the t(9;11) in Childhood Acute Myeloid Leukemia, *journal of Clinical Oncology*, Vol. 20, Issue 9 (May), 2002: 2302-2309. (118)
- 128 Bi-Ching Sang, Liangru Shi, Peter Dias, Li Liu, Jia Wei, Zhi-Xue Wang, Monoclonal Antibodies Specific to the Acute Lymphoblastic Leukemia t(1;19)-Associated

E2A/pbx1 Chimeric Protein: Characterization and Diagnostic Utility, *Blood*, Vol. 89 No. 8 (April 15), 1997: pp. 2909-2914. (117b)

- 129 Secker- Walker L M , Berger R, Fenaux P, et al, Prognostic significance of the balanced t(1;19) and unbalanced der (19) t(1;19) translocations in acute lymphoblastic leukemia, *Lukemia* 6(5): 363-369, 1992. (118b)
- 130 Uckum F M, Sensel M G, Sather H N, et al, Clinical Significance of translocation t(1;19) in childhood acutelymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children´s Cancer Group, *Journal of Clinical Oncology* 16(2): 527-535, 1998. 8119)
- 131 Joseph L. Wiemels, Brian C. Leonard, Yunxia Wang, Mark R. Segal, Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Medical Sciences*, November 12, 2002, Vol. 99, No. 23, PP. 15101-15106. (120)
- 132 Hidemitsu Kurosawa, Kumiko Goi, Takeshi Inukai, Toshiya Inaba, Two Candidate Downstream target Genes for E2A-HLF, *Blood*, Vol. 93, No. 1 (January 1), 1999: pp. 321-332. (121)
- 133 Takayuki Matsunaga, Toshiya Inaba, Hirotaka Matsui, Mayuko Okuya, Atsushi Miyajima, Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoproteína, *Blood*, 15 April 2004, Vol. 103, No. 8, pp. 3185-3191. (122)
- 134 Asperger syndrome in a boy with a balanced de novo translocation: t(17;19)(p13.3;p11), *American Journal of Medical Genetics*; Vol. 56, Issue 3; PBD: 10 April 1995. (123)
- 135 Arndt Borkhardt, Giovanni Cazzaniga, Susanne Viehmann, Maria Grazia Valsecchi, Incidence and Clinical Relevance of TEL/AML1 Fusion Genes in Children With Acute lymphoblastic Leukemia Enrolled in the German and Italian Multicenter Therapy Trials, *Blood*, Vol. 90 No. 2 (July 15), 1997: pp. 571-577. (123)
- 136 Randy Fenrick, Joseph M. Amann, Bart Lutterbach, Lilin Wang, Jennifer J. Westendorf, Both Tel and AML-1 Contribute Repression Domains to the t(12;21) Fusion Protein, *Mol Cell Biol*. 1999 October; 19 (10): 6566-6574. (124)
- 137 C C Uphoff, R A F MacLeod, S A Denkmann, T R Golub, A Borkhardt, Occurrence of TEL-AML1 fusion resulting from (12;21) translocation in human early B-lineage leukemia cell lines, *Journal*, March 1997, Vol. 11, No. 3, Pages 441-447. (125)
- 138 Iwona Wlodarska, Roberta La Atarza, Mathijs Baens, Judith Dierlamm, Fluorescence In Situ Hybridisation Characterization of New Translocations involving TEL (ETV6) in a wide Spectrum of Hematologic Malignancies, *Blood*, Vol. 91, No. 4 (February

15), 1998.pp. 1399-1406. (126)

- 139 Jane F. Apperley, M. D. Martine Gardembas, M. D. Junia V. Melo, M. D. Robin Russell Jones, Response To Imatinib Mesylate in Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases with Rearrangements of the platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta, *NEJM*, Vol. 347, No. 7, August 15, 2002, pp. 481-487. (127)
- 140 V. Pitini, C. Arrigo, D. Teti, G. Barresi, M. Righi, G. Alo, Response to STI571 in Chronic Myelomonocytic Leukemia with Platelet derived Growth Factor Beta Receptor Involvement : A New report, *Haematologica* 2003, 88 : (05) ECR18. (128)
- 141 Jan Cools, Nocolle Mentens, Maria D. Odero, Pieter Peeters, Iwona Wlodarska, Evidence for position effects as a variant ETV6-mediated leukemogenic mechanism in myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13) or t(5;12)(q31;p13), *Blood*, March 2002, Vol. 99, No. 5, pp. 1776-1784. (129)
- 142 Galieque Zouitina S, Quief S, Hildebrand MP, Denis C, Lecocq G, Collyn-d'Hooghe M, The B cell transcriptional coactivator BOB1/OBF1 gene fuses to the Laz3/BCL6 gene by t(3;11)(q27;q23.1) chromosomal translocation in a B cell leukemia line (Karpas 231), *Leukemia*, 1996 Apr; 10 (4), 579-87. (130)
- 143 Edith Coonen, Elena martini, John C. M. Dumoulin, Preimplantation genetic diagnosis of a reciprocal translocation t(3;11)(q27;q24.3) in siblings, *Molecular Human Reproduction* , Vol. 6, No. 3, 199-206, March 2000. (131)
- 144 K Yamamoto, H Hamaguchi, K Nagata, M kobayashi, F tanimoto, Establishment of a novel human acute myeloblastic leukemia cell line (YNH) with t(16;21), t(1;16) and 12q13 tranlocation , April 1997, Vol. 11, No. 4, Pages 599-608. (132)
- 145 Qi Chen, Cary Ying-Chuan Yang, Julia Tsou Tsan, Ying Xia, Abdelsalam H. Ragab, Coding Sequences of the tal-1 Gene Are Disrupted by Chromosome translocation in Human T Cell leukemia, *The Journal Experimental Medicine*, Vol. 172, November 1990 1403-1408. (134)
- 146 RO Bash, WM Crist, JJ Shuster, MP Link, M Amylon, J Pullen, AJ Carroll, Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: a pediatric Oncology Group study, *Vol.81, Issue8*, pp. 2110-2117, 04/15/1993. (135)
- 147 Janssen JW, Ludwig WD, Sterry W, bartram CR, SIL-TAL deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 1993 Aug; 7(8). 1204-10. (136)
- 148 Eric Delabesse, Muriel Bernard, Valérie Meyer, linda Smit, Karen Pulford, TAL1 expression does not occur in the majority of T-ALL blast, *British Journal of*

Haematology, Vol. 102 Issue 2 page 449-457, July 1998. (137)

- 149 Gould KA, Bresnick EH, Sequence determinants of DNA binding by the hematopoietic helix-loop-helix transcription factor TAL1: importance of sequences flanking the E-box core, *Gene Experimental*, 1998; 7(2):87-101. (138)
- 150 Mahadeo Sukhai and Micheline piquette-Miller, Regulation of the Multidrug Resistance Genes By Stress Signals, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 3 (2) ; 268-280;200. (135)
- 151 Assam El-Osta, Phillip Kantharidis, John R. Zalcborg, and Alan P. Wolffe, Precipitous Release of Methyl-CpG Binding Protein 2 and Histone Deacetylase 1 from the Methylated Human multidrug resistance Gene (MDR1) on Activation, *Molecular and Cellular Biology*, March 2002, p. 1844-1857, Vol. 22, No. 6. (136)
- 152 Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, *Inmunologia celular y molecular*, Cuarta edición, McGRAW-HILL-INTERAMERICANA, paginas 523-538.
- 153 Renate Thalhemmer-Scherrer, MD, Gerlinde Mitterbauer, MD, Ingrid Simonitsch, The Immunophenotype of 325 Adult Acute Leukemias, *Am J Clin Pathol* 117(3):380-389,2002. American Society of clinical pathologists, Inc.
- 154 Joan Lluís Vives Corrons, *Manuel de Técnicas de Laboratorio en Hematología*, Edit. MASSON, Edic.3er, Paginas