



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Detección de alteraciones cromosómicas
mediante Citogenética clásica y molecular en
pacientes con enfermedades hematológicas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

LUCÍA RODRÍGUEZ GÓMEZ

ASESORA:

Dra. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ

COASESORA:

Dra. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDEERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

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

Detección de alteraciones cromosómicas mediante Citogenética clásica y molecular en pacientes con enfermedades hematológicas.

Que presenta la pasante: **Lucía Rodríguez Gómez**

Con número de cuenta: **310226424** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Abril de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	M.E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología y Genética molecular del Hospital Juárez de México, bajo la asesoría de la Dra. Mónica Sierra Martínez.

Agradecimientos

A la Dra. Mónica Sierra Martínez por abrirme las puertas de su laboratorio, aceptarme como tesista, y por todas las enseñanzas y tiempo dedicado. No cabe duda que es una excelente maestra, siempre dispuesta a mejorar y compartir sus conocimientos con los alumnos.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por aceptar ser mi asesora, por preocuparse para que continuara con mi tramite, brindarme su apoyo y grandes enseñanzas en clase.

A mis sinodales Dra. Maritere Domínguez Rojas, M. en C. María Liasbeth Hernández Calderón y M.E. Rosa María de los Ángeles López Cabrera, que aceptaron revisar mi trabajo, además de que gracias a ustedes me enamore de la genética

A la coordinadora Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez por siempre estar dispuesta a ayudar a los alumnos y aceptar ser mi sinodal.

A todos los grandes profesores que me compartieron sus conocimientos.

Y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme concluir mis estudios profesionales y ser mi segundo hogar.

Dedicatorias

A Dios por darme la fuerza de seguir adelante.

A mis padres y hermana por ser las personas que han estado conmigo en los mejores y peores momentos. Porque me animaron a seguir adelante cuando más decaída estuve, me ofrecieron palabras de aliento, me brindaron su apoyo incondicionalmente, porque gracias a su ejemplo quiero ser una buena persona y quiero que sepan que siempre los voy a querer con todo mi corazón. ¡GRACIAS!

A mi papá Gerardo Rodríguez Díaz porque desde pequeña me diste todo tu amor y me guiaste con tu ejemplo de ser honesto y siempre hacer lo correcto, porque trabajaste muy duro a pesar del cansancio para brindarnos una buena educación. Eres el mejor papá que Dios me dio. Te amo papi

A mi mamá María Guadalupe Gómez Martínez porque no hay día que me haya faltado un abrazo tuyo, porque me has cuidado, por nuestras pláticas de horas, por enseñarme a ser una mujer fuerte, ayudarme cuando he estado a punto de rendirme y estar en cada momento de mi vida. Te amo, eres la mejor mamá del mundo.

A mi hermana Angelica Rodríguez Gómez porque me consientes como nadie, por cada risa, peleas y cosas que hemos pasado juntas, porque sin ti mi vida no sería la misma, aunque no lo creas eres una luz que ilumina mis días, y siempre hare lo que sea por verte feliz. Te amo infinitamente mi niña.

A mi tío Román Gómez † porque desde pequeña me enseñó a ser PUMA, por los consejos que me dio cuando fui creciendo y por el cariño que me dio.

A mis amigos de la carrera Andy, Elena, Luis Ángel y Jorge por compartir risas, llanto, frustración, conocimientos, pero sobre todo las ganas por salir adelante. Sin su amistad no habría sido lo mismo.

“No pertenecemos a nadie sino al punto luminoso de esta lampara desconocida por nosotros, inaccesible a nosotros que mantiene despierta la valentía y el silencio”.

René Char

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Marco teórico.....	2
1. Generalidades de la Leucemia.....	2
2. Clasificación OMS, FAB: Linfoide y Mieloides	7
3. Epidemiología y factores de riesgo	10
4. Manifestaciones clínicas	15
5. Tratamiento.....	17
6. Métodos de Dx.....	20
7. Citogenética	23
7.1 Citogenética clásica	24
7.2 Citogenética molecular	25
8. Alteraciones numéricas.....	30
9. Alteraciones estructurales.....	30
10.- Alteraciones citogenéticas en leucemias	33
11. Generalidades del Síndrome mielodisplásico	36
11.1 Clasificación.....	37
11.2 Signos y síntomas.....	39
11.3 Dx	39
11.4 Alteraciones citogenéticas en SMD	39
III. Planteamiento del problema.....	40
IV. Objetivo General y particulares	41
V. Metodología.....	42
5.1 Cariotipo	42
5.2 FISH.....	47
VI. Resultados y discusión	51
VII. Conclusiones	90
VIII. Referencias.....	91
IX. Anexos.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de la hematopoyesis.....	3
Figura 2. Puntos de ruptura y translocación de BCR-ABL.	6
Figura 3. Translocación recíproca entre cromosomas 9 y 22.	12
Figura 4. Clasificación de los cromosomas por la posición del centrómero.	29
Figura 5. Alteraciones cromosómicas estructurales.	33
Figura 6. Sondas LSI para translocación BCR/ABL.	48
Figura 7. FISH t(9;22)(q34;q11)	49
Figura 8. Sondas LSI para translocación PML/RARA.	50
Figura 9. FISH t(15;17).....	50
Figura 10. Metafases obtenidas durante la experimentación.	54
Figura 11. Bando G.	55
Figura 12. Cariotipo parcial de t(9;22)(q34;q11.2).	58
Figura 13. Cariotipo parcial de inv(9)(p12q13).	59
Figura 14. Cariotipo de paciente con ACA. 46XY,t(1;5)(q42;q24),t(9;22)(q34;q11.2),-18,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2).	62
Figura 15. Cariotipo de paciente con ACA. 46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+16,i(17)(q10),-21.	63
Figura 16. Cariotipo de paciente con ACA. 47,XY,t(9;22)(q34;q11.2),- 18,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)x2.	65
Figura 17. Cariotipo parcial de paciente con LGC mostrando trisomía 8.	66
Figura 18. FISH interfásico de paciente con LMC. (BCR/ABL).	68
Figura 19. FISH interfásico de paciente con LMC. (BCR/ABL).	71
Figura 20. Cariotipo parcial de t(8;21)(q22;q22).	74
Figura 21. Cariotipo parcial de t(15;17)(q24;q21).	75
Figura 22. FISH interfásico de paciente con LMA (PML/RARA).....	75
Figura 23. Cariotipo parcial mostrando del(3)(q24).	79
Figura 24. Cariotipo parcial mostrando del(7)(q31q36).	81
Figura 25. Cariotipo parcial mostrando del(11)(q13q23).	82
Figura 26. Cariotipo parcial mostrando +der(15)t(1;15)(q10;q25).	86

Figura 27. Cariotipo parcial de $t(1;19)(q23;p12)$	87
Figura 28. FISH interfásico de paciente con LLA.(BCR/ABL).....	89

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de la Asociación Franco- Américo- Británica (FAB) de LMA.	8
Cuadro 2. Clasificación de la Organización mundial de la Salud (OMS) de LMA. .	8
Cuadro 3. Clasificación inmunológica de LLA..	9
Cuadro 4. Clasificación citomorfológica de LLA de acuerdo a la Asociación Franco Americano Británico (FAB)..	9
Cuadro 5. Reactivos utilizados en la cosecha de cromosomas.....	24
Cuadro 6. Tipos de bandeado cromosómico.....	25
Cuadro 7. Translocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA.	34
Cuadro 8. Clasificación de la OMS de los síndromes mielodisplásicos del 2016: seis subtipos principales.....	38
Cuadro 9. Tiempos de incubación de la muestra dependiendo del tipo de leucemia o SMD.	43
Cuadro 10. Tiempo de reactivos en bandeado G.	45
Cuadro 11. Número de casos por edad y género de pacientes con resultado para LGC, LMA, LLA y SMD.	56
Cuadro 12. Alteraciones obtenidas en pacientes con LGC mediante cariotipo, FISH o PCR.....	57
Cuadro 13. Alteraciones obtenidas en pacientes con LCG mediante FISH.	69
Cuadro 14. Clonas obtenidas del paciente 45/18 mediante FISH.....	70
Cuadro 15. Alteraciones obtenidas en pacientes con LMA mediante, cariotipo, FISH y PCR.....	73
Cuadro 16. Inmunofenotipo en alteraciones genéticas de LMA.	76
Cuadro 17. Alteraciones obtenidas mediante cariotipo en pacientes con MDS mediante cariotipo.	77
Cuadro 18. Pronóstico de alteraciones citogenéticas en MDS de novo	79
Cuadro 19. Alteraciones obtenidas en pacientes con LLA mediante, cariotipo, FISH y PCR.....	84

Abreviaturas o acrónimos

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
ACA	Alteraciones cromosómicas adicionales
add	Material adicional de origen desconocido
APL	Leucemia Promielocítica Aguda
BH	Biometría hemática
CFU-GEMM	Unidad Formadora de Colonias-Granulocito, Eritrocito, Monocito, Megacariocito
CGH	Célula Germinativa Hematopoyética
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
del	Delección
der	Cromosoma derivativo
dic	Cromosoma dicéntrico
dup	Duplicación
FAB	Sistema de Clasificación Franco Americana Británico
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ
h	Heterocromatina
i	isocromosoma
idem	Denotes the stemline karyotype in a subclone
inv	Inversión
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ish	In situ hibridization
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crónica

LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LOX	Pérdida del cromosoma X
LOY	Pérdida del cromosoma Y
mar	Cromosoma marcador
MO	Medula ósea
MPD	Trastorno mieloproliferativo
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
nuc	Nuclear or interphase
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Brazo corto del cromosoma
Ph	Cromosoma Filadelfia
q	Brazo largo del cromosoma
r	Cromosoma en anillo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RPM	Rotaciones por minuto
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SCL	Loss of sex chromosomes
SP	Sangre periférica
t	Translocación

I. Introducción

La leucemia es una enfermedad hematológica que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células provenientes de una clona maligna ya sea de origen mieloide o linfóide que se acumulan en sangre periférica, médula ósea y otros órganos. Los factores de riesgo más comunes son la exposición a benceno, a radiaciones ionizantes, agentes químicos, inhibidores de topoisomerasa u otras enfermedades como síndrome de Down, anemia de Fanconi. Dependiendo del tipo de leucemia esta puede ser más frecuente en adultos o niños, por ejemplo, la LMA es frecuente en adultos con un 80% mientras que en niños es del 15-20% de los casos, la LMC aparece entre los 45 y 55 años y su incidencia aumenta con la edad, la LLA es más común en la niñez y la LLC aparece a partir de los 40 años aumentando la incidencia con la edad. Las leucemias se pueden diagnosticar con ayuda de un aspirado de médula ósea, al cual se le puede hacer el conteo leucocitario, frotis sanguíneo para ver la morfología celular, inmunofenotipo, pero es de gran importancia hacer también el estudio citogenético ya que gracias a este podemos ver las alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales que pueden estar presentes, cabe mencionar que algunas son de mejor pronóstico que otras, en la actualidad existen blancos terapéuticos para ciertos tipos de mutaciones, por lo que el saber con exactitud el tipo de alteración ayuda a brindar al paciente un tratamiento específico.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de cariotipo con el fin de detectar las alteraciones cromosómicas de los pacientes diagnosticados con enfermedades hematológicas, pero también se les realizaron técnicas de citogenética molecular como FISH y PCR para detectar dichas alteraciones, así como correlacionar los resultados con los datos de la literatura.

II. Marco teórico

1. Generalidades de la Leucemia

La sangre de los mamíferos, entre ellos el ser humano, contiene diferentes tipos de células que resultan esenciales para garantizar la supervivencia en un medio adverso (Gómez A., y Jaime P., 2012).

La hematopoyesis es un proceso enérgico de producción y maduración de las células de la sangre que ocurre sobre todo en la médula ósea. El proceso comienza con la célula madre pluripotencial, la cual es capaz de proliferar, replicarse y diferenciarse. En respuesta a citocinas (factores de crecimiento), la célula madre pluripotencial se diferenciará en una célula madre mieloide o linfoide. La célula madre linfoide se diferencia en una célula madre preB o preT programada. La célula madre mieloide produce una célula madre intermedia, CFU-GEMM (unidad formadora de colonias-granulocito, eritrocito, monocito, megacariocito), que en respuesta a citocinas específicas se diferencia en el linaje eritroide, megacariocítico, mieloide, monocítico, eosinófilo o basófilo (Carr J., y Rodak F., 2010). (Figura 1).

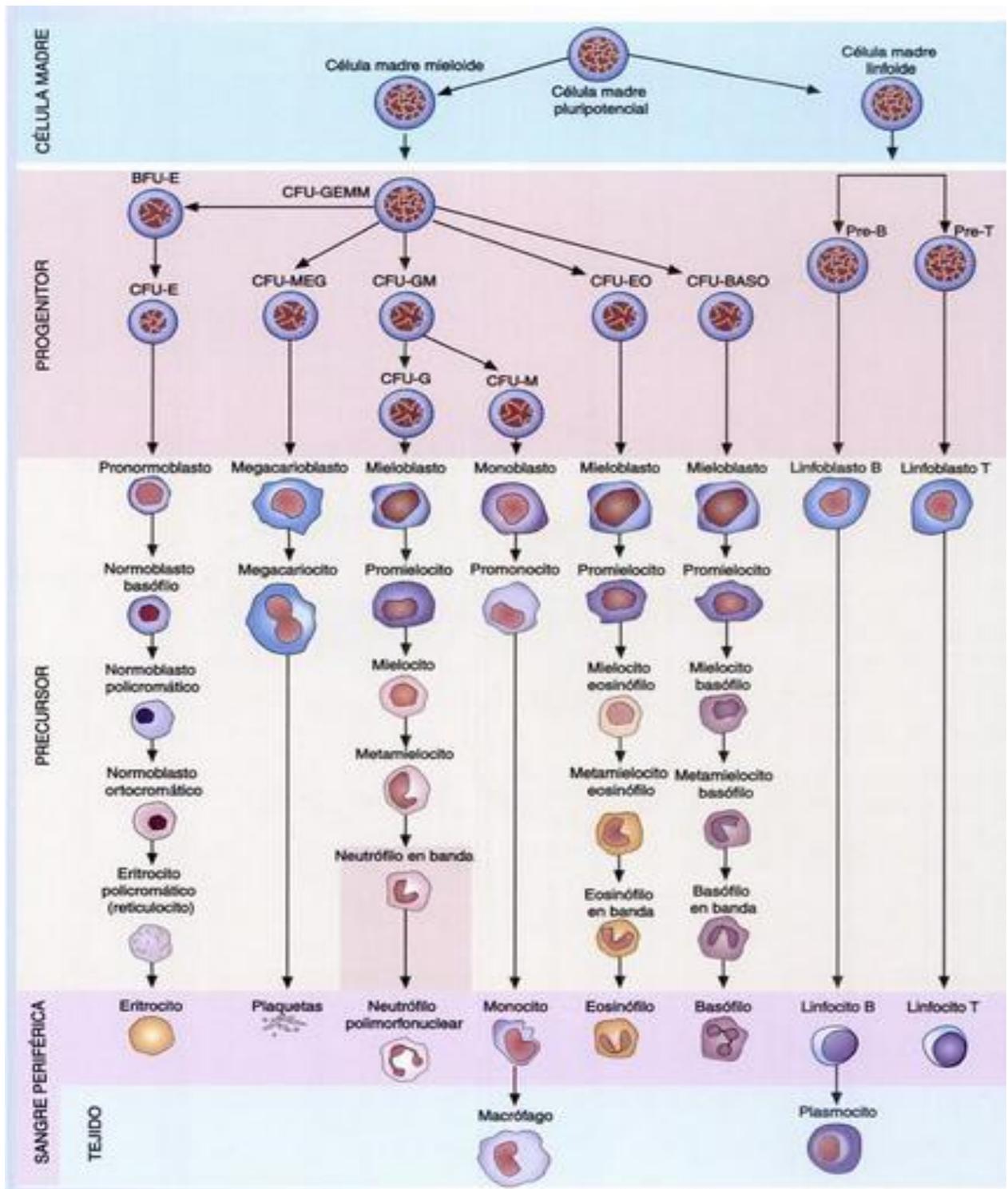


Figura 1. Representación gráfica de la hematopoyesis. Tomado de Carr J; y Rodak F., 2010.

La carcinogénesis es un progreso gradual desde el tejido normal hacia un estado preneoplásico asintomático y, eventualmente, una malignidad clínicamente manifiesta. La adquisición en serie de alteraciones genéticas como las variaciones en el número de copias, los reordenamientos cromosómicos y las mutaciones genéticas, así como los cambios epigenéticos tempranos, conducen la evolución de las células somáticas a los clones neoplásicos que alcanzan los rasgos distintivos conocidos del cáncer, incluida la proliferación celular alterada, la diferenciación bloqueada, la apoptosis y las estrategias de escape de la inmunidad (Hartmann, L. y Metzeler 2019).

Los tumores de origen hematopoyético se asocian a menudo con mutaciones que bloquean la maduración de la célula progenitora o que anulan su dependencia de los factores de crecimiento. El proceso de transformación leucémica o leucemogénesis es un proceso complejo en múltiples pasos, resultante de la acumulación de mutaciones que modifican en algún punto su sistema de señalización celular (receptor, segundo mensajero, proteína efectora o factor de transcripción). El efecto neto de estas perturbaciones es una expansión clonal no regulada y alteraciones de los procesos de muerte celular y diferenciación, de tal manera que la célula germinativa hematopoyética (CGH) se transforma en lo que se ha denominado como célula madre leucémica (Lagunas R., 2016).

La leucemia se caracteriza por tener una proliferación clonal, autónoma y anormal de las células que dan origen al resto de las células normales de la sangre (comportamiento tumoral en general). Lo anterior implica que una célula temprana sufre un cambio genético que hará que se produzca sin control una clona (colonia) anormal de sí misma. Esta producción anormal es desordenada porque las células anormales se multiplican en imagen y semejanza de ellas mismas, por lo que ocupan paulatinamente el espacio de la médula ósea normal y provocan anemia progresiva, sangrado anormal y predisposición a las infecciones (Hurtado M., Solano E., *et al.* 2012).

Leucemia Mieloide Aguda

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) se ha reportado como la leucemia aguda más común en adultos, es una neoplasia caracterizada por proliferación anormal de células mieloides de origen clonal que infiltran la médula ósea, la sangre periférica y otros tejidos. La acumulación de estas células que se encuentran en distintos estados de maduración incompleta debido a fallas en la diferenciación desplaza a los elementos hematopoyéticos sanos, lo que causa insuficiencia medular e infiltración extramedular en el bazo, el hígado, la piel, las encías y el sistema nervioso central (Cruz F., 2018).

Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por la presencia de la translocación t(9;22)(q34;q11) o el cromosoma Filadelfia (Ph+), que codifica una proteína con actividad de tirosina quinasa anormal que causa una actividad celular no controlada, división e inhibición de la apoptosis, resultando en leucemogénesis (Morales K., Bournon C; *et al* 2019).

El cromosoma Ph es un cromosoma 22 acortado, que resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. Dicho rearrreglo involucra la adición del segmento 3' del gen ABL (ubicado en la región del cromosoma 9q34) a segmentos 5' del gen BCR (ubicado en la región del cromosoma 22q11), creando un gen híbrido BCR-ABL que es transcrito a un ARN mensajero quimérico BCR-ABL.

El punto de ruptura del gen ABL puede ocurrir en cualquier sitio a lo largo de un área de 300 kb en su extremo 5'. En contraste el gen BCR puede romperse en tres diferentes regiones: el primer sitio se ubica en un área de 5.8 kb entre los exones 12 y 16, referido como región de ruptura mayor (M-bcr), la cual codifica a una proteína de 210 kDa (p210Bcr-Abl), característica de los pacientes con LMC y de una tercera parte de los pacientes con LLA. El segundo sitio de ruptura se ubica en el exón 2 en un área de 54.4 kb conocida como región de ruptura menor (m-bcr) y codifica a una proteína de 190 kDa (p190 Bcr-Abl), presente en pacientes con LLA.

Finalmente, el sitio de ruptura conocido como μ -bcr se ubica en el exón 19 de Bcr y codifica a una proteína de 230 kDa (p230Bcr-Abl), característica de leucemia neutrofílica crónica. (Figura 2).

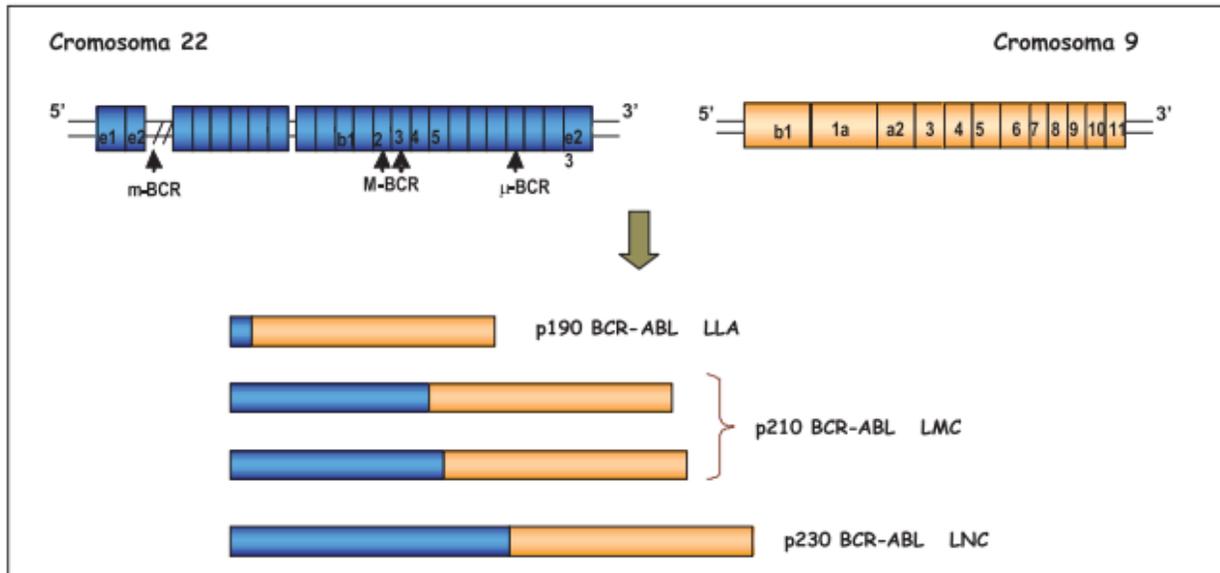


Figura 2. Puntos de ruptura y translocación de BCR-ABL. Se observa la estructura de los genes BCR y ABL, indicando con flechas los sitios de ruptura del gen BCR. En la parte inferior se indican las proteínas producto de cada sitio de ruptura y translocación: m-BCR generando p190 (característico de LLA), M-BCR generando p210 (característico de LMC) y μ -BCR generando p230 (característico de LNC). Tomado Chavez G., Anaya S., et al 2009.

Leucemia Linfóide Aguda

La Leucemia Linfóide Aguda (LLA), es un trastorno maligno que se origina en una célula hematopoyética única progenitora de linfocitos B o T y se caracteriza por una pérdida de diferenciación de progenitores linfoides produciendo un aumento en células linfoblásticas inmaduras (Melo A., y Artiagas A., 2013).

Leucemia Linfóide Crónica

La leucemia linfóide crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico que se manifiesta por la acumulación progresiva en sangre periférica, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y otros tejidos, de linfocitos morfológicamente maduros,

pero con características inmunológicas y moleculares diferentes a las de los linfocitos normales (Hernández R., 2003).

2. Clasificación OMS, FAB: Linfoide y Mieloides

En los últimos 50 años se propusieron muchas clasificaciones de leucemias y linfomas. El Sistema Franco Americano Británico (FAB) proporcionó un sistema paralelo, aunque distinto para la clasificación de leucemias linfoides y mieloides y la mielodisplasia basado en la tinción de sus especímenes.

La introducción de técnicas inmunofenotípicas y de biología molecular demostraron que las categorías individuales eran, de hecho, heterogéneas. Los estudios citogenéticos revelan la importancia de las translocaciones cromosómicas con desregulación de genes individuales en la patogénesis y el comportamiento clínico de varios tipos de leucemias y linfomas. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las afecciones hematológicas malignas tiene un enfoque de subclasificación de la leucemia mieloide aguda (LMA), reconoce la importancia central de las anomalías citogenéticas y la distinción entre la LMA de Novo y la LMA con mielodisplasia asociada (Fritz A., Percy C., et al 2003).

Leucemia Mieloide Aguda

Los dos sistemas más utilizados para la clasificación de subtipos de la LMA son el sistema de la OMS y la clasificación de la FAB. La clasificación FAB fue creada en 1976, se fundamenta en diferenciar entre ocho subtipos de leucemia mieloide aguda de acuerdo con las características morfológicas del tipo de células de las que se ha generado la leucemia y la madurez de las mismas. Esta determinación se realiza mediante la observación morfológica de las células al microscopio luego de una tinción rutinaria (Cuadro 1). En la cuarta edición de la OMS se incorporan diversos elementos a la biología de la LMA como información genética, morfológica, citometría de flujo y características clínicas, definiendo seis grupos principales (Cuadro 2) (Cruz F., 2018).

Cuadro 1. Clasificación de la Asociación Franco- Américo- Británica (FAB) de LMA. Tomado y modificado de Cruz F., 2018.

	Subtipo
M0	Leucemia mieloide aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloide aguda con maduración mínima
M2	Leucemia mieloide aguda con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4eos	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Cuadro 2. Clasificación de la Organización mundial de la Salud (OMS) de LMA. Tomado y modificado de Lagunas R., 2016.

Leucemia mieloide aguda con anormalidades genéticas recurrentes
Leucemia mieloide aguda con t(8:21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
Leucemia mieloide aguda con inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
Leucemia Promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q22); PML-RARA
Leucemia mieloide aguda con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
Leucemia mieloide aguda con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
Leucemia mieloide aguda con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
Leucemia mieloide aguda (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones en NPM1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones en CEBPA
Leucemia mieloide aguda relacionada con cambios mielodisplásicos

Leucemia Linfocítica Aguda

Por su morfología, la LLA se clasifica según la FAB, en tres subtipos (Cuadro 3 y 4):

- 1) LLA típica o LLA-L1: en 75% de los casos con células B.
- 2) LLA atípica o LLA-L2: en 20%, y puede estar representada por células T.
- 3) LLA parecida al linfoma de Burkitt o LLA-L3: con células B en 95% y células similares al linfoma de Burkitt (Ortega S., Osaya O., *et al* 2007).

Cuadro 3. Clasificación inmunológica de LLA. Tomado y modificado de Coronel M., 2005.

Tipo celular		Antígeno de expresión
Linaje B	Pre-B temprana	CD22+ o CD79a+ Citoplasmático
	Pre-B	CD19+, CD22+, cIG μ -, sIG-
	Pre-B transicional	cIG μ +, sIG κ -, sIG λ -
	Celulas B	cIG+, sIG κ +, sIG λ +
Linaje T	Pro T	Citoplasmático CD3+
	Pre-T	CD7+
	Cortical-T	CD7+, CD2+, y/o CD5+
	Madura-T	CD1a+
		CD3+

Abreviaturas y simbolos: cIG, inmunoglobulina citoplasmática; sIG, Inmunoglobulina de superficie; μ , proteína de cadena pesada mu; κ , Proteína de cadena ligera kappa; λ , proteína de cadena ligera lambda.

Cuadro 4. Clasificación citomorfológica de LLA de acuerdo a la Asociación Franco Americano Británico (FAB). Tomado y modificado de Coronel M., 2005.

Rasgos citológicos	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande heterogeneo	Grande homogeneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable heterogénea	Finamente homogénea
Forma nuclear	Regular	Irregular	Regular redondo u oval
Nucleólos	Invisibles o pequeños	Visibles grandes uno o más	Prominentes uno o más
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable	Moderada
Basofilia del citoplasma	Claro poco intenso	Variable, algunos intensos	Muy intenso
Vacuolización del citoplasma	Variable	Variable	Prominente

Leucemia Linfocítica Crónica

En fechas recientes, la clasificación de las neoplasias hematopoyéticas de la Organización Mundial de la Salud siempre la menciona como una enfermedad neoplásica de las células B, mientras que la entidad antes descrita LLC de linfocitos T ahora es llamada leucemia prolinfocítica de células T. A partir del año 2001 la OMS incluyó a la LLC y al linfoma linfocítico de células pequeñas (LLP) en una sola entidad en función de que éstas son indistinguibles una de otra en su morfología, fenotipo, genotipo e histopatología. La LLC afecta principalmente a la sangre periférica, mientras que el LLP a los ganglios linfáticos (Arias S., y Valero G., 2013).

3. Epidemiología y factores de riesgo

Leucemia Mieloide Aguda

Las LMA han sido reportadas por varios autores como más frecuentes en pacientes de sexo masculino, con una razón hombre:mujer entre 1.3:1 (Mejia A., Núñez E., *et al* 2016)

La LMA representa del 15 al 20% de las leucemias agudas en niños y el 80% en adultos. La LMA es la forma predominante de leucemia en el periodo neonatal y adulto, pero representa una pequeña proporción de casos durante la infancia y la adolescencia.

Esta leucemia surge como resultado de la transformación de precursores hematopoyéticos a través de la adquisición de rearrreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas que bloquean la diferenciación celular y confieren ventajas proliferativas y de supervivencia (Lagunas R., 2016).

La base de la leucemogénesis subyace en el daño genético no letal, y en el caso de LMA existen una gran variedad de factores que contribuyen a su desarrollo; sin embargo, los más importantes son la exposición a radiaciones ionizantes, altas concentraciones de benceno, agentes quimioterapéuticos e inhalación crónica de humo de cigarro. Estos agentes exógenos tienen la capacidad de producir daños en el ADN por diferentes mecanismos, pero principalmente mediante daño oxidativo.

Por otro lado, la LMA puede desarrollarse como progresión de otro trastorno clonal de las CGH, resultado de la inestabilidad genómica y la adquisición de mutaciones adicionales. Los principales ejemplos subyacen en las neoplasias mieloproliferativas (NMP), en las cuales aumenta la producción de uno o más tipos de células sanguíneas, y los síndromes mielodisplásicos (SMD), que se destacan por presentar defectos en la maduración que se asocian a una hematopoyesis ineficaz. Los SMD muestran defectos en factores de transcripción claves para la diferenciación hematopoyética normal y en moduladores de la apoptosis, que asemejan mutaciones de clase II. De esta manera, ambas patologías presentan un primer *hit*, lo que las hace susceptibles de desarrollar LMA si son sometidas a una segunda mutación (Lagunas R., 2016).

Los trastornos genéticos, tales como la anemia de Fanconi, el síndrome de Shwachman, el síndrome de Diamond-Blackfan y el síndrome de Down, se asocian con un aumento del riesgo de presentar AML. La AML puede presentarse como resultado de la progresión de otros tipos de cáncer, por ejemplo, la policitemia vera, la mielofibrosis primaria, la trombocitemia esencial y los síndromes mielodisplásicos (Karp J., 2011).

Leucemia Mieloide Crónica

La LMC es responsable del 15 % de los casos de leucemia en el mundo. Aparece con mayor frecuencia en la población masculina y en las edades comprendidas entre 45 y 55 años, aunque se ha demostrado que la incidencia aumenta con la edad.

El cromosoma Philadelphia (Ph), marcador citogenético de esta enfermedad. (Figura 3). El gen híbrido BCR-ABL, resultado de esta translocación, tiene una función primordial en la patogenia de la enfermedad pues la proteína que codifica, una verdadera oncoproteína, es condición necesaria para que se desarrolle esta neoplasia.

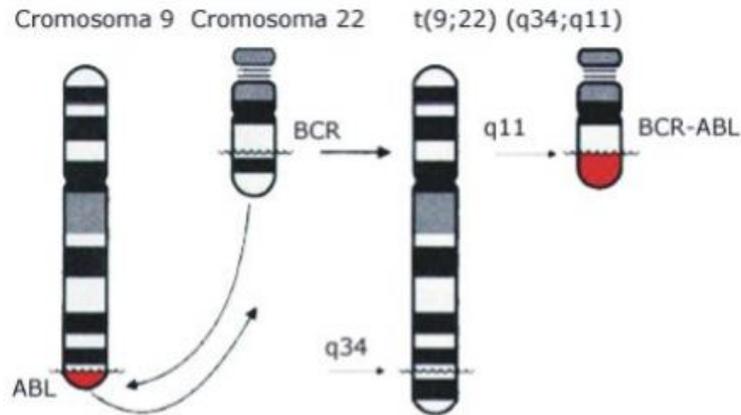


Figura 3. Translocación recíproca entre cromosomas 9 y 22. Tomada y modificada de Quesada D., y Bello A., 2011.

El cromosoma Ph está presente en 95 % de los pacientes desde el comienzo de la enfermedad y se mantiene en las fases más avanzadas (Quesada D., y Bello A., 2011).

El agente etiológico que más claramente se ha relacionado con el desarrollo de la LMC es la exposición a radiaciones ionizantes. También se ha asociado a la administración de radioterapia para el tratamiento de la espondilitis anquilosante y el cáncer de cuello uterino. Los leucemógenos químicos, como el benceno y agentes alquilantes, no se han identificado como agente causante de LMC, con excepción de los agentes inhibidores de la topoisomerasa II del ADN, que tienen propensión a inducir leucemia con t (9;22). No existe asociación hereditaria, familiar, geográfica, étnica o económica a la aparición de la LMC (Ávila C., y González P., 2014).

Leucemia Linfocítica Aguda

La leucemia es el cáncer más común en la niñez y se presenta como una proliferación clonal en las células hematopoyéticas transformadas por un cambio genético (Venegas P., Rivera J. 2004).

Su incidencia en México es 5 casos por 100.000 habitantes (Ramos C., Rozen E., et al 2011).

El pico de incidencia máximo se establece entre los dos y los cinco años de edad. En cuanto al sexo, la LLA predomina ligeramente en los varones, sobre todo en la edad puberal. Las diferencias geográficas son notables en esta enfermedad: mientras que, en los países menos desarrollados, como Norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las LLA de estirpe T, en los países industrializados, la LLA de estirpe B es con diferencia la más frecuente de las hemopatías malignas. Este hecho se ha relacionado con la mayor facilidad para la exposición a determinados agentes medioambientales “leucemógenos” en los países industrializados.

Los factores genéticos tienen un papel cada vez más importante en la etiología de las leucemias agudas. Esta afirmación está basada en: 1) existe una estrecha asociación de las LLA y algunas traslocaciones cromosómicas; 2) la frecuencia de leucemia aguda es mayor en los familiares de pacientes con LA y 3) determinadas enfermedades genéticas cursan con mayor incidencia de LA (síndrome de Down, Klinefelter, neurofibromatosis, Schwachman, Bloom, Fanconi, etc.).

Entre los factores medioambientales que pueden facilitar el desarrollo de leucemia, destaca la exposición a las radiaciones ionizantes. Se ha dado mucha importancia al papel de los virus en el estudio de la etiología de las leucemias. Esto es debido a que la mayoría de las LLA se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales. Hasta el momento, el virus de Epstein-Barr, en la LLA-L3, y los HTLV I y II, en algunos casos de leucemias del adulto, han sido los únicos con una clara asociación (Lassaletta A., 2016)

Leucemia Linfocítica Crónica

Su aparición es excepcional antes de los 40 años y su frecuencia aumenta exponencialmente con la edad, de tal manera que la media de presentación es a los 65 años. Su frecuencia es mayor en hombres que en mujeres con una relación de 2:1.

Los diferentes comportamientos fisiológicos, clínicos y fenotípicos encontrados en los pacientes con LLC pudieran ser consecuencia de anomalías genéticas, como reordenamientos aberrantes de genes para inmunoglobulinas (IgS), así como sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en las células transformadas.

En el 90% de los casos son los linfocitos B, las células responsables de producir esta enfermedad, mientras que el 10% restante tiene su origen en los linfocitos T.

De todos los procesos proliferativos de células T esta entidad constituye únicamente el 15% de los mismos y se ha relacionado con la exposición al human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) el cual es endémico en el suroeste de Japón, África central y el Caribe.

Este tipo de cáncer no ha sido posible relacionarlo en su patogénesis con algún tipo de factor ambiental; no así con los factores hereditarios ya que es frecuente encontrar varios casos de esta enfermedad en una sola familia.

Por otro lado, también se han identificado anomalías genéticas que tienen importancia clínica y pronóstica (Arias S., y Valero G., 2013).

La leucemia linfocítica crónica B es la leucemia que afecta con más frecuencia a los adultos occidentales; su principal característica es la acumulación de linfocitos B monoclonales que expresan CD5, CD19, CD20 y CD23, mismos que crecen sin control en la médula ósea desplazando a las células sanguíneas normales y frecuentemente infiltran a los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado. La causa de la leucemia linfocítica crónica B sigue siendo desconocida; sin embargo, diferentes condiciones se han identificado como factores de riesgo de padecerla, entre ellas el antecedente familiar de cáncer y neoplasias hematológicas, de inmunodeficiencias, la edad avanzada y algunas alteraciones cromosómicas específicas (Valdespino G., y Valdespino C., 2015).

4. Manifestaciones clínicas

Leucemia Mieloide Aguda

La LMA requiere entre uno y tres meses para ser diagnosticada a partir de los síntomas iniciales, mismos que son consecuencia directa de la sustitución de los elementos normales de las líneas celulares de la médula ósea; en el caso de la serie roja, como consecuencia de la anemia, habrá palidez, cansancio, debilidad, disnea de esfuerzo; en la serie blanca, infecciones frecuentes y fiebre; en la serie plaquetaria habrá hemorragias mucocutáneas; en las infiltraciones sobreviene crecimiento visceral e infiltración a la piel (Cruz F., 2018).

Leucemia Mieloide Crónica

Los síntomas típicos de la enfermedad son astenia, anorexia, pérdida de peso y esplenomegalia (que se presenta en alrededor de 50% de los pacientes). Sin embargo, cerca de 40% de los pacientes son asintomáticos y su diagnóstico se basa únicamente en una cuenta anormal de células sanguíneas en la que se presenta hiperleucocitosis (Chavez G., Anaya S., *et al* 2009).

Dentro de la evolución de la LMC se presentan tres estadios característicos:

- Una fase crónica que tiene una duración variable, con una media entre cuatro y seis años y que se caracteriza por una sobreproducción de células mieloides inmaduras y granulocitos maduros. Cursa de una manera asintomática con aumento en el recuento de leucocitos y plaquetas, y un conteo de células blásticas menores al 10 %. En su presentación clínica se encontrará que los pacientes pueden presentar fatiga y palidez, consultarán comúnmente por distensión abdominal o sensación de masa que podría estar explicada por la esplenomegalia y en algunos casos por hepatomegalia, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso sin causa aparente.

- La fase acelerada, la cual no todos los pacientes la presentarán, pues pueden pasar de una fase crónica a una fase blástica, viéndose en cada dos de tres pacientes. Se presentará con una duración de 18 meses, aunque puede tener en algunos casos una rápida progresión hacia la fase blástica de solo seis meses. Esta

fase acelerada presenta una menor respuesta al tratamiento y sus características son una mayor esplenomegalia, leucocitosis que no responde al tratamiento, incremento de los blastos del 10 al 30 % en sangre periférica y medula ósea, un incremento de los basófilos del 20% en sangre periférica o trombocitopenia no explicada por el uso de inhibidores de la tirosin kinasa y evolución clonal. Los pacientes pueden presentar fatiga, infecciones, lesiones equimóticas o sangrado.

•La fase blástica, que tiene una sobrevida de dos a cuatro meses, tiene un curso fatal y presenta un 30 % o más de células blásticas en medula ósea. Estos pacientes son los más resistentes al tratamiento y la fase blástica puede presentarse como una enfermedad mielóide o linfóide. El paciente puede presentar fiebre, diaforesis, dolor, pérdida de peso y aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos, hígado o bazo (Avila C y Gonzalez P., 2014).

Leucemia Linfocítica Aguda

Casi la mitad de los pacientes cursa con fiebre, astenia y adinamia debidas a anemia. Del 33 al 43% tiene sangrado por trombocitopenia y 25% refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación. Los síntomas menos comunes son cefalea, vómito, alteraciones de las funciones mentales, oliguria y anuria

Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis. El hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extramedulares más afectados. Otras manifestaciones clínicas que aparecen en pacientes con leucemia linfoblástica son: • Masa mediastínica, observada en 7 a 10% de niños y 15% de adultos. • Afecciones oculares, como infiltración leucémica de la órbita, retina, córnea, nervio óptico o conjuntiva. • Nódulos subcutáneos (leucemia cutis). • Engrosamiento de las glándulas salivales. • Parálisis de los pares craneales (Ortega S., Osaya O., *et al* 2007).

Leucemia Linfocítica Crónica

En términos generales, al principio es poco agresiva, pudiendo ir desde asintomática o sólo con algunos síntomas inespecíficos tales como fatiga, hiporexia y pérdida de

peso. Los signos clínicos que se encuentran con mayor frecuencia son la linfadenopatía y la hepatoesplenomegalia. Los crecimientos ganglionares suelen estar presentes en un 80% de los pacientes en el momento del diagnóstico, las cuales son de mayor frecuencia a nivel supraclavicular, cervical y axilar. Puede haber casos de infiltración leucémica al sistema nervioso central, con manifestaciones tales como cefalea, confusión, parálisis de pares craneales, y neuropatías periféricas. Sin embargo, esto es excepcional ya que se ha reportado en menos del 1% de los casos (Arias S., y Valero G., 2013).

5. Tratamiento

Leucemia Mieloide Aguda

El tratamiento de la LMA incluye la terapia de inducción y la de consolidación o posremisión. Para los pacientes menores de 60 años y con enfermedad recientemente diagnosticada, se recomiendan las dosis estándar de tratamiento de inducción que incluyen citarabina combinada con una antraciclina (Cruz F., 2018).

Terapia de inducción: En pacientes con diagnóstico reciente, el tratamiento de inducción a la remisión es el esquema 7 + 3 (Citarabina, daunorrubicina o idarubicina). Los pacientes que después del primer ciclo de terapia de inducción aún tengan rastros citológicos de la enfermedad deberán recibir un segundo ciclo del esquema 7 + 3, dosis altas de citarabina sola o FLAG-IDA.

Leucemia Mieloide Crónica

Dentro de las estrategias generadas para contrarrestar o frenar el avance de la enfermedad se buscan las que puedan frenar la actividad tirosin-kinasa, lo que llevó a diseñar medicamentos que lograron inhibir esta actividad catalítica por el bloqueo de sitio de unión del ATP o sustratos, bloqueando su dimerización, generando anticuerpos contra el receptor tirosin-kinasa o contra el ligando e inhibidores de proteínas de choque térmico. Todas ellas con el fin de disminuir su actividad tirosin-kinasa.

Imatinib: Es el primer inhibidor sintético múltiple de tirosin-kinasa (ABL, BCR-ABL, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y c-kit). La unión de este fármaco se logra en los sitios de unión de ATP, de la conformación BCR-ABL kinasa inactivos, logrando una inhibición del crecimiento e induciendo apoptosis de las células que expresan esta conformación

La meta es una remisión molecular completa y la curación. Los resultados con imatinib han llevado a los médicos a ofrecerlo como terapia de primera línea para los pacientes con LMC de diagnóstico reciente. Sin embargo, algunos pacientes desarrollan resistencia al imatinib y en esos casos se deben ofrecer otros tratamientos.

El dasatinib es la primera terapia autorizada por la FDA como tratamiento de la LMC resistente o intolerante a imatinib. Es un inhibidor oral del receptor de tirosin kinasa de segunda generación, no relacionado estructuralmente con el imatinib y 325 veces más potente que éste. El dasatinib está indicado como tratamiento para pacientes con LMC en cualquiera de sus fases o en LLA Cromosoma Filadelfia positivo, que sean resistentes o intolerantes a tratamiento de primera línea

El nilotinib es un inhibidor competitivo por el sitio de unión al ATP similar al imatinib, aunque 60 veces más potente que éste. Está indicado para pacientes en fase crónica o acelerada resistentes al imatinib (Torres C., Valencia Z., *et al* 2010).

Trasplante de células hematopoyéticas: Aunque la lista de agentes terapéuticos para el manejo de la LMC ha aportado grandes beneficios, no debe perderse de vista que en este padecimiento la única opción curativa hasta el momento ha sido el trasplante alogénico de células hematopoyéticas que puede inducir una supervivencia libre de enfermedad entre 50 y 80% de los pacientes trasplantados. Sin embargo, dicho tratamiento está limitado a pacientes que tienen un donador compatible y son clínicamente aptos para tolerar el procedimiento médico (que puede incluir altas dosis de quimioterapia y radiación corporal total) (Chavez G., Anaya S., *et al* 2009).

Leucemia Linfocítica Aguda

El alopurinol, mediante la inhibición de la síntesis de novo de las purinas en células blásticas leucémicas, puede reducir la cuenta celular periférica de blastos antes que se inicie la quimioterapia.

Para el manejo quimioterapéutico de la leucemia linfoblástica aguda de células B se emplean combinaciones con base en el consorcio BFM (BerlínFrankfurt-Münster) con ciclofosfamida, altas dosis de metotrexato, etopósido y citarabina. El tratamiento eficaz para el sistema nervioso central es un componente importante para el de la LLA-B, que consiste en administración de altas dosis de metotrexato y citarabina por vía sistémica e intratecal, además de arabinósido-C y corticoesteroides

El tratamiento de las leucemias que afectan a las precursoras de las células B y T consiste en tres fases:

- A. Inducción de la remisión. En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, como vincristina, prednisona y L-asparginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina o mitoxantrona para adultos. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90%.
- B. Tratamiento de consolidación o postremisión. Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse pronto, después de la fase previa. En esta fase el objetivo es destruir las células residuales que han superado la etapa previa; se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de ADN y que pueden destruir las células en reposo o fuera de la etapa G0 del ciclo celular. Aquí se administran altas dosis de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, L-asparginasa y citarabina, o bien combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, doxorubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida.
- C. Tratamiento de mantenimiento. Conocido como mantenimiento o continuación de la remisión, tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas. Por razones aún no entendidas debe darse tratamiento a largo

plazo; quizá por la necesidad de eliminar las células leucémicas o la enfermedad mínima residuales, o detener su crecimiento hasta que suceda su apoptosis celular. Con la administración de medicamentos que intervienen en la síntesis de ADN, como mercaptopurina y metotrexato, se genera la mielosupresión. Estos fármacos son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años (Ortega S., Osaya O., *et al* 2007).

Leucemia Linfocítica Crónica

Los diferentes esquemas terapéuticos contra la LLA-B incluyen agentes alquilantes del ADN, análogos de las purinas, anticuerpos monoclonales y combinaciones de ambos grupos.

En pacientes con LLA-B con enfermedad activa, sin comorbilidad y con riesgo biológico bajo-medio, la combinación de rituximab-fludarabina-ciclofosfamida (un anticuerpo monoclonal anti-CD20, un análogo de purinas y un agente alquilante) es el esquema de tratamiento recomendado más eficaz.

En pacientes con LLA-B con enfermedad activa y con comorbilidades moderadas las opciones recomendadas son las combinaciones de rituximab-bendamustina, rituximab-clorambucilo o bendamustina en monoterapia

En los pacientes correspondientes con comorbilidades graves se recomienda tratamiento con clorambucilo, ciclofosfamida o corticoesteroides, junto con tratamiento sintomático de soporte (eritropoyetina, factor estimulante de granulocitos, etc.) (Valdespino G., 2014).

6. Métodos de Diagnóstico

Leucemia mieloide aguda

La mejor forma de evitar un diagnóstico erróneo es mediante la revisión sistemática de un frotis de sangre periférica en el momento de la evaluación inicial de todos los pacientes con trastornos hematológicos. Para diagnosticar la leucemia mieloide aguda es necesario complementar el estudio mediante un aspirado de médula ósea,

con la finalidad de realizar los exámenes de morfología, citoquímica, inmunofenotipo, citogenética y genética molecular (Cruz F., 2018).

Leucemia mieloide crónica

Un alto porcentaje de los pacientes con LMC presentan al inicio un recuento total de leucocitos elevado por encima de 25×10^9 células/L; la mitad de los pacientes tienen recuentos de leucocitos por encima de 100×10^9 células/L. Por lo general, el porcentaje inicial de blastos en la sangre periférica es bajo (menos del 3 %).

El recuento de plaquetas está elevado en el 40 % de los pacientes al momento del diagnóstico y es normal en el resto; no son inusuales los recuentos de plaquetas mayores de $1\,000 \times 10^9$ células/L. Ocasionalmente el recuento de plaquetas puede estar por debajo de la normalidad en el momento del diagnóstico, pero esto habitualmente indica la progresión inminente a la fase acelerada de la enfermedad (Avila C., y Gonzalez P., 2014).

La evolución citogenética constituye en estos momentos uno de los parámetros más importante para el correcto seguimiento de esta enfermedad, y la medición de la respuesta citogenética traza las pautas de manejo en cada paciente.

A pesar de la utilidad de las técnicas citogenéticas convencionales, estas tienen limitaciones, por lo que en la actualidad se utilizan métodos más complejos como el de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) (Pavon M., Hernandez R., et al 2005).

Leucemia linfocítica aguda

Por su comportamiento es indispensable valorar los estudios de laboratorio, deberán solicitarse biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos completos y pruebas de la función hepática. Entre los estudios de gabinete son importantes:

- La radiografía de tórax (para detectar crecimiento del timo, de ganglios y masas mediastínicas, o derrame pleural). La mitad de los pacientes puede manifestar anomalías óseas, como osteólisis y osteopenia.
- La ultrasonografía) hepatoesplenomegalia o edema testicular).
- La tomografía

(ganglios retroperitoneales). La punción lumbar (células blásticas en líquido cefalorraquídeo) es una prueba importante que debe practicarse a todo paciente con leucemia linfoblástica, en especial la que se origina en estirpe B.

Si se utiliza la morfología como medio único para clasificar las leucemias agudas puede haber margen de error diagnóstico por lo que el uso de las clasificaciones inmunológica, citogenética y de biología molecular, permite establecer un diagnóstico más certero y el tratamiento adecuado.

Como la LLA carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos específicos, para la evaluación diagnóstica es esencial llevar a cabo el inmunofenotipo.

Por último, se utiliza la clasificación basada en la citogenética, pues en la mayor parte de las leucemias se encuentra alteración cromosómica. Esto porque la LLA proviene de una célula madre linfopoyética que ha sufrido daño genético, y que origina transformación maligna y proliferación no controlada de la misma. La aparición de hiperdiploidías (>50% cromosomas) e hipodiploidías (<45 cromosomas) tiene relevancia clínica (Ortega S., Osaya O., *et al* 2007).

Leucemia Linfocítica Crónica

En general, se puede diagnosticar LLC cuando hay un aumento del número absoluto de linfocitos en sangre periférica, con características citomorfológicas e inmunofenotípicas que apoyan ese diagnóstico. El estudio molecular complementa estas investigaciones y permite confirmar la naturaleza clonal de la enfermedad (Hernández R., 2003).

El frotis se caracteriza por linfocitos maduros, pequeños, con escaso citoplasma y un núcleo denso con cromatina condensada. Los linfocitos en la LLC expresan los antígenos CD5 y CD23; C D19 y CD20 son coexpresión de los linfocitos B y el CD 5 de las células T; el CD20 y CD79b se encuentran en bajos niveles comparados con los encontrados en las células B normales (Arias S., y Valero G., 2013).

Las cifras de hemoglobina pueden ser normales, altas o bajas. Lo mismo sucede con la cuenta plaquetaria. El ultrasonido de abdomen es un estudio útil para medir

el tamaño del bazo y del hígado, y la tomografía de abdomen podría recomendarse en situaciones especiales. Otros estudios que deben llevarse a cabo son: lactato deshidrogenasa, beta 2 microglobulina, electroforesis de proteínas, inmunoglobulinas, prueba de la antiglobulina humana (Coombs directo) y telerradiografía de tórax (Hernández R., 2003).

7. Citogenética

Los primeros pasos en la citogenética humana se dieron a finales del siglo XIX con la publicación de Flemming en 1882 de las primeras ilustraciones del cromosoma humano a partir de observaciones al microscopio; algunos años más tarde, Waldeyer introdujo el término cromosoma, que significa cuerpo coloreado.

El gran desarrollo de la citogenética se dio con la determinación del número de cromosomas en el cariotipo humano por Tjio y Levan en 1956 (Tamar S., Constanza C., et al 2008).

La citogenética es una disciplina de la biología que estudia los cromosomas y las enfermedades relacionadas con ellos, que pueden ser la causa, por ejemplo, de una estructura disfuncional o de un número anormal de cromosomas en nuestras células (Mota C., Bautista C., et al 2016).

El primer logro para poder diferenciar los cromosomas humanos fue la técnica de bandeo Q, mediante quinacrina. Posteriormente, Seabright desarrolló, en 1971, el protocolo para la obtención de bandas claras y oscuras, teñidas con Giemsa, de allí el nombre de bandeo G. En el mismo año se fijaron, en la Conferencia realizada en París, las primeras normativas de nomenclatura para el cariotipo humano.

La resolución de las bandas que se empleaban hasta ese momento no era superior a 400, hasta que Yunis desarrolló la técnica de alta resolución (AR), que permitió obtener cromosomas de mayor longitud.

Sin embargo, el bandeo de AR no era útil cuando el tamaño de la delección era muy pequeño. Esto se resolvió en la década de 1980 mediante la técnica de hibridación in

situ con fluorescencia (fluorescence in situ hybridization, FISH), que marcó el comienzo de la “citogenética molecular”.

7.1 Citogenética clásica

El estudio de la citogenética humana, iniciada desde la década de los 1950, se realiza mediante las técnicas clásicas de bandeo, primordialmente de las bandas G que ha sido la más utilizada para encontrar alteraciones cromosómicas constitucionales y relacionadas con el cáncer (Uranga H., *et al* 2012).

Básicamente en el análisis cromosómico debemos utilizar tejidos en los que las células sean susceptibles de crecer y dividirse. La sangre periférica es en la mayoría de los casos, el medio biológico de primera elección, pero también se pueden utilizar medula ósea, piel, vellosidad corial, líquido amniótico y cordón umbilical.

Según el tipo de material celular se requerirán medios en suspensión (linfocitos) o medios que forman monocapas (vellosidades coriales, líquido amniótico y piel) (Mota C., Bautista C., *et al* 2016).

Las células empleadas para cultivo cromosómico deben ser capaces de crecer y dividirse rápidamente, para esto se necesitan algunos agentes. Ver Cuadro 5.

Cuadro 5. Reactivos utilizados en la cosecha de cromosomas. Información tomada y modificada de Mota C., et al., 2016.

Reactivos	Función
Fitohemaglutinina	Agente mitógeno
Colchicina	Detiene división celular en metafase
Solución hipotónica	Dispersión de cromosomas
Metanol-ácido acético glacial (3:1)	Fijador

Desde 1970 se han desarrollado nuevas técnicas que permiten identificar a cada par de cromosomas por su patrón característico de bandas transversales, que se ponen de manifiesto con métodos especiales de tinción (Cuadro 6). Las técnicas de bandeo cromosómico consisten en exponer a los cromosomas a diferentes sustancias y colorantes para desnaturalizar porciones de proteínas del esqueleto cromosómico (histonas y no histonas) o evidenciar secuencias de ADN con mayor

o menor cantidad de enlaces bi o trivalentes entre las bases nitrogenadas constitutivas de ADN (guanina, citosina, adenina o timina). Estas posibilidades permitieron un gran impacto a nivel clínico ya que permitieron diferenciar y caracterizar genéticamente un elevado número de síndromes (López C., y Paz M., 2014).

Cuadro 6. Tipos de bandeo cromosómico. Información tomada y modificada de Mota C., et al., 2016.

Tipo de bandas	Tratamiento	Patrón de bandas
G	Enzimas proteolíticas como la tripsina, colorante Giemsa	Bandas claras (GC) y oscuras (AT)
C	Hidróxido de sodio, colorante Giemsa	Regiones heterocromáticas
R	Altas temperaturas en buffer fosfato, colorante Giemsa o naranja de acridina	Patrón inverso a bandas G
Q	Quinacrina	Regiones ricas en AT (fluorescencia)
NOR	Tinción de plata	Regiones organizadoras nucleares

Aunque muy útil, la citogenética clásica o convencional tiene varias limitantes:

- a) Se requieren células vivas en división para obtener cromosomas analizables.
- b) El análisis cromosómico es complejo y consumible de tiempo por lo que se estudian unas cuantas decenas de células
- c) La resolución de las técnicas clásicas de bandeo aun con cromosomas en prometafase es de 5 a 10Mb, por lo que la identificación de muchos rearrreglos complejos, de los cromosomas marcadores o de las alteraciones muy pequeñas quedan fuera de la resolución de la citogenética convencional.

7.2 Citogenética molecular

Hoy en día, las herramientas en Citogenética Molecular permiten detectar alteraciones cromosómicas de un tamaño menor a 3 Mb o rearrreglos muy complejos, imposibles de detectar con Citogenética convencional, esto ha permitido

la detección e identificación de muchas anomalías cromosómicas imperceptibles al ojo humano (López C., y Paz M., 2014).

Para resolver las limitaciones de la citogenética convencional, surgió la citogenética molecular que combina técnicas de biología molecular y citogenética; las técnicas de hibridación in situ con fluorescencia o FISH por su sencillez y sensibilidad han sido las más utilizadas desde su implementación en la década de los 1980 y han sido una excelente herramienta complementaria a la citogenética convencional. Se basan en el marcaje en colores de segmentos conocidos de DNA de 100-300pb, ya sea de forma directa con nucleótidos unidos a fluorocromos o de forma indirecta por incorporación de nucleótidos unidos a grupos como biotina o digoxigenina, los cuales se detectan mediante anticuerpos acoplados a un fluorocromo que emite un color específico. A estos segmentos de DNA se les llama sondas. La sonda se desnaturaliza junto con el DNA de la muestra en estudio y luego se les permite hibridar entre sí, de manera que las sondas detectan los sitios complementarios en el genoma blanco.

Los tipos de sondas más utilizadas incluyen:

- a) Sondas centroméricas que pueden identificar centrómeros de todos los cromosomas (pancentroméricas) o centrómeros de cromosomas específicos.
- b) Sondas de secuencia específica de locus o LSI (Locus Specific Identifier), que identifican una región única del genoma.
- c) Sondas teloméricas, que identifican regiones repetitivas de los telómeros.
- d) Sondas subteloméricas, que marcan las regiones de los subtelómeros tanto de brazos cortos como largos de los cromosomas.
- e) Sondas de pintado cromosómico, que marcan un cromosoma completo de un color específico.

Los tipos de DNA blanco que se pueden estudiar son variados, pueden ser de células en metafase o en interfase, en cualquier fase del ciclo celular, células de cualquier tejido somático o germinal, células fetales o individuos nacidos, células de

cadáver recién colectadas. Con estas técnicas se pueden identificar alteraciones cromosómicas como translocaciones, microdeleciones, microduplicaciones, cromosomas marcadores, cromosomas derivativos, aneuploidías de diagnóstico prenatal, rearrreglos génicos y amplificaciones en tumores y otras anomalías con la gran ventaja de incrementar la resolución por debajo de los 5Mb.

Para seleccionar cualquiera de las sondas que se han mencionado, es necesario saber que sitio del genoma se está buscando, sin embargo, aun en los casos en los que se desconoce la ubicación de la región alterada o en estudio, el FISH sigue siendo útil. Existen técnicas para el estudio del genoma completo, las más utilizadas son: M-FISH (FISH multicolor), o SKY (Spectral Karyotype), basadas en una combinación de sondas de pintado cromosómico que identifican de manera simultánea cada par de cromosomas humanos, es decir 24 colores, uno para cada par cromosómico. Se utilizan en la identificación de rearrreglos cromosómicos complejos, cáncer y estudios de genotoxicidad inducida por agentes clastogénicos, sin embargo, no permite distinguir alteraciones intracromosómicas como inversiones o microdeleciones y microduplicaciones.

Una de las metodologías más ingeniosas para el estudio de genoma completo mediante FISH ha sido la de CGH (Comparative Genomic Hybridization), en la cual se utiliza el genoma completo como sonda; se realiza una hibridación simultánea de 2 genomas en igualdad de proporciones y marcados con diferentes fluorocromos; en general la muestra problema se marca en verde y un genoma normal se marca en rojo, las 2 sondas se ponen a competir por un DNA blanco que puede ser:

- a) Una laminilla con metafases normales (CGH)
- b) Con microarreglos que pueden contener secuencias de oligonucleótidos o bien de BACs (cromosomas bacterianos artificiales) con lo cual se genera un arreglo CGH o aCGH (array CGH) aquí la competencia de genomas produce un color amarillo si existen proporciones equitativas de material genómico, sin embargo, en aquellos casos en donde existe una deleción en la muestra problema, se observará la región en color rojo y si existe una duplicación se observará en verde (Uranga H., et al 2012).

La introducción de métodos sin la utilización de células para multiplicar fragmentos de DNA de origen definido a partir de una mezcla compleja facilitó en gran medida el análisis molecular de genes. La Reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un procedimiento *in vitro* que permite amplificar secuencias de DNA definidas a partir de pequeñas cantidades de DNA de diferentes orígenes (Passarge E., 2007).

El avance de las técnicas moleculares ubica a la citogenética convencional como un prerrequisito esencial en el manejo del paciente leucémico. El análisis de los cromosomas en metafase de la médula ósea permite visualizar en forma global el genoma entero, detectar las aberraciones cromosómicas y ubicar los genes involucrados en el proceso leucémico.

Los criterios citogenéticos para definir la presencia de un clon leucémico en médula ósea son los siguientes: un clon debe tener al menos 2 metafases con la misma aberración ya sea ganancia cromosómica o reordenamiento estructural y 3 metafases con la pérdida del mismo cromosoma (ISCN; 2016). El cariotipo provee valiosa información, aunque muchas veces es difícil definir la aberración presente por múltiples razones, como la presencia de una anomalía compleja, presencia de diferentes clones leucémicos, bajo índice mitótico o pobre morfología que acompaña a los cromosomas en el momento del análisis.

Los cromosomas están formados por dos cromátides unidas en el centrómero (constricción primaria), regiones terminales o telómeros y en ocasiones algunos pueden presentar satélites, separados del cromosoma por una constricción secundaria. El centrómero divide al cromosoma en dos brazos: uno corto (p) y uno largo (q).

El complemento cromosómico de cada célula organizado sistemáticamente se denomina cariotipo. Este término se utiliza para describir la constitución cromosómica de una especie. La identificación morfológica de los cromosomas está basada en los tamaños relativos de los mismos y de sus brazos (Figura 4). Un ideograma es la representación esquemática de la morfología cromosómica que se

usa como diagnóstico genético en humanos, y también para la comparación de los cariotipos de diferentes especies y variedades (López C., y Paz M., 2014).

Morfológicamente, los cromosomas se clasifican según la posición del centrómero. Si este se localiza centralmente, el cromosoma es metacéntrico; si su localización es terminal, es acrocéntrico, y si se sitúa en una posición intermedia es submetacéntrico (Turnpenny P., Ellard S., 2009)

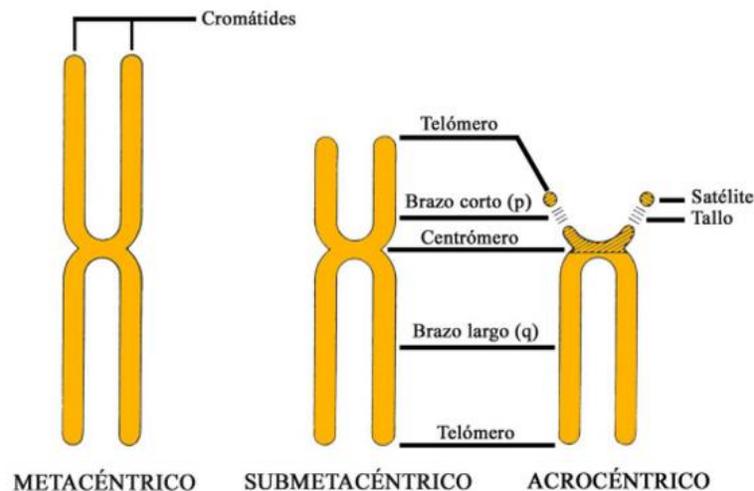


Figura 4. Clasificación de los cromosomas por la posición del centrómero. Tomada de López C., y Paz M., 2014.

Los cromosomas individuales difieren no solamente en la posición del centrómero si no también en su longitud global. Basándose en los 3 parámetros de longitud, posición del centrómero y presencia o ausencia de satélites, los primeros investigadores en citogenética pudieron identificar a la mayoría de los cromosomas individuales o, al menos, subdividirlos en grupos denominados A-G basándose en la morfología global. (A: 1-3; B: 4-5; C: 6-12 + X; D: 13-15; E: 16-18; F: 19-20; G: 21-22 + Y) en los seres humanos en núcleo de una célula normal contiene 46 cromosomas, compuestos por 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales: XX en la mujer y XY en el hombre (Turnpenny P., Ellard S., 2009).

Las alteraciones cromosómicas consisten en el exceso o en la deficiencia en la cantidad de material genético, ya sea por cambios en el número de cromosomas o en su estructura. Las anomalías cromosómicas se agrupan de 2 categorías:

8. Alteraciones numéricas

Las alteraciones numéricas pueden ser por exceso o por defecto, y afectar a toda la serie haploide (euploidias) o a pares cromosómicos aislados (aneuploidías).

Las alteraciones euploides son múltiplo exacto del número haploide n (triploidias $3n=69$ cromosomas, tetraploidias $4n=92$ cromosomas, etc). Si el número de veces que se repite la serie haploide es muy elevado se denominan poliploidias; su origen suele residir en una dispermia (fecundación de un óvulo por 2 espermatozoides) o por un error meiótico (no expulsión del cuerpo polar). Son causa de abortos y no suelen ser compatibles con la vida postnatal. Las aneuploidias son en aumento o pérdida de cromosomas aislados; pueden afectar a cualquier par cromosómico y a más de uno (trisomía: $46+1$, tetrasomía: $46+2$, pentasomía: $46+3$, monosomía: 45) su origen suele estar en la no disyunción o en una anafase lenta (Oliva R., Ballesta F., *et al* 2004).

9. Alteraciones estructurales

Las anomalías estructurales provocan cambios en la estructura de uno o varios cromosomas (Figura 5). Pueden ser muy complejas, pero una de las consecuencias más importantes es la pérdida o la ganancia de genes. Estas casi siempre se presentan con patologías graves para el portador y se denominan anomalías desequilibradas. En otros casos no hay pérdida o ganancia de genes y, por tanto, los individuos fenotípicamente son normales (anomalías estructurales equilibradas) aunque pueden tener problemas en la reproducción o en la descendencia (Mota C., Bautista C., *et al* 2016).

Heterocromatina (h): No suele tener repercusiones patológicas por lo que su presencia debe de interpretarse como un polimorfismo no patogénico. Para

designar un aumento o disminución se utiliza h+, h-. indicando el brazo donde se encuentra (qh+, qh-, ph+, ph-).

Microdelección: Pérdida de material cromosómico que no se visualiza con las técnicas citogenéticas habituales debiéndose aplicar las de alta resolución o citogenética molecular para su detección.

Material adicional de origen desconocido (add): Se puede poner p+ o q+, pero es mejor especificar. Ejemplo: 46,XX, add(19)(p13).

Cromosomas derivativos (der): Proceden de reordenamientos intra e intercromosómicos (suelen ser fruto de translocaciones e inversiones) El cromosoma derivativo se pone entre paréntesis seguido por el tipo de anomalía si se conoce.

Cromosoma dicéntrico o isodicéntrico (dic): Cromosoma dicéntrico es el que contiene 2 centrómeros.

Cromosoma en anillo (r): Hay rotura de los 2 extremos del cromosoma, separación con pérdida de los fragmentos distales y unión posterior de los extremos libres formando un anillo.

Isocromosoma (i): Se origina por división transversal del centrómero en lugar de longitudinal. Como consecuencia las cromátidas son asimétricas, una formada por 2 brazos largos y otra por 2 cortos.

Cromosoma marcador (mar): Cromosoma que no puede ser identificado o incluido en un par cromosómico (Oliva R., Ballesta F., *et al* 2004).

Delección (del): Pérdida de material genético de un solo cromosoma. Las deleciones pierden ser de 2 tipos: si se pierde un segmento terminal (telómero) se denominan deleciones terminales o deficiencias. Si la pérdida es de un segmento interno del cromosoma se les denomina delección intersticial.

Duplicación (dup): Anomalía estructural que conlleva a la repetición de una sección de un cromosoma. La duplicación puede darse en tándem, cuando los 2 segmentos,

el original y el duplicado se encuentran adyacentes. En otros casos cuando los segmentos no son contiguos, se trata de una duplicación desplazada.

Inversión (inv): Anomalía estructural en la que en un cromosoma se dan dos cortes y el segmento seccionado sufre un giro de 180° , que se une nuevamente en los extremos seccionados del cromosoma (se invierte) La consecuencia es que el fragmento invertido tiene la secuencia génica cambiada. Las inversiones pueden ser paracéntricas, si las roturas y posterior inversión se dan en el mismo brazo del cromosoma y pericéntricas, si la rotura se da entre los 2 brazos del cromosoma y por tanto afecta al centrómero.

Traslocaciones: Se producen intercambios de material cromosómico entre cromosomas no homólogos. Si el material que se trasloca no lo hace dentro de un gen, la traslocación no tendrá consecuencias graves, ya que no habrá pérdida ni ganancia de genes. Hay 2 tipos de traslocaciones.

1.- Translocación recíproca: Se produce con la participación de 2 fragmentos de cromosomas no homólogos, que incluyen el telómero.

2.-Traslocación robertsoniana: Se produce cuando la traslocación se da entre 2 cromosomas acrocéntricos y la rotura se da en los brazos cortos de ambos cromosomas (o en un punto cercano al centrómero). Como consecuencia de la fusión hay una pérdida de los 2 brazos cortos y el individuo tendrá 45 cromosomas (Mota C.,Bautista C., *et al* 2016).

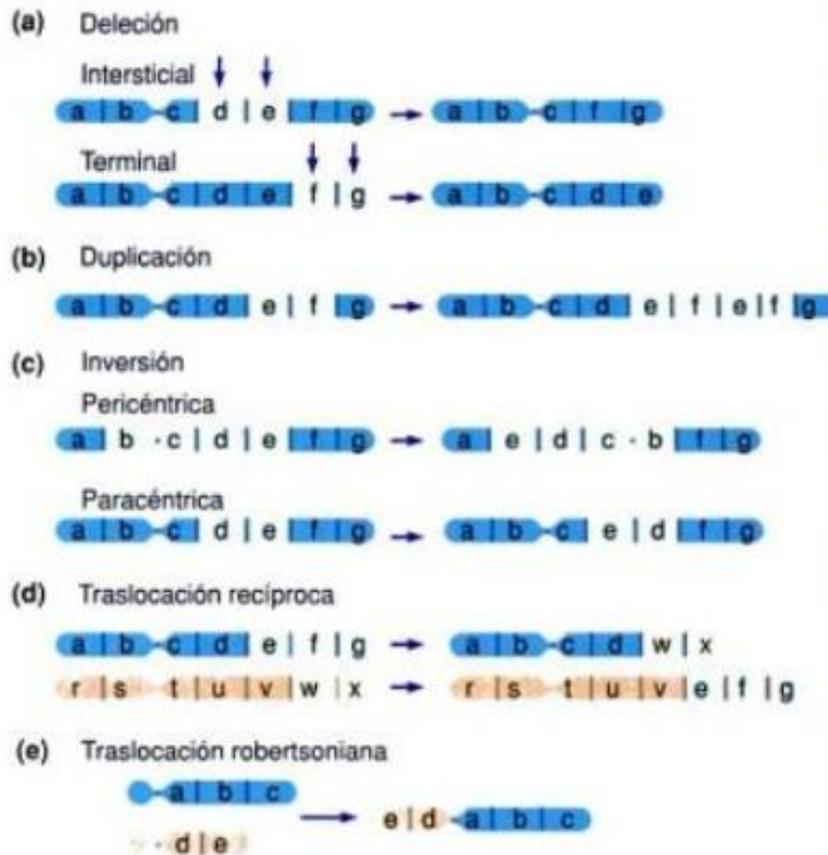


Figura 5. Alteraciones cromosómicas estructurales. Tomada de Curtis H., Schnek A., et al 2008.

10.- Alteraciones citogenéticas en leucemias

Leucemia Mieloide Aguda

En más de 97% de los casos de leucemia mieloide aguda se han identificado alteraciones cromosómicas, como t(8:21) en el (CBF-AML) (RUNX1-RUNX1T1) o la t(15:17) (PML-RAR), cuyas consecuencias son la formación de proteínas quiméricas que trastornan el proceso normal de maduración de los precursores mieloides, asimismo, la mutación de genes relacionados con la proliferación y la diferenciación celular (Cruz F., 2018).

Existen otras alteraciones citogenéticas menos frecuentes en la LMA como la t(9;11)(p22;q23), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2). (Lagunas R., 2016)

Leucemia Mieloide Crónica

La enfermedad hace parte de los desórdenes mieloproliferativos, que son enfermedades con un compromiso clonal de las células hematopoyéticas primordiales y es definida por la presencia constitutiva de una actividad tirosin kinasa. Esta anomalía se define en LMC por la presencia de una mutación BCR-ABL (oncoproteína) conocida también como Cromosoma Filadelfia (denominada así debido a que existe una translocación recíproca entre el gen Abelson Tk “ABL” gen del cromosoma 9 que se fusiona con la región de ruptura de los conglomerados (breakpoint cluster region) del gen “Bcr” del cromosoma 22), el 95 % de las leucemias mieloides crónicas son causadas por esta anomalía genética.

Con la translocación recíproca del Cromosoma Filadelfia se crean dos genes: BCR-ABL del brazo largo del cromosoma 22 (Cromosoma Filadelfia) expresado en todos los pacientes con LMC, y ABL-BCR del brazo largo del cromosoma 9 que se encuentra sólo en el 70 % de los casos. Esta translocación codifica una proteína que varía de tamaño dependiendo del sitio de ruptura del gen Bcr. Los tamaños varían entre 190 Kda (70 %) y 230 Kda (30 %), siendo esta última responsable de la mayoría de las anomalías fenotípicas en la fase crónica. Esta proteína (230 kda) presenta actividad tirosin kinasa: los pacientes que la expresan tendrán una enfermedad más indolente, mientras que los pacientes con un gen de 190 Kda serán más propensos a desarrollar cáncer. Estas proteínas también se pueden encontrar en pacientes con leucemia linfocítica aguda con una menor prevalencia, lo que explica que no todos los pacientes con Cromosoma Filadelfia desarrollarán LMC (Torres C., Valencia Z., *et al* 2010).

Leucemia Linfocítica Aguda

Cuadro 7. Translocaciones cromosómicas más frecuentes en LLA. Cuadro tomado y modificado de Lassaletta A., 2016.

Translocación	Genes afectados
t(1;19)(q23;p13)	EA2-PBX1
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL
t(4;11)(q21;p23)	MLL-AF4
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML

La anomalía cromosómica más frecuente en los pacientes con cáncer pediátrico es la translocación t(12;21) que se encuentra en el 25% de los menores con LLA común; esta alteración prenatal es el resultado de una fusión del gen TEL (del cromosoma 12) con el AML1 (del cromosoma 21) y se asocia con un pronóstico favorable. Por otro lado, en más del 70% de las leucemias diagnosticadas antes del primer año de vida se observan translocaciones que afectan al gen MLL (del inglés, mixed lineage leukemia) (Castro J., Orozco V., *et al* 2007).

Las alteraciones del cromosoma 11 en la banda q23 son relativamente frecuentes en niños con LLA, y pueden involucrar: translocaciones balanceadas y desbalanceadas, deleciones y duplicaciones. Aunque generalmente caracterizadas por hiperleucocitosis, edad muy temprana, falta de expresión CD 10, y una pobre respuesta al tratamiento, pertenecen a un grupo heterogéneo de leucemias de línea B o T y llevan una variedad de translocaciones incluyendo las t(4; 11), t(11; 19) entre otras (Venegas P., 2001).

Leucemia Linfocítica Crónica

La hibridación fluorescente in situ en interfase detecta alteraciones citogenéticas en las clonas de LLC-B en un poco más de 80% de los casos, estas alteraciones son elementos de diagnóstico y pronóstico. Las principales anomalías detectadas corresponden a eliminaciones parciales de los cromosomas 13 (del 13q), 11 (del 11q) y 17 (del 17p) y a trisomía del cromosoma 12q, en porcentajes de 55, 18, 16 y 7%, respectivamente (Valdespino G., 2014).

La eliminación en la banda 13q14 es la alteración estructural cromosómica más frecuente en los casos con leucemia linfocítica crónica (50-60%) y puede representar un evento temprano en la enfermedad.

La trisomía 12 ocurre en 15% de los casos y se asocia con otras aberraciones cromosómicas que incluyen trisomía 18 y 19, eliminaciones en 14q, 13q, 11q o 17p, translocaciones de IGH y mutaciones en NOTCH1, TP53, FBXW7 y de IGHV.

La del(11)(q22-q23) se ha identificado como un factor pronóstico adverso de la evolución de la leucemia linfocítica crónica.

La del 17p13 ocurre en 5 a 20% de los casos de LLC, supresentación de novo se identifica como el factor pronóstico adverso más elevado en la evolución de la leucemia linfocítica crónica (Valdespino G y Valdespino C., 2015).

11. Generalidades del Síndrome mielodisplásico

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son trastornos de células madre hematopoyéticas clonales que se caracterizan por eritropoyesis inefectiva, displasia que involucra uno o más linajes celulares, citopenia periférica y un mayor riesgo de transformación a leucemia mieloide aguda. En la mayoría de los casos, los pacientes con SMD exhiben una médula ósea hipercelular, mientras que 10 a 20% de los casos presentan una disminución de la celularidad de la médula ósea (Bono E., McLornarn D., *et al* 2019).

En las personas que tienen un síndrome mielodisplásico, la médula ósea deja de producir una cantidad suficiente de glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas sanos. En lugar de eso, produce células poco desarrolladas (inmaduras) que son de tamaño, forma o apariencia anormal. Estas células se denominan células “displásicas” (de formación anormal). También puede producirse una acumulación de las células más inmaduras de la médula ósea, denominadas “células blásticas”, las cuales aún no pueden realizar las funciones específicas de las células maduras (Louis J., 2017).

En pacientes con síndromes mielodisplásicos, las células blásticas pueden constituir más del 5% de todas las células de la médula ósea. El principal factor determinante de la gravedad de un síndrome mielodisplásico es el grado del aumento de la cantidad de células blásticas en la médula ósea. Un síndrome mielodisplásico puede ser leve o grave. Puede presentarse inicialmente como anemia (una disminución del nivel de hemoglobina en la sangre) y luego progresar muy lentamente, o puede ser una enfermedad de progresión rápida. Los casos más graves de síndromes mielodisplásicos conllevan un alto riesgo de progresión a una leucemia mieloide aguda.

Los síndromes mielodisplásicos pueden ser del tipo primario, también denominado “de novo”, en cuyo caso se desconoce la causa de la enfermedad, o del tipo secundario, donde la causa está relacionada con el tratamiento de otra enfermedad en el pasado.

Síndrome mielodisplásico primario o de novo: En la mayoría de los casos de síndromes mielodisplásicos, los médicos no pueden identificar una causa específica. En la mayor parte de los casos, debido al envejecimiento, se presentan mutaciones (cambios en el ADN) en forma aleatoria en las células madre, y si estas mutaciones tienen lugar en genes específicos y en posiciones determinadas, el resultado es un síndrome mielodisplásico.

Síndrome mielodisplásico secundario: Algunas personas que han recibido tratamiento para otro tipo de cáncer tienen un riesgo pequeño de presentar un síndrome mielodisplásico relacionado con el tratamiento. Esto sucede solamente en un pequeño número de pacientes que estuvieron expuestos a quimioterapia y/o radioterapia, y los síndromes mielodisplásicos secundarios son menos frecuentes que los síndromes mielodisplásicos primarios. Algunos pacientes con trastornos infrecuentes de la médula ósea que son hereditarios, tales como la anemia de Fanconi o la disqueratosis congénita, también pueden presentar un síndrome mielodisplásico secundario, igual que los pacientes con un diagnóstico previo de otro trastorno de insuficiencia medular denominado anemia aplásica (Bono E., McLornarn D., *et al* 2019).

11.1 Clasificación

En la clasificación del grupo FAB, los síndromes mielodisplásicos se dividen en los siguientes cinco subtipos según el porcentaje de blastos presentes en MO y SP, la cantidad de sideroblastos en anillo (RS) y la intensidad de la monocitosis:

1. Anemia refractaria (RA)
2. Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (RARS)
3. Anemia refractaria con exceso de blastos (RAEB)
4. Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (RAEB-T)

5. Leucemia mielomonocítica crónica (CMML)

En el 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una clasificación alternativa, modificada a partir de la clasificación original del grupo FAB, que incorporó factores moleculares y citogenéticos. Desde entonces, la clasificación de la OMS ha sido actualizada dos veces, una vez en el 2008 y nuevamente en el 2016 (Louis J., 2017).

Se eliminaron los términos anemia o citopenia refractaria para emplear únicamente el término SMD (Cuadro 8) (San Miguel J., Sánchez G., 2020).

Cuadro 8. Clasificación de la OMS de los síndromes mielodisplásicos del 2016: seis subtipos principales. Tomado y modificado de San Miguel J., Sánchez G., 2020.

Subtipo	Citopenia	Cariotipo
SMD con displasia unilineal (SMD-SLD)	1-2	Indiferente
SMD con displasia multilineal (SMD-MLD)	1-3	Indiferente
SMD con sideroblastos en anillo (SMD-RS):		
*Displasia unilineal (MDS-RS-SLD)	1-2	Indiferente
*Displasia multilineal (SMD-RS-MLD)	1-3	Indiferente
SMD con exceso de blastos (SMD-EB)		
Tipo 1	1-3	Indiferente
Tipo 2		
SMD con del(5q) aislada	1-2	Del(5q) aislado o acompañado de otra alteración excluyendo monosomía 7 o del(q7)
SMD no clasificable (SMD-U):		
*Con 1% de blastos en SP	1-3	Indiferente
*Con displasia unilineal y pancitopenia	3	Indiferente
*Con alteraciones citogenéticas definitorias	1-3	*Alteraciones definitorias de SMD

*Alteraciones citogenéticas definitorias de SMD: -7/del(7q), t(11;16)(q23;p13.3), -5/del(5q), t(3;21)(q26.2;q22.1), i(17q)/t(17p), t(1;3)(p36.3;q21.1), -13/del(13q), t(2;11)(p21;q23), del(11q), inv(3)(q21;q26.2), del(12p)/t(12p), t(6;9)(p23;q34), del(9q), idic(X)(q13).

11.2 Signos y síntomas

Las personas con SMD a menudo tienen niveles bajos de uno o más tipos de células sanguíneas (Louis J., 2017).

Síndrome anémico (por la diseritropoyesis) y/o síndrome infeccioso (por la disgranulopoyesis) y/o síndrome hemorrágico (por la distrombopoyesis) (San Miguel J., Sánchez G (2020).

11.3 Dx

WBC, aspiración y biopsia de MO, estudio citogenético ya que las anomalías cromosómicas son factores importantes para la identificación de subtipos específicos de SMD, pruebas moleculares porque estas pruebas se usan para buscar mutaciones en genes que están asociados con los SMD.

Es común que las células cancerosas de un síndrome mielodisplásico tengan cromosomas anormales. Aproximadamente el 50 por ciento de los pacientes tienen una o más anomalías cromosómicas (Louis J., 2017).

11.4 Alteraciones citogenéticas en SMD

Hay diferentes tipos de defectos cromosómicos. Las anomalías citogenéticas más comunes que se observan en los síndromes mielodisplásicos conllevan:

La deleción del brazo largo (q) de uno de los dos cromosomas de un par:

del(5q) o 5q-, del(7q) o 7q-, del(20q) o 20q-

La pérdida completa de uno de los dos cromosomas de un par:

-5, -7

Trisomía 8: una copia adicional del cromosoma 8, por lo que hay tres copias del cromosoma 8 (Louis J., 2017).

III. Planteamiento del problema

En México, la leucemia es la neoplasia de mayor frecuencia en la población menor de 20 años de edad, común en adultos jóvenes y la 4ª causa de cáncer en la población de 30 a 59 años de edad. En este tipo de padecimiento, se asocian al proceso leucémico, alteraciones cromosómicas estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc.) o alteraciones numéricas (como trisomías), estas alteraciones permiten predecir el riesgo alto o bajo e incluso la fase de la enfermedad (LGC), la respuesta al tratamiento y la supervivencia, por lo que es de gran importancia saber con exactitud, cuáles son las alteraciones que presenta cada paciente al diagnóstico. Hay otras alteraciones muy pequeñas que el cariotipo no puede detectar, se recomienda utilizar también técnicas de citogenética molecular como FISH (Hibridación fluorescente *in situ*) y/o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), con el fin de tener un diagnóstico certero, para que al paciente se le proporcione un tratamiento adecuado, logrando controlar la enfermedad o llegando incluso a la remisión completa.

IV. Objetivo General y particulares

GENERAL

Estandarizar la técnica de obtención de cromosomas de calidad en muestras de médula ósea y sangre periférica para el diagnóstico de enfermedades hematológicas, así como correlacionar los resultados con la citogenética molecular.

PARTICULARES

1. Identificar las alteraciones cromosómicas de citogenética clásica y reportarlas de acuerdo al ISCN, 2016.
2. Identificar las alteraciones cromosómicas de citogenética molecular y reportarlas de acuerdo al ISCN, 2016.
3. Correlación de las técnicas empleadas y los datos hematológicos.

V. Metodología

Población de Estudio

Se realizó el estudio citogenético a 132 pacientes del servicio de Hematología del HJM del periodo enero del 2018 a diciembre 2018.

Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con enfermedades hematológicas.
- Pacientes con edad y sexo indistinto.

Criterios de exclusión

- Pacientes con un diagnóstico distinto de enfermedades hematológicas.

Criterios de eliminación

- Muestras coaguladas y material insuficiente o de mala calidad.

Métodos

5.1 Cariotipo

Preparación de la muestra

Dependiendo del tipo de muestra, se debe llevar un proceso preparativo específico: tipo de material, conservación, medio de transporte.

Lo primero que se realiza es la toma de muestra, si es de médula ósea se dan las especificaciones al médico para que la muestra no esté coagulada, este tipo de muestras debe tomarse con jeringa heparinizada o transvasarse a un vacutainer con heparina. En caso de que la muestra sea de sangre periférica, esta debe tomarse en el laboratorio utilizando también un vacutainer con heparina.

Cultivo celular y siembra de muestra

Se deben tomar cuidados específicos al momento de realizar el cultivo, para que la muestra no se contamine y se pueda obtener buen material para analizar.

Esterilizar el material en la campana de luz UV durante 25 minutos: gasas, pipeteador, pipetas de 5mL, cajas falcon de 50mL, frascos de desecho, pipetas pasteur, tubos cónicos falcon de 15mL, gradilla y plumón indeleble.

Cultivo de sangre periférica: Rotular 2 tubos de 15mL (# de caso/año y colocar si es tubo A o B), poner a cada tubo 5 mL de medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (10%) y antibiótico (penicilina, estreptomicina 10000 U/mL) y añadir 600 µL de sangre, así como 2 gotas de fitohemaglutinina, incubar las cajas a 37°C durante 72 horas, hasta que se realice la cosecha de la muestra.

Cultivo de Médula ósea: Rotular 4 cajas Falcon de 50mL (#de caso/año y marcar de la A-D) poner a cada caja 5mL de medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (10%) y antibiótico (penicilina, estreptomicina 10000U/mL) y dependiendo de si la sangre se ve concentrada o diluida, colocar de 500 µL a 1000µL de sangre, incubar las cajas a 37°C, es importante mencionar que, dependiendo del diagnóstico, va a ser el tiempo de incubación. Ver Cuadro 9.

Cuadro 9. Tiempos de incubación de la muestra dependiendo del tipo de leucemia o SMD.

Diagnóstico	Tiempo
LGC	24h
LLA	48-72h
LMA	72h
SDM	48-72h

Cosecha

Cosecha de sangre periférica: Añadir a cada tubo 2 gotas de colchicina (0.01mg/mL) durante 20 minutos, centrifugar la muestra a 2500rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante y añadir 6mL de solución hipotónica (KCl 4%), dejar en reposo dentro de la incubadora durante 12 minutos. Posteriormente centrifugar a 2500rpm/5minutos y eliminar el sobrenadante, fijar la muestra con la Solución Carnoy (3:1) hasta el volumen 9mL del tubo falcón, resuspender en vortex y llevar

nuevamente a centrifugar a 2500rpm/5min, pasado este tiempo, retirar el sobrenadante y realizar una serie de lavados con la solución Carnoy (3:1) hasta que el botón quede blanco, en el último lavado se tiene que dejar 1mL de sobrenadante para poder resuspender el botón y poder gotear la laminilla.

Cosecha de médula ósea: Trasvasar la muestra a un Tubo Falcon de 15mL y añadir 2 gotas de colchicina (0.01mg/mL) durante 25 minutos, posteriormente centrifugar la muestra a 1200rpm durante 8 minutos, eliminar el sobrenadante y añadir 6mL de solución hipotónica (KCl y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 1:1). El tiempo de la solución hipotónica varía de acuerdo al diagnóstico, la temperatura, el tamaño del botón, aproximadamente está alrededor de 15 minutos y en todo ese tiempo se debe realizar a la muestra un burbujeo suave con ayuda de la pipeta Pasteur, pasado este tiempo añadir el fijador de solución Carnoy (3:1) hasta el volumen 9mL del tubo falcón y resuspender con la pipeta Pasteur, llevar nuevamente a centrifugar a 1200rpm/8min, pasado este tiempo retirar el sobrenadante y realizar una serie de lavados con la solución Carnoy (3:1) hasta que el botón quede blanco, en el último lavado se debe dejar 1mL de sobrenadante para poder resuspender el botón y poder gotear la laminilla.

Goteo

El pellet obtenido en la cosecha se debe resuspender con el sobrenadante con ayuda de una pipeta pasteur, se toma una laminilla con ayuda de las pinzas de disección y se limpia perfectamente con una gasa.

Se puede gotear la muestra de diferentes maneras con el fin de que la metafase quede abierta:

*Una vez lista la laminilla se deja caer una gota de la muestra a una altura aproximadamente de 5cm, sacudir la laminilla con un movimiento firme para que esta se extienda.

*Agarrar la laminilla en un ángulo de 40°, tomar aproximadamente 0.5mL de la muestra, pegar la pipeta pasteur a la laminilla y expandir la muestra de extremo a extremo.

En caso de que las metafases no se vean o bien estén muy cerradas, se puede optar por calentar las laminillas en una platina, para esto vamos a poner papel absorbente con agua y colocar las laminillas arriba durante 3 minutos.

Si las metafases se observan muy juntas, se debe diluir la muestra con la solución Carnoy.

Nota: Previamente lavar los portaobjetos con jabón neutro y agua y colocarlos en un frasco con etanol al 96% guardándolos en el refrigerador de 4°C para que al momento de utilizar las laminillas estén frías.

Maduración de laminillas

Para poder bandear, es necesario que las laminillas se maduren en una estufa bacteriológica a 60°C durante al menos 8 horas.

Bandeo G

Teñir las laminillas con el método de bandeo G, para esto se colocaron 6 coplins:

Cuadro 10. Tiempo de reactivos en bandeo G.

Coplin	Reactivos	Tiempo
1	50mL de Buffer Wright + 150 µL de tripsina (1:250)	12-20 segundos (varia)
2	50mL de Buffer Wright	16 segundos
3	H ₂ O corriente	Enjuagar
4	45mL de Buffer Gurr + 5mL colorante Wright	1 minuto (varia)
5	40mL de Buffer Gurr + 10mL colorante Giemsa	1 minuto (varia)
6	H ₂ O corriente	Enjuagar

Meter de una laminilla en una, con el fin de comprobar que los tiempos propuestos de los reactivos sean los adecuados (Cuadro 10).

Meter la laminilla en el coplin 1 donde se debe experimentar con el tiempo de la tripsina (1:250) (por lo regular empezamos con un tiempo de 12 segundos), pasar al coplin 2 por 16 segundos, después al coplin 3 donde se debe enjuagar la laminilla

con agua para posteriormente pasarla al coplin 4 donde también se debe jugar con los tiempos (por lo regular empezamos con un tiempo de 1 minuto) lo mismo ocurre con el coplin 5 y por último pasar al coplin 5 donde se enjuaga la laminilla. Revisar la laminilla en el microscopio, para poder ver el color de los núcleos, los cromosomas y si se observa mucho citoplasma. En caso de que haya citoplasma se debe aumentar el tiempo de tripsina, en caso de que los cromosomas de las metafases se vean descompactados se disminuye el tiempo de tripsina, si los núcleos o cromosomas se ven muy oscuros se debe bajar el tiempo de colorante Giemsa, y si se ven muy claros se aumentar el tiempo.

Nota: Después de enjuagar la laminilla en el agua se debe secar con una gasa por la parte de abajo del portaobjetos para que el colorante no se diluya.

Una vez que se tengan los tiempos adecuados de tripsina y colorante Giemsa ya se podrán bandear todas las laminillas con esos tiempos.

Montaje

Una vez bandeadas las laminillas, se deben montar con el fin de poderlas analizar en el microscopio, para esto primero se debe desengrasar con etanol los cubreobjetos rectangulares.

Colocar a cada laminilla 3 gotas de resina Entellan® y colocar encima el cubreobjetos, esperar a que el entellan se disperse para poder quitarle las burbujas que se formaron, dejar secando las laminillas 24 horas y al día siguiente limpiar el exceso de resina con ayuda de xilol y etanol.

Análisis

Una vez montadas las laminillas, realizar un análisis de las metafases con ayuda del microscopio Zeiss automatizado, el cual cuenta con un programa llamado Metasystem, el cual permite seleccionar las mejores metafases, este ya está programado para seleccionar metafases y núcleos, esto lo hace con el objetivo 10X, manualmente se seleccionan las mejores metafases y las imágenes que no sirven se eliminan, entonces se le pondrá a la laminilla aceite de inmersión y se pondrá en el objetivo 63X, hecho esto, el microscopio manda las metafases a la computadora

la cual cuenta con el Software IKAROS el cual permite editar las metafases con el fin de que se vean mejor las bandas de los cromosomas, luego separar uno por uno los cromosomas y se acomodan en el cariotipo, con el fin de ver posibles alteraciones ya sean numéricas o estructurales.

Criterios de análisis: Para reportar las alteraciones cromosómicas se deben encontrar 3 metafases alteradas en caso de alteraciones numéricas y 2 metafases alteradas en caso de las estructurales.

Los resultados se reportarán con base en la ISCN 2016 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2016)

5.2 FISH

Cultivar las muestras por citogenética convencional, utilizando las sondas comerciales BCR/ABL y PML/RARA (Vysis. Inc)

Madurar las laminillas en solución salina doble de citratos (2xSSC) a 37°C, durante 30 minutos, deshidratar en una serie de etanoles al 70%, 80% y 100%. Se desnaturalizan las laminillas en formamida al 70% y se deshidratan de nuevo en etanol. Colocar la sonda en la laminilla y sellar con el cubreobjetos. (Desnaturalizar la muestra y la sonda a 72° +/- 1°C). Hibridar en caja húmeda a 37°C +/-1°C sin que le dé luz y dejar 16-24 horas.

Lavar con detergente NP40 para quitar restos de sonda y contrateñir con el colorante DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol).

Realizar el análisis con ayuda del microscopio Zeiss automatizado, el cual cuenta con un programa llamado Metasystem y se utiliza el software ISIS. Se deben analizar 200 núcleos por caso.

Criterios de análisis: Los núcleos deben estar bien definidos y no deben estar empalmados, las señales deben ser redondas, del mismo tamaño y brillantes, los núcleos se deben encontrar en un área donde el 90% este hibridado, las señales de

hibridación deben estar dentro del núcleo, las señales deben estar separadas por el diámetro de una señal.

Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, dual fusión translocation

Estas sondas se hibridan con el cromosoma 9q34 para gen ABL marcado con un espectro de emisión naranja (SpectrumOrange) y el cromosoma 22q11.2 para el gen BCR marcado con el espectro de emisión verde (SpectrumGreen). Ver figura 6.

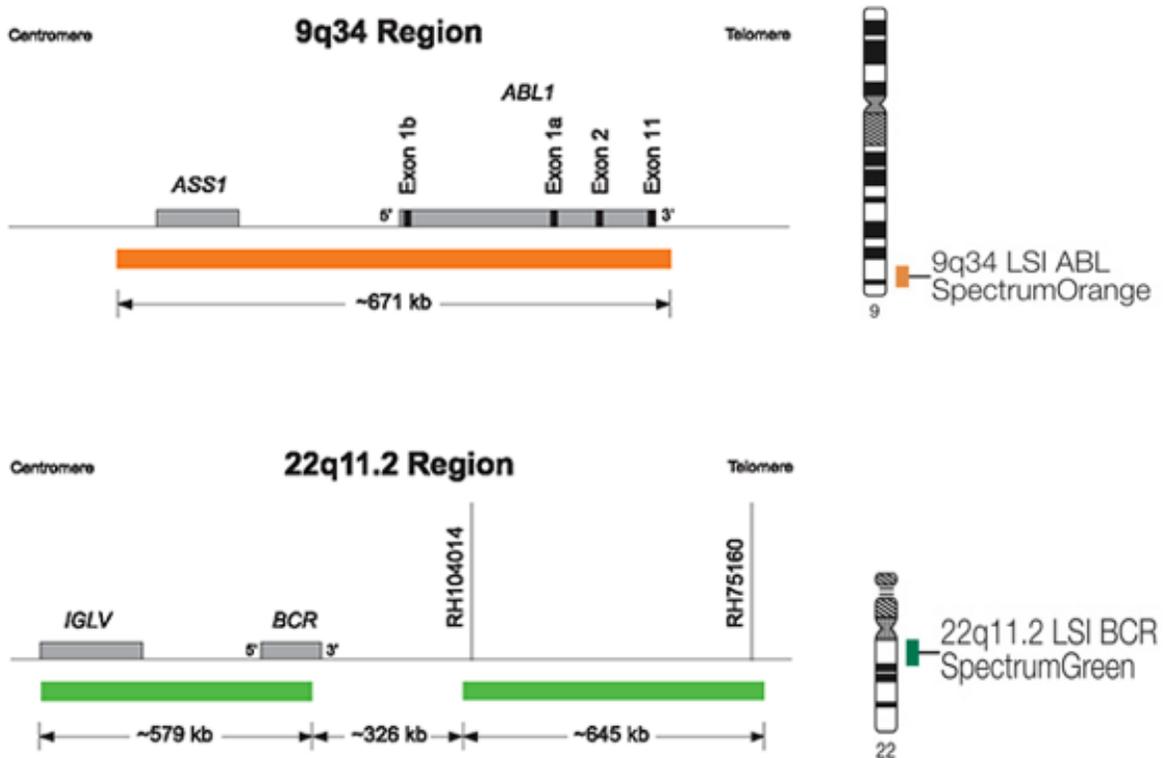


Figura 6. Sondas LSI para translocación BCR/ABL.

En una célula normal se observa un patrón de 2 señales naranjas y 2 verdes.

En una célula que contiene la t(9;22) se observara una señal naranja (ABL), una verde (BCR) y 2 señales fusionadas en amarillo. Ver figura 9.

En algunos casos, las deleciones pueden ocurrir 3' del punto de ruptura BCR y / o 5' del punto de ruptura ABL dando como resultado un patrón de señales (naranja o verde adicional) o un patrón de fusión único.

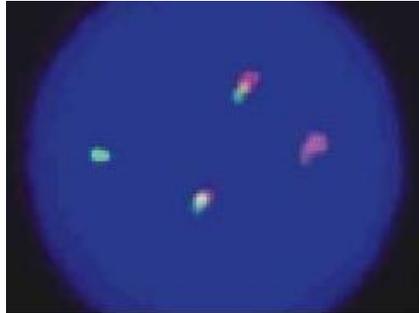


Figura 7. FISH $t(9;22)(q34;q11)$

Sonda Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe

Estas sondas se hibridan con el cromosoma 15q22-24 para el gen PML marcado con un espectro de emisión naranja (SpectrumOrange) y el cromosoma 17q21 para el gen RARA marcado con el espectro de emisión verde (SpectrumGreen). Ver figura 8.

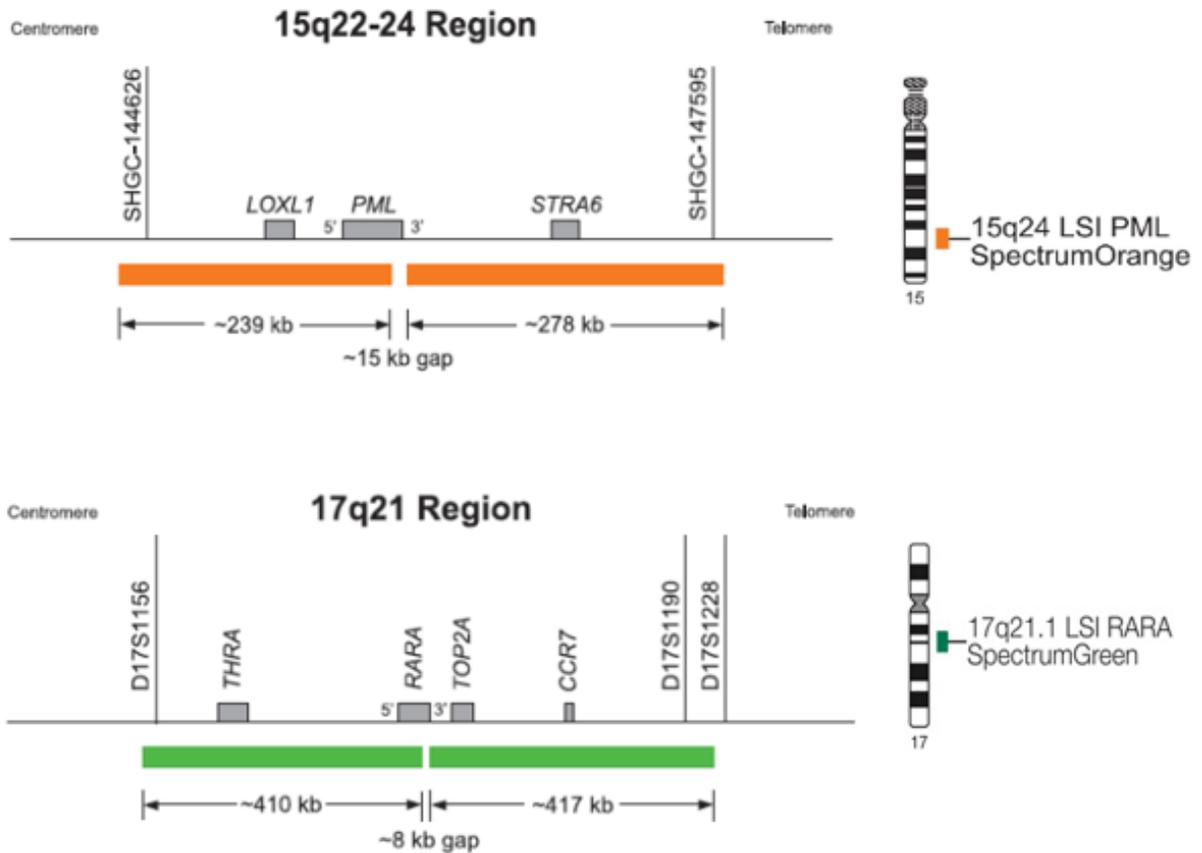


Figura 8. Sondas LSI para translocación PML/RARA.

En una célula normal se observa un patrón de 2 señales naranjas y 2 verdes.

En una célula que contiene la t(15;17) se observara una señal naranja (PML), una verde (RARA) y 2 señales fusionadas (PML/RARA y RARA/PML). Ver figura 9.

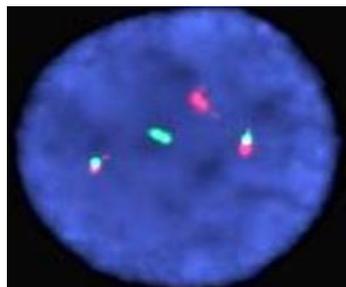


Figura 9. FISH t(15;17)

VI. Resultados y discusión

Para la obtención de cromosomas con una calidad suficiente para analizar, se realizaron distintas técnicas, así como medios de transporte para evitar que las muestras no se coagularan al llegar al laboratorio.

En la literatura se mencionan 6 pasos para la obtención de cromosomas, el primero consiste en la obtención de la muestra, el segundo es el cultivo celular, el tercero es la cosecha de células, el cuarto es el goteo de la muestra, el quinto el bandeo y por último el análisis cromosómico. Pero hasta el momento no hay una técnica única para garantizar una adecuada obtención de cromosomas, debido a que hay distintos factores que pueden influir en la obtención de un resultado exitoso. Uno de ellos es que la duración del ciclo celular en células malignas varía entre los diferentes tipos de células, otro factor importante son los tiempos en que los reactivos van a actuar o la forma de manejar las muestras, además de que cada laboratorio tiene distintas condiciones como la temperatura, humedad, etc (Thomas S., 2017).

Por esta razón para la estandarización del cariotipo en el laboratorio de citogenética del Hospital Juárez de México se realizaron varias metodologías basadas en la técnica general.

Cabe mencionar que, al principio, cuando se informaba que una muestra de médula ósea iba a llegar, se le proporcionaba al médico un vial que contenía 5mL de medio de transporte (ver anexos) (Shago M., 2016, Chapter 3. Chromosome preparation for Acute Lymphoblastic Leukemia del libro Cancer Cytogenetics) una vez traída la muestra, esta se pasaba en condiciones de esterilidad a un tubo, el cual se centrifugaba a 2500rpm/5 minutos, retirábamos el sobrenadante y se sembraba el pellet en las cajas que contenían el medio de cultivo, a veces se hacía cosecha directa o se dejaba en la incubadora a 37°C y al otro día se realizaba la cosecha, para esta se utilizaba colcemid y como solución hipotónica KCl, pasando el tiempo se centrifugaba a 2500rpm/5min y se hacían la fijación y los lavados correspondientes con la solución Carnoy, cabe mencionar que muchas veces no obteníamos material o al momento de gotear no se lograban ver metafases, estaban

muy cerradas o eran muy escasas (ver Figura 10) lo cual no nos permitía llegar a tener buen material para realizar los siguientes pasos (bando).

Debido a que la primera técnica fue fallida se empezó a experimentar con otros reactivos, así como otros tiempos.

La segunda experimentación consistió en ya no tener un medio de transporte, solo se pedía que, si la muestra era de médula ósea, la jeringa con la que se realizaba la punción tuviera de 0.2 a 0.5mL de heparina, aun así, muchas veces las muestras llegaron coaguladas al laboratorio, una vez en el laboratorio se realizaba la siembra, ya sin centrifugar, solo se colocaban 5mL del medio ya preparado en una caja Falcon y si la muestra se veía concentrada, se le añadía 1mL de muestra a la caja, si se veía muy diluida se añadían de 1.5 a 2mL. Esta vez dependiendo del Diagnóstico que tuviera el paciente, era el tiempo que se dejaba incubando la muestra, en caso de LGC se dejaba la muestra incubada durante 24h, si era LLA se dejaba entre 48- 72h, si era LMA 72hras y si era SDM de 48-72hras. Para la cosecha se utilizó colchicina, solución hipotónica de citrato de sodio y cloruro de potasio, el tiempo que duraba la solución hipotónica, la muestra se resuspendía cuidadosamente con la pipeta, formando un burbujeo, pasando este tiempo se hacía la fijación y los lavados con la solución Carnoy, se empezó a ver que se tenía más material y se encontraban más metafases, pero no siempre estas salían abiertas, los cromosomas tenían las cromátidas abiertas (ver Figura 10.B), o se hacía lo que coloquialmente se conoce como “sopa de cromosomas”, esto sucede cuando varias células explotan y se juntan los cromosomas de varias metafases (ver Figura 10.C), por lo que se empezó a jugar con los tiempos de la hipotónica, con el fin de que se hinchara más la célula y los cromosomas se esparcieran mejor, cabe mencionar que notamos que habían factores que influían en el tiempo en que se debía de dejar la solución hipotónica, uno era el tamaño de botón, la temperatura, la hora en la que se cosechaba la muestra, así que cada muestra tenía diferentes tiempos pero siempre estaba en un rango de entre 12 y 25 minutos. En esta técnica la centrifugación que se hacía era de 1800rpm/8min mientras que en la primera experimentación era de 2500rpm/5min. En la figura 10.D se observan varias

metafasas a 10X, estas están abiertas y los cromosomas son adecuados para su análisis.

Como ya mencionamos, la metodología considerada en este trabajo, en uno de los ensayos para la cosecha de cromosomas, utilizamos colcemid, el cual es un análogo sintético de la colchicina. Ambos destruyen el huso mitótico, inhibiendo la formación de los microtúbulos, deteniendo a las células en metafase.

Una de las razones por la que probablemente no salió con este reactivo, se puede deber a que las dosis y el tiempo de exposición deben ser pequeñas, con el fin de que los cromosomas tengan una longitud media o larga, y nosotros lo utilizamos en mayor cantidad este reactivo. Es por ello que en la segunda metodología comenzamos a utilizar la colchicina, que es más toxica por lo que se retrasa la velocidad del ciclo celular, permitiendo que los cromosomas sean más largos (Arsham M., Barch., *et al* 2017).

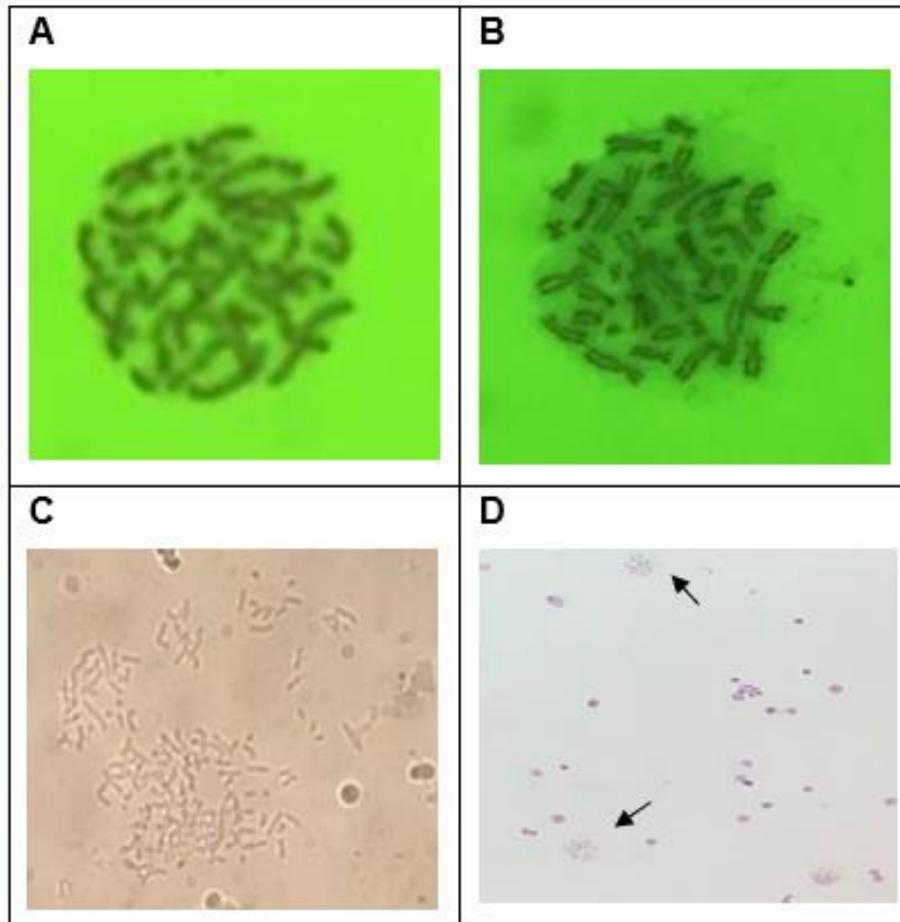


Figura 10. Metafases obtenidas durante la experimentación. A. Metafase cerrada. B. Metafase con cromátides abiertas. C. Cromosomas de varias metafases. D. Metafases abiertas vistas a 10X. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Para el bandeo cromosómico se utilizó la técnica de bandeo G que consistía en poner 7 coplins, donde el primero contenía Solución salina, el segundo solución salina con 1 alícuota de tripsina (2mL), el tercero agua corriente, el cuarto Buffer Wright y Colorante Wright (1:1), el quinto agua corriente, el sexto Buffer A, Buffer B (Ver en preparación de soluciones), colorante Giemsa y agua de la llave, y el ultimo agua corriente. Aquí se jugaba con los tiempos de tripsina, sin embargo, las metafases tenían mucho citoplasma, por lo que también cambiamos a otra técnica, donde se utilizaba Buffer Wright, Buffer Gurr, la tripsina y los colorantes, aquí observamos que los cromosomas tenían menos citoplasma y quedaban mejor bandeados. (ver Figura 11)



Figura 11. Bando G. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

La población de estudio fue de 132 pacientes con diagnóstico de alguna enfermedad hematológica enviada por los Servicios de Oncopediatría y hematología del Hospital Juárez de México, en un periodo de enero del 2018 a diciembre de 2018, 74 de ellos eran mujeres y 58 hombres, con un rango de edad entre 4 y 80 años, la edad media fue de 41.32 años.

Como se menciona en los criterios de exclusión, de estos 132 pacientes, 52 fueron descartados ya que las muestras llegaron coaguladas o la muestra era insuficiente para realizar el cultivo celular. Por lo que solo a los 80 pacientes restantes se les realizaron las pruebas citogenéticas Cariotipo, FISH y PCR.

28 pacientes tuvieron un resultado negativo en la PCR, 8 pacientes tuvieron un cariotipo o FISH con resultado normal, 16 pacientes tuvieron LGC, 10 pacientes LMA, 10 pacientes SMD y 8 pacientes LLA.

Para nuestros datos estadísticos, solamente reportaremos la edad y género de los pacientes con resultado para alguna enfermedad hematológica. Ver cuadro 11

Cuadro 11. Número de casos por edad y género de pacientes con resultado para LGC, LMA, LLA y SMD.

Grupo	Edad	♀	♂	# total de casos
Niños	0-17	3	4	7
Adultos	18-59	12	17	29
Ancianos	60 en adelante	5	2	7
Indefinido	Falta expediente	1	0	1
Total		21	23	44

Pacientes con resultado para LGC, LMA, LLA o SMD. ♀: género femenino, ♂ género masculino.

Como podemos ver en el cuadro 11, 21 de estos pacientes son de género femenino (47.72%), mientras que 23 son pacientes masculinos (52.27%), lo cual coincide con la literatura, ya que en un estudio sobre la epidemiología en leucemias a nivel mundial publicado por Filho, Ferlay, *et al* (2018) mencionan que, en promedio es mayor la incidencia en hombres que en mujeres. (5.6:3.9).

El rango de edad de estos pacientes fue de 5 a 80 años con edad media de 41.62.

Leucemia Granulocítica Crónica

16 pacientes mostraron la t(9;22)(q34;q11.2), de los cuales 5 fueron del género femenino y 11 pertenecieron al género masculino con edad entre 17-66 años con una media de 41.81 años y una desviación estándar de 13.55

En el cuadro 12 se observan las alteraciones obtenidas mediante las pruebas citogenéticas y biología molecular en los pacientes con LGC.

Cuadro 12. Alteraciones obtenidas en pacientes con LGC mediante cariotipo, FISH o PCR.

n	Alteraciones	Cariotipo	FISH	PCR
6	t(9;22)(q34;q11.2)	X	X	√
2	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)	√	X	X
1	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)	√	X	X
1	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),inv(9)(p12q13)	√	X	√
1 129/18	46,XY,t(1;5)(q42;q24),t(9;22)(q34;q11)[12]/ 47,XY,idem,+der(22)[4]/46,XY,idem,-18[4]/ 46,XY,idem,+16,i(17)(q10),-21[3]	√	X	X
1 45/18	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[5]/47,idem,+der(22)[5]/ 47,idem+(8)[3]/47,idem,+der(22),+der(22),- 18[1]/46,XY[1]	√	√	X
1 99/18	FISH: resultados completos en cuadro 13 nuc ish (ABL,BCR)X3(ABL con BCRx2)[162] (ABL,BCR)X4(ABL con BCRX3)[28](ABLx2, BCRX3)(ABL CON BCRx1)[25] /(ABL,BCR)X2 [20]	X	√	√
1 133/18	nuc ish (ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[153] (ABL,BCR)x2[47]	X	√	√
1 80/18	nuc ish (ABL,BCR)X3(ABL con BCRx2)[150]/ (ABL,BCR) X2 [50]	X	√	X
1 53/18	nuc ish (ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[170]/ (ABLx2BCRx3)(ABL con BCRx1)[30]	X	√	X

Pacientes con t(9;22)(q34;q11.2) positiva mediante pruebas citogenéticas convencional o molecular (cariotipo, PCR, FISH). (√ = prueba realizada, X = prueba no realizada). Nomenclatura basada en ISCN 2016. n=número de casos que presentan la alteración.

En la tabla anterior se observa que 6 pacientes solo obtuvieron resultado de la PCR, lo cual nos indica que tienen el Ph+ (cromosoma filadelfia positivo), pero no sabemos si tienen otras alteraciones adicionales, por lo que no sabemos en qué fase de la enfermedad estén estos pacientes, por ello es importante también contar con otros datos de laboratorio como WBC y número de blastos.

En un estudio realizado por Koch, Gebharter., *et al* (2017) se menciona que en la fase crónica hay aumento de leucocitos en sangre periférica, en la fase acelerada hay acumulación de Alteraciones Cromosómicas Adicionales (ACA) y la etapa blástica se caracteriza por aumento de blastos.

Greulich, K., Heinze, B. (2012) mencionan que, en la fase crónica, la cual es asintomática, hay leucocitosis, y ya en etapas más avanzadas como en la fase acelerada están presentes el 15% o más de blastos en SP y en la fase blástica hay 30% o más.

En un estudio publicado en Qin, Jiang., *et al* (2016) mencionan que, hasta la fecha, pocos estudios han evaluado explícitamente el valor pronóstico de los recuentos de glóbulos blancos en la presentación en la LGC sobre la respuesta y el resultado del paciente, aunque la falta de tales evaluaciones podría estar relacionada con los recuentos altos de WBC que se presentan como una característica común de la LGC, lo cual concuerda con los datos obtenidos de nuestros pacientes ya que la mayoría de ellos tenía un alto recuento de leucocitos, la media fue de 174.24×10^3 .

Cariotipo

De 6 pacientes que se logró obtener el cariotipo, 3 de ellos solo presentaron Ph+ (ver Figura 12), uno tuvo adicionalmente la inversión del cromosoma 9, y los 2 restantes tuvieron cariotipos complejos.

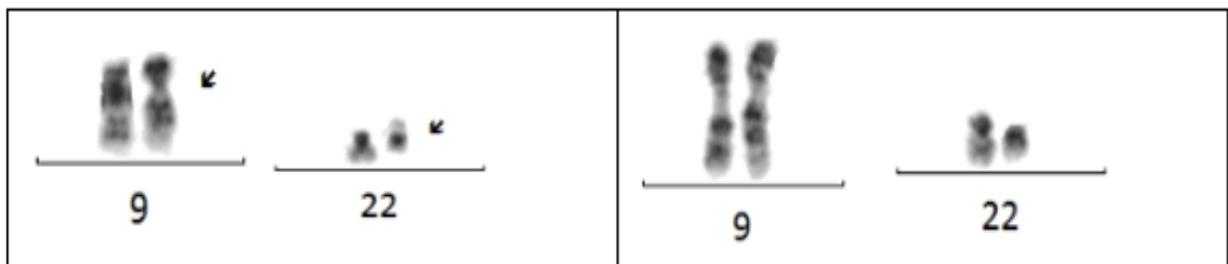


Figura 12. Cariotipo parcial de $t(9;22)(q34;q11.2)$. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Los puntos de rompimiento de nuestro paciente con inversión en el cromosoma 9 (Ver Figura 13) fueron en p12q13, por lo que es una inversión pericéntrica, en un estudio retrospectivo realizado por Lee., Park., *et al* (2010) se menciona que la inversión pericéntrica del cromosoma 9 ocurre en el 0.8 al 2% de la población normal, pero se ha relacionado con infertilidad, aborto recurrente, esquizofrenia y también se ha visto en tumores sólidos, y también se ha evaluado su participación en otros tipos de cáncer como en LLA, LMA, MDS, LMC. Lo que este estudio pretendía era ver si la inv(9) tenía algún efecto en los pacientes con LA, por lo que se vio el efecto de la quimioterapia en pacientes con y sin la inv(9), y se observó que no hubo retraso en la recuperación hematológica. Un estudio más reciente realizado por Wang., Ali., *et al* (2016), menciona que la prevalencia de la inv(9) en la LMC aún no está muy bien estudiada, en este estudio, como en el anterior se pretende saber si la inv(9) se relaciona con la respuesta al tratamiento (Tx) y la supervivencia del paciente por lo que se comparó la supervivencia de los pacientes con LMC con inv(9) y los pacientes con LMC sin inv(9), observando que no había diferencia de supervivencia significativa, además se observó que los pacientes con inv(9) tienen buena respuesta al Tx.

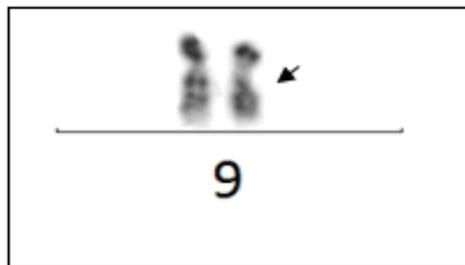


Figura 13. Cariotipo parcial de inv(9)(p12q13). Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Como ya mencionamos la LMC se define por la t(9;22)(q34;q11), esta es la única anomalía en más del 90% de los pacientes en la fase crónica, a medida que la enfermedad va progresando hacia la fase acelerada y fase blástica, la evolución clonal ocurre con la aparición de alteraciones citogenéticas adicionales (ACA).

Wang., Chen., *et al* (2016) mencionan que aproximadamente el 30% de los pacientes en fase acelerada presentan ACA y en la fase blástica el 70-80% de los pacientes los presentan. Mencionan también que los diferentes ACA tienen diferente impacto en la respuesta al Tx y la supervivencia, algunos pueden estar asociados con la progresión de la enfermedad y la resistencia al Tx mientras que otros pueden reflejar la inestabilidad genética inducida por la activación continua de BCR-ABL.

Fabarius., Leitner., *et al* (2011) mencionan que las aberraciones más frecuentes detectadas en la LMC fueron la trisomía 8, un segundo cromosoma Ph y el isocromosoma 17, a los cuales se les denomina de ruta mayor. Algunos ACA como t(3;12), t(4;6), t(2;16) y t(1; 21) se denominaron ACA de ruta menor.

Cabe mencionar que los ACAs se clasifican en “Ruta mayor” y “Ruta menor” de acuerdo a su frecuencia.

Crisan A., Coriu D., *et al* (2015) también mencionan que los ACA de la ruta mayor son la trisomía 8 (34%), segundo cromosoma Ph (30%), el isocromosoma 17 (20%), la trisomía 19 (13%), mientras que los ACA de la ruta menor son la monosomía 7 (5%), monosomía 17(5%), trisomía 21 (7%), pérdida del cromosoma Y (8%).

Los pacientes con anomalías cromosómicas adicionales muestran tasas de respuesta citogenética más bajas con imatinib. Además, se ha informado el peor resultado para los ACA de ruta principal.

En un estudio realizado en la India por Ramachandran., Narayanan., *et al* (2019) se observó que la aparición de ACA se considera distintivo en la progresión de la enfermedad y se asocia con la disminución de la respuesta citogenética al Mesilato de Imatinib. Los sujetos de estudio se dividieron en 4 grupos: los que estaban en fase crónica, fase acelerada, crisis blástica y resistentes al imatinib. De los 443 pacientes con Ph+, 313 estaban en la fase crónica y 30 de ellos portaban ACA, las más frecuentes fueron: +der(22), hiperdiploidía moderada (2n=47-50), cromosomas adicionales distintos a 9 y 22 (+8, +21, +16), además se encontraron 5 alteraciones raras, las cuales fueron una translocación entre 3 cromosomas. De los 38 pacientes

en fase acelerada, 13 presentaron ACA, las más comunes fueron hiperdiploidias moderadas, tetraploidia, trisomía 8, +der(22), y hubo 2 cariotipos nuevos. 51 pacientes estaban en fase blástica y 26 presentaron ACA, los más comunes fueron hiperdiploidía moderada y alta, poliploidía, trisomía (8,9,21),+der(22), perdida de Y, hipodiploidía, y 3 reordenamientos raros. Y de los 66 pacientes resistentes al imatinib, 11 mostraron ACA, los más comunes fueron +der(22), 2 reordenamientos raros. Cabe mencionar que en los 4 grupos de estudio se observaron en varios pacientes +der(22).

Nuestros 2 pacientes con cariotipo complejo también presentaron esta alteración, además de que ambos tuvieron hiperdiploidia moderada, y uno de ellos tuvo un cromosoma 8 adicional, mientras que el otro tuvo un 16 adicional.

En la Figura 14 podemos observar el cariotipo del paciente 129/18 que presentó además del cromosoma Ph+, la t(1;5)(q42;q24), pérdida del cromosoma 18 y ganancia del der(22) (doble cromosoma Ph+), además en otra metafase (ver Figura 15) se observó la adición del cromosoma 16, i(17) (i=isocromosoma), pérdida del cromosoma 21, por lo que comparándolo con el estudio de Ramachandran K., Narayanan., *et al* (2019), Fabarius., Leitner., *et al* (2011) y Crisan A., Coriu D., *et al* (2015) , este paciente presenta ACA, lo cual le confiere pronóstico desfavorable.

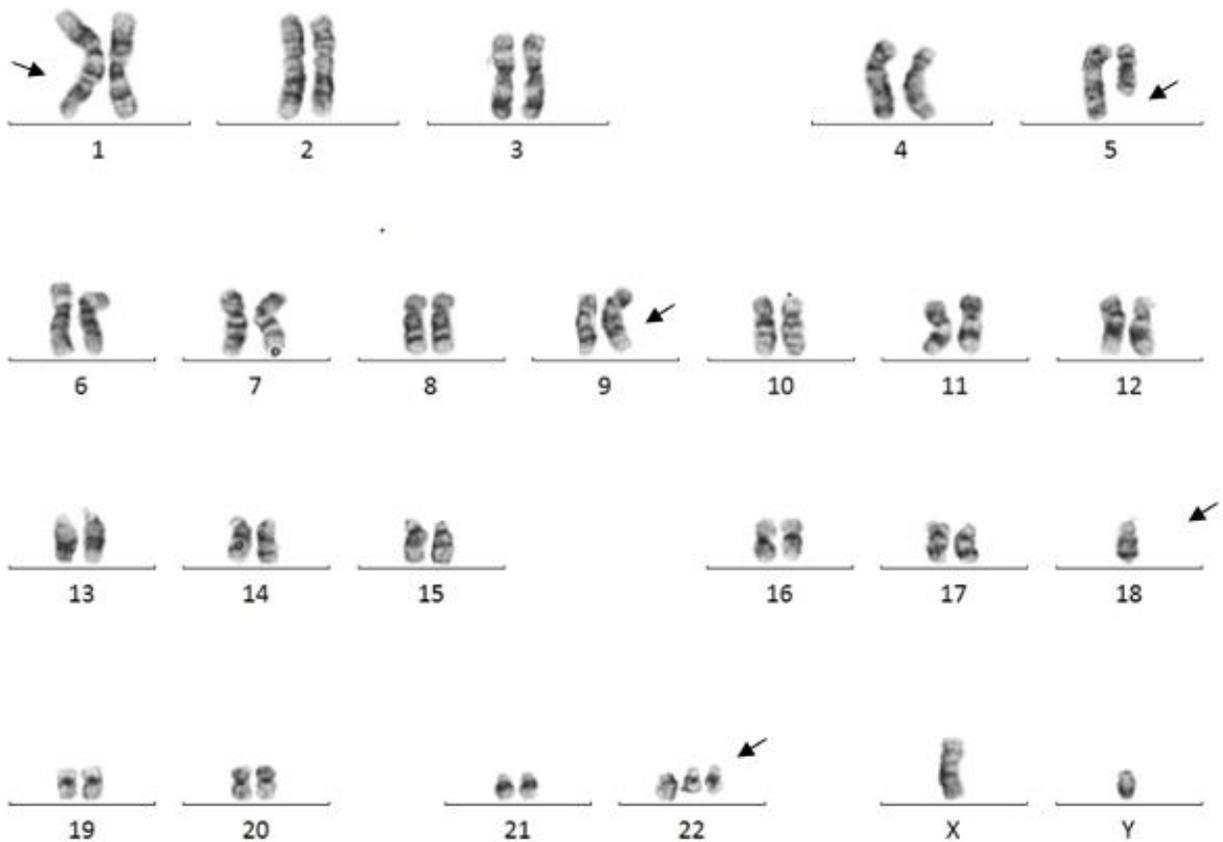


Figura 14. Cariotipo de paciente con ACA.
 46XY,t(1;5)(q42;q24),t(9;22)(q34;q11.2),-18,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2).
 Cariotipo de paciente con LGC (129/18). Mostrando pérdida del cromosoma 18, y translocación entre cromosoma 1 y 5, además el cromosoma Ph. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

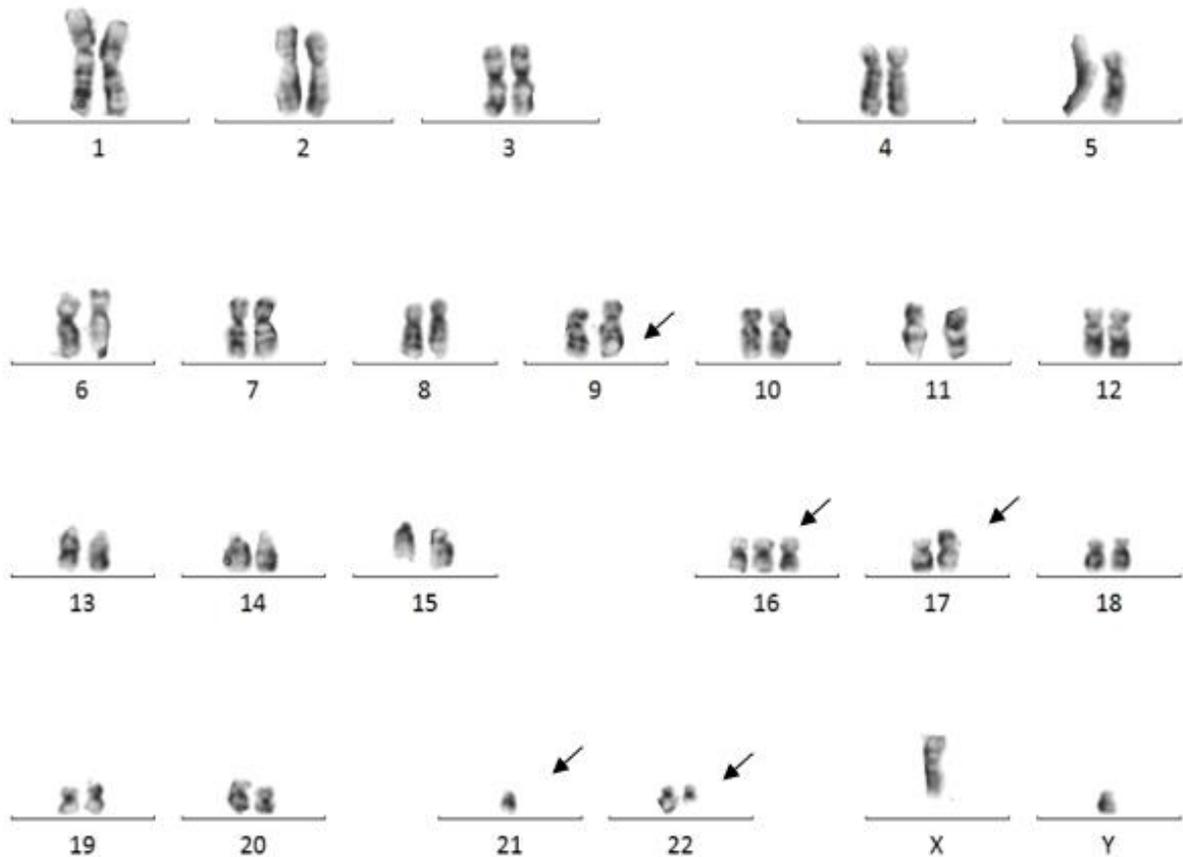


Figura 15. Cariotipo de paciente con ACA. $46,XY,t(9;22)(q34;q11.2),+16,i(17)(q10),-21$. Cariotipo de paciente con LGC (129/18), mostrando copia adicional de cromosoma 16, pérdida de cromosoma 21 y el cromosoma Ph. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Los puntos de rompimiento de la $t(1;5)(q42;q24)$ no se han reportado en estudios previos, por lo que se piensa que es un nuevo reordenamiento, sin embargo, en otros estudios como el de Sarrantonio, Rotoli., *et al* (1999) menciona que la leucemia eosinofílica crónica (CEL) es un trastorno hipereosinofílico caracterizado por anomalías citogenéticas clonales, incluyendo trisomía del cromosoma 8, 10 o 15, monosomía de cromosoma 7, pérdida del cromosoma Y o traslocaciones, siendo las más frecuentes aquellas que involucran el brazo largo del cromosoma 5 con una serie de otros cromosomas como 1, 2, 3, 12, 14 y 16, aunque el punto de ruptura en el cromosoma 5 siempre estuvo en la región q31-q33. Por otro lado, Wilkinson, (2003) menciona que la eosinofilia es común en varios trastornos mieloproliferativos (MPD), en particular en la LMC, y que una de las causas se asocia con la banda

cromosómica 5q31-33 que se dirige al gen *PDGFRB*. En este estudio realizado, de los MPD con eosinofilia, un subgrupo presentó la t(1;5)(q23;q33) y se observó que esta translocación es poco frecuente además de que se puede llegar a una remisión completa con imatinib.

Además de las alteraciones ya mencionadas, el paciente 129/18 también presentó i(17)(q10), Sheth, *et al* (2006) menciona que es la alteración más frecuente observada en la crisis blástica de la LMC, debido a que se elimina el brazo corto del cromosoma 17, también se ha centrado la atención en el gen TP53, ya que debido a la mutación y/o eliminación se consideran importantes en el desarrollo de neoplasias hematológicas. Por otro lado, Barbouti., Stankiewicz., *et al* (2004) menciona que la frecuencia promedio de i(17q) como anormalidad cromosómica única o adicional en carcinomas y neoplasias hematológicas malignas es de aproximadamente el 3%, y que en las neoplasias hematológicas se considera con pronóstico adverso y que aquí se presenta en aproximadamente el 21% de los casos además de la t(9;22)(q34;q11.2).

Wang., Chen., *et al* (2016) menciona que reordenamientos como i(17)(q10), y -7 pueden desencadenar e impulsar progresión de la enfermedad y la resistencia al Tx.

El paciente 45/18 con el cariotipo mostrado en la Figura 16 que además de presentar 2 copias adicionales del der(22) o Ph+, también presenta la pérdida del cromosoma 18. Y en la Figura 17 podemos observar la trisomía del cromosoma 8, como clona adicional.

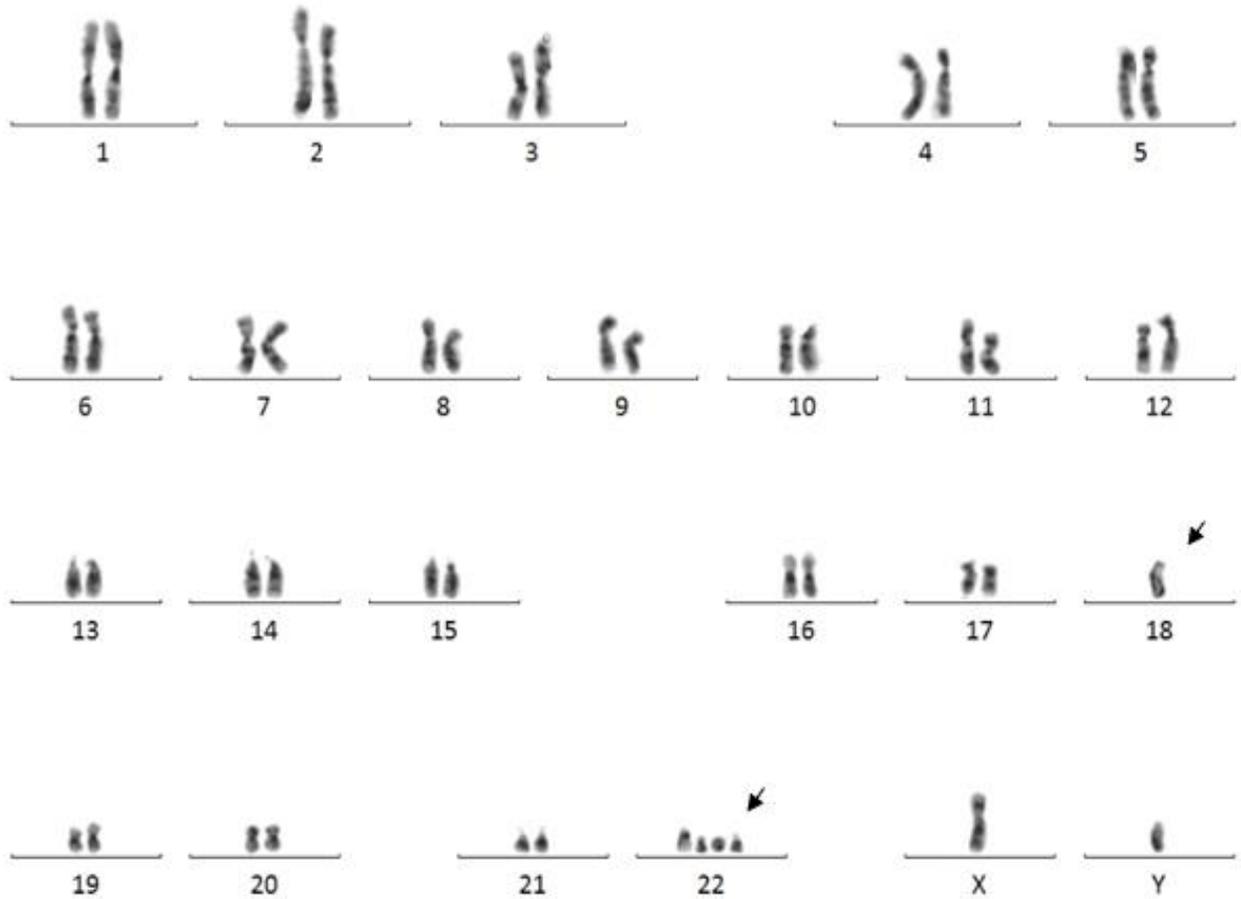


Figura 16. Cariotipo de paciente con ACA. $47,XY,t(9;22)(q34;q11.2),-18,+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)x2$. Cariotipo de paciente con LGC (45/18). Mostrando la $t(9;22)$, a copias adicionales del der(22), Perdida de cromosoma 18. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

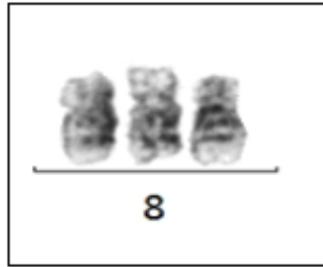


Figura 17. Cariotipo parcial de paciente con LGC mostrando trisomía 8. Cariotipo parcial de paciente (45/18) Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Wang., Chen., *et al* (2016) menciona que en un estudio pasado se mostró que la +8 se produjo en ~ 30% de los pacientes con LMC que desarrollaron ACA y, a menudo, coexistió con otros ACA, al centrarse en pacientes con +8 aislada, es decir, sin otros ACA, se encontró que los pacientes con la +8 tuvieron un mejor pronóstico que los que tenían otros tipos de ACA, pero con un pronóstico peor que el de los pacientes que no presentaron ningún ACA. Pero en este estudio no se estratificó que tanto afectaba la +8 al momento del Dx o si esta alteración aparecía durante la terapia, por lo que se realizó un estudio a 37 pacientes que presentaron la +8 como única ACA, 6 de ellos tenían +8 al momento del Dx y 31 pacientes desarrollaron +8 durante la terapia. También se probó si el tamaño de los clones +8, está asociado con diferentes respuestas de tratamiento y supervivencia, para esto se dividieron los casos en 2 grupos, en el grupo A los pacientes tenían $\leq 20\%$ de células con +8, y el Grupo B con 42% con +8. Y se observó que no hubo diferencias significativas entre estos dos grupos en la respuesta al tratamiento, su conclusión fue que la aparición de +8 en pacientes con LMC puede ser únicamente un evento secundario que refleja la inestabilidad genética general inducida por el BCR-ABL persistente, y que el peor pronóstico asociado con la trisomía 8 se puede atribuir a la presencia de otros ACA.

En un estudio realizado por Wang., Cortes., *et al* (2015) de 610 casos con ACA, 183 tuvieron trisomía 8, 41 de ellos solo presentaron esta alteración (grupo A) y 142 presentaron otros ACA (grupo B). En el grupo A, la trisomía 8 surgió en la fase crónica y se asoció a buena respuesta al Tx, mientras que en el grupo B surgió en

la fase acelerada además de que tuvieron una respuesta más baja al Tx. Cabe mencionar que en ambos estudios solo se contemplaron a los pacientes con el cromosoma Ph+, de no presentarlo, no se consideraba que tuvieran ACA.

Nuestro paciente (45/18) además de mostrar la trisomía 8 también presentó duplicación der(22), así como la pérdida del cromosoma 18, pero no se sabe si este paciente era de *novο* o había empezado el Tx con mesilato de imatinib, pero como lo mencionan los autores, aun con la trisomía 8 se puede tener una buena respuesta al Tx, aunque como presenta también 2 copias adicionales del der(22), puede no tener una respuesta satisfactoria.

FISH

A 8 pacientes se les realizó FISH interfásico con las sondas BCR/ABL (Vysis, USA, doble fusión), 5 pacientes presentaron el punto de ruptura en la región mayor (M-bcr) (ver Figura 18.B), mientras que en 3 pacientes lo presentaron en la región de ruptura menor (m-bcr) (Ver Figura 18.C). Es importante recordar que la LMC y la LLA se caracterizan por la $t(9;22)(q34;q11)$, pero en la LMC el punto de ruptura en el gen BCR se encuentra la región principal del grupo de puntos de ruptura (M-bcr) correspondiente a la proteína p210, mientras que en la LLA positiva para BCR-ABL1 los puntos de ruptura se sitúan en m-bcr. (Balducci, E., Loosveld, M., et al 2017).

Azaad., *et al* (2018) menciona que el punto de ruptura mayor se observa en un 95% de los pacientes con LMC.

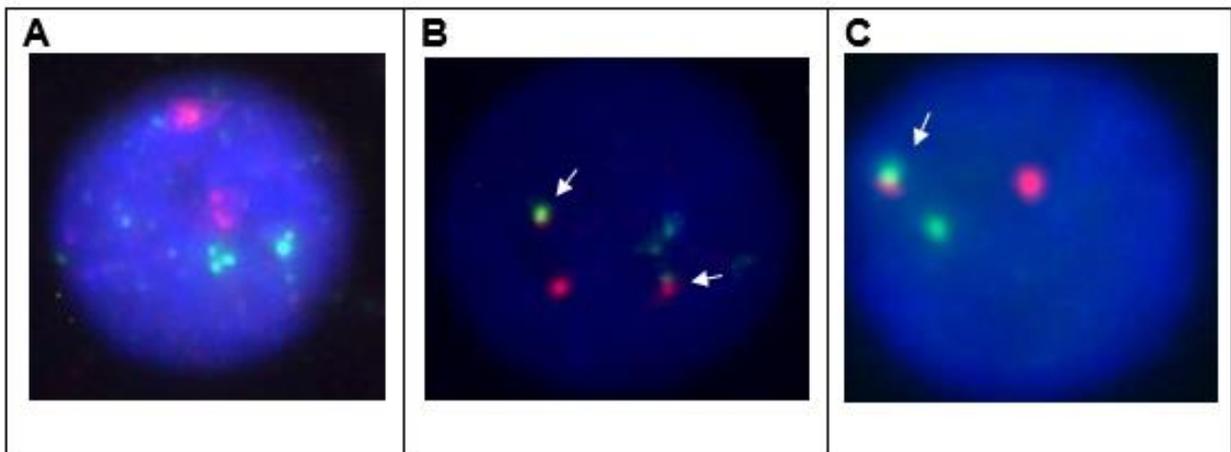


Figura 18. FISH interfásico de paciente con LMC. (BCR/ABL). A. se observan 2 señales rojas y 2 verdes, lo que indica que no hay ninguna translocación. B. Se observan 2 señales fusionadas y 2 señales normales; una roja y una verde (M-bcr). C. Se observa 1 señal fusionada, 1 señal roja y una señal verde (m-bcr). ABL:señal roja, BCR:señal verde. (Marca comercial Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe) Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM. (señal fusionada marcada con flecha)

En el Cuadro 13 están los 5 pacientes que muestran M-bcr en la mayoría de los núcleos.

Cuadro 13. Alteraciones obtenidas en pacientes con LCG mediante FISH.

# caso	Alteraciones
45/18	nuc ish(ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[70]/(ABLx2,BCRx3)(ABL con BCRx1)[37]/(ABLx2,BCRx4)(ABL con BCR)x1[28]/(ABL,BCR)x2(ABL con BCRx2)[2]/(ABLx3,BCRx4)(ABL con BCRx1)[2]/(ABLx2,BCRx3)(ABL con BCRx2)[2]/(ABLx3,BCRx4)(ABL con BCRx2)[2]/(ABL,BCR)x4(ABL con BCRx3)[1]/(ABL,BCR)x2(ABL con BCRx1)[1]/(ABLx2,BCRx4)(ABL con BCRx2)[1]/(ABLx1,BCRx4)[1]/(ABL,BCR)x3 [1]/(ABL,BCR)x2[49]
53/18	nuc ish(ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[170]/(ABLx2BCRx3)(ABL con BCRx1)[30]
80/18	nuc ish(ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[150]/(ABL,BCR) x2 [50]
99/18	nuc ish(ABL,BCR) x3 (ABL con BCRx2)[155] /(ABL,BCR)x4 (ABL con BCRx3)[28]/(ABLx2,BCRx3)(ABL1 con BCRx1) [25]/(ABL,BCR)x2 [20]
133/18	nuc ish(ABL,BCR)x3(ABL con BCRx2)[153] /(ABL,BCR)x2[47]

*La sonda utilizada BCR/ABL. (Marca comercial Vysis LSI Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe).

Los pacientes 80/18 y 133/18, solo muestran 2 clonas, la alterada con el rompimiento M-bcr y la normal, mientras que el paciente 53/18 además de presentar el rompimiento mayor, también presenta una clona donde pierde ABL, el paciente 99/18 presenta la clona con el rompimiento mayor, la clona normal, la clona donde pierde un ABL y la clona donde gana un ABL y un BCR.

El paciente 45/18 fue el que tuvo mayor número de clonas (13 clonas diferentes), lo cual lo hizo más complicado el analizar, por lo que se realizó una tabla donde se pueden observar las distintas clonas obtenidas. (ver Cuadro 14). La clona principal es la alterada con M-bcr, pero también se observan pérdidas o ganancias de ABL y BCR.

Cuadro 14. Clonas obtenidas del paciente 45/18 mediante FISH.

Clonas de paciente 45/18
nuc ish (ABL,BCR)x3 (ABL con BCRx2)[70]
nuc ish (ABLx2,BCRx3) (ABL con BCRx1)[37]
nuc ish (ABL,BCR)x3 [1]
nuc ish (ABL,BCR)x2 [49]
nuc ish (ABLx2, BCRx4) (ABL con BCRx1)[28]
nuc ish (ABLx1,BCRx4) [1]
nuc ish (ABLx2,BCRx4) (ABL con BCRx2)[1]
nuc ish (ABL, BCR)x2 (ABL con BCRx2)[2]
nuc ish (ABL,BCR)x2 (ABL con BCRx1)[1]
nuc ish (ABLx3, BCRx4) (ABL con BCRx1)[2]
nuc ish (ABL,BCR)x4 (ABL con BCRx3)[1]
nuc ish (ABLx2, BCRx3) (ABL con BCRx2)[2]
nuc ish (ABLx3, BCRx4) (ABL con BCRx2)[2]

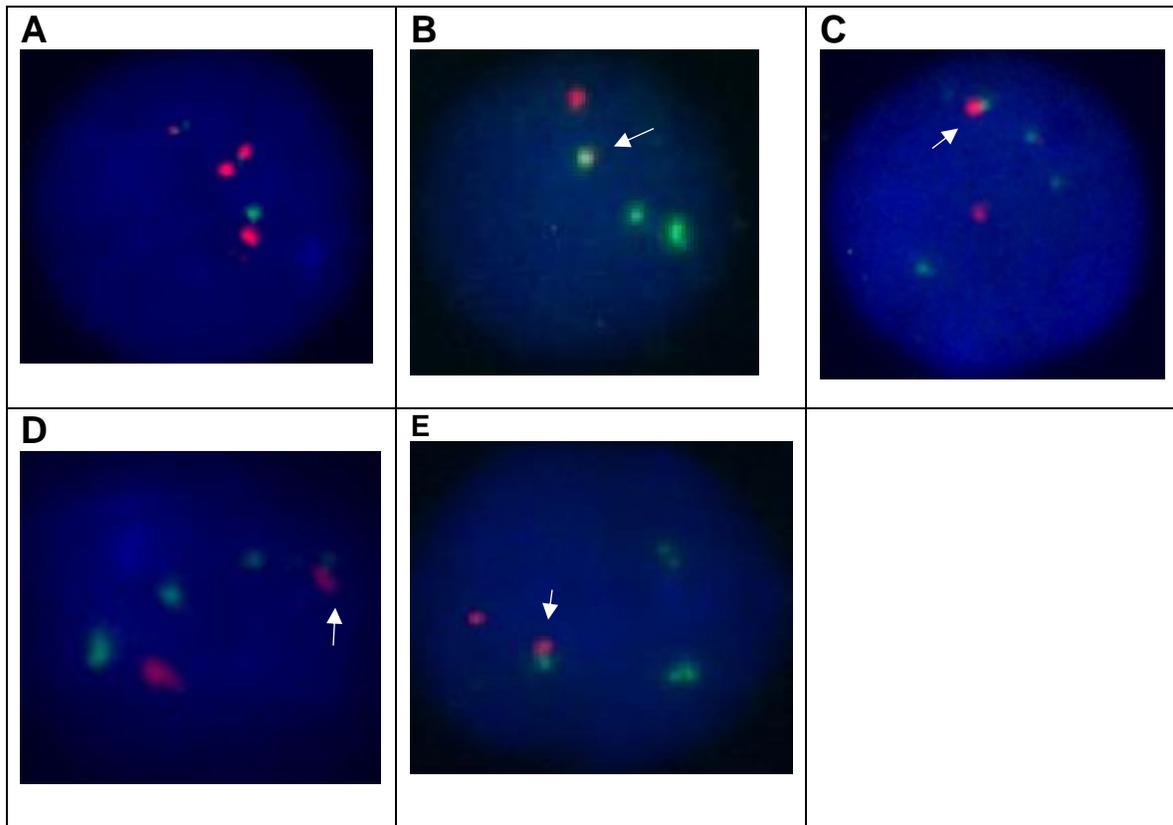


Figura 19. FISH interfásico de paciente con LMC. (BCR/ABL). A. Se observan 4 señales rojas y una señal verde. B. Se observa 1 señal roja, 2 señales verdes y una señal fusionada. C. Se observan 1 una señal roja, 3 señales verdes y una señal fusionada. D. Se observa una señal roja, 3 señales verdes y una señal fusionada. E. Se observa una señal roja, 2 señales verdes y una señal fusionada. ABL:señal roja, BCR:señal verde. (Marca comercial Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe) Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM. (señal fusionada marcada con flecha)

Es importante complementar el análisis con otro tipo de técnicas como: PCR, FISH y citogenética para dilucidar las alteraciones adicionales, debido a que, como ya se mencionó anteriormente, el cromosoma BCR tiene 3 puntos de ruptura, formando proteínas de distinto peso que conllevan a distintos tipos de leucemia. Por lo que el saber mediante el cariotipo que existe el cromosoma Ph+, no basta, se necesita conocer el punto de ruptura, ya sea mediante FISH o PCR.

Además, en un estudio realizado por Balducci., Loosveld., *et al* (2017) se menciona que el 10% de los pacientes con LMC no muestran cromosoma Ph+ en el cariotipo, pero el reordenamiento de BCR-ABL1 es positivo por FISH debido a una inserción submicroscópica de 9q34 - ABL1 dentro de 22q11 - BCR, lo que se conoce como LMC negativa.

Farhat., Habbal., *et al* (2016) realizó un estudio a pacientes con la $t(9;22)(q34;q11.2)$, utilizando distintos primers para los puntos de ruptura y encontró que la transcripción encontrada con mayor frecuencia fue b2a2, seguida de b3a2, b3a3 y e1a3. Esto porque es importante saber el transcrito BCR-ABL ya que se puede asociar con el pronóstico de la enfermedad. En algunos estudios encontró que la transcripción de b3a2 asociada con un peor pronóstico que la transcripción de b2a2.

Leucemia Mieloide Aguda

En la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) existen diversas alteraciones citogenéticas, unas de las más comunes son la t(8;21)(q22;q22), la t(15;17)(q24;q21) y la inv(16)(p13.1q22). En este trabajo 10 pacientes presentaron alguna de estas 3 alteraciones.

7 de estos pacientes fueron del género masculino mientras que los 3 restantes fueron del género femenino, con un rango de edad entre 15-71 años, con una edad media de 27.11 y una desviación estándar de 15.04

En el Cuadro 15 se observa que mediante las pruebas de citogenética molecular y convencional, 2 pacientes tuvieron la t(8;21), 6 la t(15;17) y 2 la inv(16).

Cuadro 14. Alteraciones obtenidas en pacientes con LMA mediante, cariotipo, FISH y PCR.

n	Alteraciones	Cariotipo	FISH	PCR
1	inv(16)(p13.1q22)	X	X	√
1	46,XX,inv(16)(p13.1q22) [7]/ 46,XX [2]	√	X	√
1	t(8;21)	X	X	√
1	46,XY,t(8;21)(q22;q22)	√	X	X
4	t(15;17)	X	X	√
1	46,XY, t(15;17)(q24;q21)/46,XY	√	X	√
1	nuc ish (PMLx3,RARAx3)(PML con RARA)[200]	X	√	√

Pacientes con alteraciones recurrentes en LMA mediante pruebas citogenéticas convencional o molecular (cariotipo, PCR, FISH). (√ = prueba realizada, X = prueba no realizada) Nomenclatura basada en ISCN 2016. n= número de casos que presentan la alteración.

Lo reportado por Arroyave., Röthlisberger., *et al* (2017), menciona que la LMA citogenéticamente caracterizada por la t(8;21) (ver figura 20) y la inv(16) que generan los genes de fusión RUNX1-RUNX1T1 y CBFB-MYH11. Se ha encontrado que t(8;21) está asociado con el subtipo M2 de LMA, mientras que CBFB-MYH11 se ha relacionado con el subtipo M4Eo de LMA.

Aunque Pulikkan y Castilla (2018) mencionan que en la mayoría de los casos la inv(16) se clasifica como M4-Eo pero que en raras ocasiones también se clasifica como M0, M1, M2 y M5 de LMA.

Estas 2 alteraciones mencionadas representan del 15-20% de los casos de LMA de novo en adultos, predominantemente en pacientes más jóvenes, aunque la revisión menciona que los que tienen la inv(16) son mayores que los que presentan la t(8;21), por lo que nuestros datos concuerdan con la literatura debido a que los 2 pacientes que presentaron la inv(16) tienen 49 y 71 años mientras que los que presentaron la t(8;21) tienen 32 y 33 años. También se menciona que los pacientes que presentan la t(8;21) a menudo tienen un mayor recuento de glóbulos blancos y mayor porcentaje de blastos en MO, los resultados de la Biometría Hemática (BH) no fueron valorables.

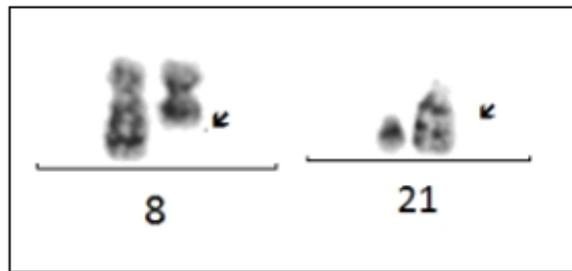


Figura 20. Cariotipo parcial de t(8;21)(q22;q22). Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Arroyave, Röthlisberger., *et al* (2017) mencionan que la translocación equilibrada entre el brazo largo del cromosoma 15, con un punto de ruptura en 15q24, y el brazo largo del cromosoma 17, con un punto de rotura en 17q21, (ver Figura 21) que lleva a la formación del gen quimérico PML-RAR α es el sello de la Leucemia Promielocítica Aguda (APL) y que está presente en aproximadamente el 98% de los casos, lo que concuerda con nuestros resultados ya que 6 de nuestros 10 pacientes tienen esta alteración citogenética.

La proteína PML-RAR α permite una proliferación celular anormal y bloquea la diferenciación de los glóbulos blancos en la etapa de promielocito. Como resultado, el exceso de promielocitos se acumula en la médula ósea y los glóbulos blancos normales no pueden formarse, lo que lleva a una APL.

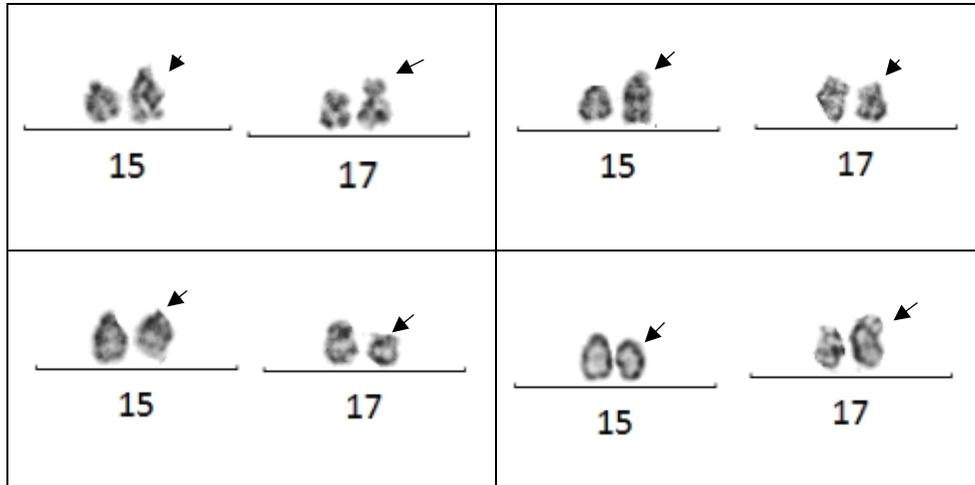


Figura 21. Cariotipo parcial de paciente con LMA mostrando $t(15;17)(q24;q21)$. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

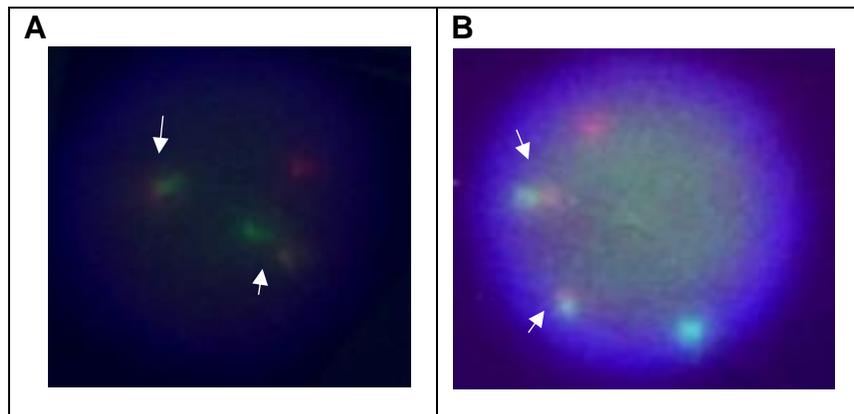


Figura 22. FISH interfásico de paciente con LMA (PML/RARA). Se observan 2 señales fusionadas, una señal roja y una señal verde. (Marca comercial Vysis LSI PML/RARA Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe).

Cruise, (2017) menciona que el Dx de LMA requieren blastos iguales o superiores al 20%. Por lo que se requieren tinciones inmunohistoquímicas, especialmente cuando no se puede obtener un aspirado de médula ósea o se hemodiluye. Se menciona que CD117 generalmente se limita a la AML mientras que CD34 puede verse tanto en la AML como en la ALL, pero en general es una expresión más

limitada, ya que solo está presente en aproximadamente el 50% de los casos de AML, CD7 puede expresarse en aproximadamente 10 a 20% de la LMA y CD2 a menudo se expresa en APL.

En el cuadro 16 podemos observar el inmunofenotipo de las 3 alteraciones encontradas en la experimentación.

Cuadro 15. Inmunofenotipo en alteraciones genéticas de LMA. Tomado y modificado de Cruise M., 2017.

LMA con alteraciones genéticas recurrentes	Inmunofenotipo
LMA con inv(16)(p13.1q22),CBFB-MYH11	a menudo población de explosión múltiple, CD34, CD117, CD2, CD13, CD33, CD15, MPO, CD14, CD4, CD68
LMA con t(8;21)(q22;22);RUNX1-RUNX1T1	CD34, HLA-DR, MPO, CD13, CD33, CD15, Tdt
APL con t(15;17)(q24;q21);PML-RARA	CD34, CD33, CD13, CD117, HLA-DR

Debido a que como ya se mencionó antes, no todos los pacientes cuentan con los datos requeridos como % de blastos, WBC o Inmunofenotipo, es importante saber que en la clasificación de la OMS de neoplasias mieloides y leucemia aguda, se reconoce una entidad específica llamada "LMA con anomalías genéticas recurrentes", donde podemos encontrar la t(15;17), la t(8;21) y la inv(16), las cuales son suficientes para el Dx de LMA independientemente del % de blastos en SP o MO. (Arroyave, J., Röthlisberger., et al 2017)

De los 10 pacientes, solo uno contaba con inmunofenotipo, este tuvo la inv(16) y expreso CD14, CD13, CD36, CD33 y CD117, que coincide con el inmunofenotipo expresado para pacientes con inv(16) que se muestra en el cuadro 16.

Arroyave., Röthlisberger., et al (2017) menciona que los pacientes que presentan la t(8;21), t(15;17), inv(16) y t(16;16) pertenecen a un grupo de riesgo favorable y que pueden llegar a tener una tasa de remisión del más del 90% y una supervivencia general del 60%.

Síndromes mielodisplásicos

Los Síndromes mielodisplásicos (SMD) presentan alteraciones cromosómicas que pueden aparecer en otro tipo de enfermedades hematológicas, pero varios autores mencionan alteraciones comunes en los SMD, una de ellas es la deleción intersticial del cromosoma 5 del brazo largo [del(5q)] que se encuentra en aproximadamente el 15% de los casos, la deleción del cromosoma 7 en el brazo largo [del(7q)] o la monosomía del cromosoma 7 (-7) que se encuentran en el 10% de los casos, así como la trisomía del cromosoma 8. Nybakken y Bagg (2014), mencionan que hay otras alteraciones como la deleción del cromosoma 13 del brazo largo [del(13q)], monosomía del cromosoma 13 (-13), deleción del cromosoma 17 del brazo corto [del(17p)], monosomía del cromosoma 17 (-17), isocromosoma 17 [i(17q)], deleción del cromosoma 11 del brazo largo [del(11q)], deleción del cromosoma 12 del brazo corto [del(12p)] y que para considerarlo como SMD se necesita tener menos del 1% de blastos en sangre periférica y menos del 5% en MO. Es por esta razón que, debido a que nuestros pacientes no presentaron otra alteración indicativa de LLA, LMA o LGC y tuvieron poco porcentaje o nada de blastos, los agrupamos dentro de la categoría de SMD.

De los 10 pacientes a los que se les realizó el cariotipo, 2 tienen una deleción en el cromosoma 3, 4 de ellos presentaron una deleción en el cromosoma 7, y 2 la pérdida completa de este cromosoma, además de que uno tuvo un marcador, así como la pérdida del Y, y un paciente tuvo deleción en el cromosoma 11 (ver cuadro 17) lo cual se asocia con el SMD.

Cuadro 16. Alteraciones obtenidas mediante cariotipo en pacientes con MDS mediante cariotipo.

n	Alteraciones	Cariotipo
1	46,XY,del(3)(q25) [5]/46,XY	√
1	45,X,del(3)(q24) [2]/45,XX,-22[3]/46.XX	√
4	46,XX, del(7)(q31q36)	√
2	45,XX,-7	√
1	45,X[9]/46,X,+mar [7]/46,XY[4]	√
1	46,XX,del(11)(q13;q23)	√

(√ = prueba realizada) Nomenclatura basada en ISCN 2016. n=número de casos que presentaron la alteración.

8 de estos pacientes eran de sexo femenino, mientras que solo 2 eran del género masculino, lo cual no concuerda con la literatura ya que, en todos los estudios revisados, los autores mencionaban que predominaban los hombres en relación 2:1. Carnot U., en su manual de prácticas médicas de SMD indica que esto se puede deber a que como esta enfermedad ocurre frecuentemente en ancianos, la prolongación de vida es más alta en los hombres que en las mujeres. La edad de nuestros pacientes está en el rango de 16 a 80 años de edad, con una media de 57.2 y una desviación estándar de 17.5, cabe mencionar que solo 1 paciente tenía 16 años mientras que los otros tenían entre 46 y 80 años. Nybakken y Bagg (2014) dicen que el 85% de los casos se diagnostica después de los 60 años y que la edad promedio al momento del Dx es de 76 años, pero que también se reconocen como causas de insuficiencia de la médula ósea en el entorno pediátrico.

Shahjahani., Hadad., *et al* (2019) menciona que el 30% de MDS de *novo* están asociados con cariotipos complejos en el Dx inicial. Estudios revelaron que las alteraciones cromosómicas más frecuentes además de las ya mencionadas por Nybakken y Bagg (2014) en el Síndrome mielodisplásico secundario o por tratamiento (t-SMD) son derivativo del cromosoma 21 del brazo largo [der(21q)], derivativo del cromosoma 12 del brazo largo [der(12q)], translocación entre el cromosoma 1 y 7 [t(1;7)], derivativo del cromosoma 17 del brazo largo [der(17q)], derivativo del cromosoma 3 del brazo largo [der(3q)] y monosomía del cromosoma 18 (-18), también menciona que cada anomalía cromosómica en SMD está asociada con un pronóstico diferente; por ejemplo, del (5q) y del(7q) se considera de pronóstico favorable. También se observó que a mayor número de alteraciones independientes en pacientes con SMD tienen peor pronóstico. Esta información queda corroborada con el cuadro N°18 de Nybakken y Bagg (2014), donde podemos observar el pronóstico de las alteraciones ya mencionadas y la frecuencia con la que ocurren.

Cuadro 17. Pronóstico de alteraciones citogenéticas en MDS de novo. Tomada y modificada de Nybakken G., y Bagg A., 2014.

Pronóstico	Alteración citogenética	Frecuencia (%)	Supervivencia media (años)
Muy bueno	-Y, del(11q)	4	5.4
Bueno	Normal, del(5q),del(12q), del(7q)	72	4.8
intermedio	+8, +19, i(17q)	13	2.8
Malo	-7, inv(3) o t(3q), complex (3 alteraciones)	4	1.5
Muy malo	Complex (>3 alteraciones)	7	0.7

2 pacientes tuvieron del(3q), uno presento el rompimiento en la banda 24 y el otro en la 25 (ver Figura 23), ningún autor se enfocó en las deleciones del cromosoma 3 en SMD, pero en un estudio publicado por Lawce, Olson., *et al* (2017) menciona que 1 muestra mostro la del(3)(q13q25), mientras que otra mostro la del(3)(q22q25), este estudio se enfocaba en la inv(3) y la t(3;3)(q13;q25) asociado con la expresión del regulador de células madre (MECOM o EVI1).

El gen MECOM se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3, en la posición 26.2, y la proteína codificada es un regulador transcripcional y una oncoproteína que puede estar involucrada en la hematopoyesis, apoptosis, desarrollo, diferenciación y proliferación celular (NCBI, 2019).

Bellomo, Parlier., *et al* (1992) vieron que se han notificado defectos de 3q en las bandas q21 y q26 en más de 70 casos de leucemia no linfocítica aguda (ANLL), SMD y trastorno mieloproliferativo (MPD) en crisis de blastos.

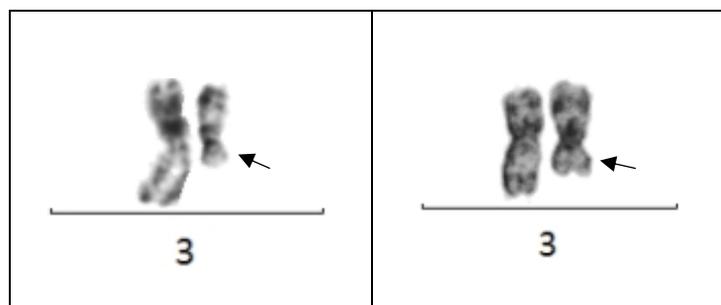


Figura 23. Cariotipo parcial mostrando del(3)(q24). Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

2 de nuestros pacientes tienen además la pérdida de cromosomas sexuales, Shahrabi, Khodadi., *et al* (2017) mencionan que la pérdida de los cromosomas sexuales (SCL) se aplica a la pérdida del cromosoma X (LOX) en mujeres o pérdida del cromosoma Y (LOY) en hombres, y que ocurre generalmente en personas mayores. La asociación de SCL se trata como ACA y se ha observado en LMA, LMC, LLA, LLC y MDS. Cabe mencionar que uno de nuestros pacientes es hombre y la otra mujer, en este estudio mencionan que LOY es común en SMD, mientras que LOX es raro, pero que pueden indicar la pérdida de genes específicos que pueden contribuir a la patogénesis y que el papel de estos genes regulan el ciclo celular.

Como ya se mencionó, la pérdida completa del cromosoma 7 o la del(7q) (ver Figura 24) es una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en neoplasias mieloides, y se pueden presentar simples o complejas. Pezeshki, Podder., *et al* (2017) menciona que la monosomía aislada puede reflejar su propio proceso de la enfermedad en pacientes adultos con SMD, ya que la pérdida de heterocigosidad para un gen supresor de tumores aumenta la posibilidad de inactivación del alelo restante y disminuye la función protectora contra el cáncer, el autor mencionó otros ejemplos que actúan así y por eso cree que la monosomía del cromosoma 7 actúa con un mecanismo similar, además de que vio que existe evidencia que muestra que la haploinsuficiencia de un gen supresor de tumores puede acelerar la tumorigénesis, otra teoría que propone es la de la regulación de longitud de los telómeros, ya que al alcanzar el límite de desgaste del telómero, puede ocurrir senescencia o apoptosis, menciona que se ha demostrado que el desgaste de los telómeros junto con la mutación somática precede a la monosomía 7 y la acumulación de telómeros cortos da lugar a aneuploidía, lo que puede conducir a la progresión de MDS / AML. Por otro lado, Mourad, Farahat., *et al* (2018), menciona que la pérdida recurrente del material del cromosoma 7 sugiere la existencia de uno o más genes supresores de tumores (TSG) en esa región, y que las pérdidas funcionales de tales genes contribuyen al inicio y/o progresión de la enfermedad, menciona que se han intentado aislar regiones involucradas en -7 y del(7q) para identificar TSG pero que como el tamaño de estas regiones eliminadas es muy

grande y el número de genes en estos segmentos faltantes hacen que la enfermedad no se entienda completamente.

Los pacientes que presentan delección en el cromosoma 7 tienen los puntos de ruptura en q31q36, Mourad, Farahat., *et al* (2018), dice que las eliminaciones de 7q son de longitud variable y que ocurren comúnmente entre 7q22 y 7q36.

Existe un gen localizado en la región 36.1 del brazo largo del cromosoma 7, llamado EZH2, los cambios relacionados con este gen probablemente impiden el control normal de la división celular, lo que permite que las células crezcan y se dividan demasiado rápido o de manera incontrolada y conduzcan al desarrollo del cáncer (NCBI, 2019).

Cabrero, Wei., *et al* (2016) menciona que la localización de este gen sugiere fuertemente que la haploinsuficiencia es el mecanismo subyacente de este fenómeno. De hecho, la haploinsuficiencia de múltiples genes se ha identificado recientemente como contribuyentes a la patogénesis de la MDS y que se cree que las mutaciones de EZH2 están relacionadas con un mal pronóstico.

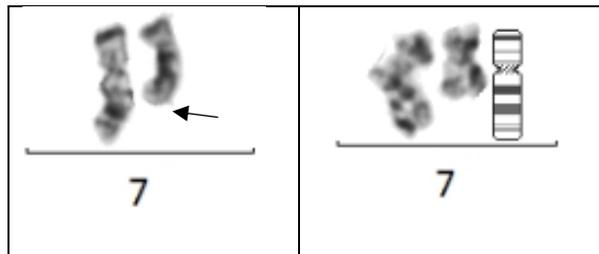


Figura 24. Cariotipo parcial mostrando $del(7)(q31q36)$. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Algunas alteraciones citogenéticas en los SMD ocurren con una frecuencia de menos del 2%, estas incluyen deleciones en el brazo largo del cromosoma 11, las cuales se observan con una frecuencia del 0.6 al 1.1%, de todos los pacientes analizados, solo uno mostro esta alteración (Figura 25). Stengel, Kern., *et al* (2017) menciona que pacientes con SMD y $del(11q)$ como única anomalía muestran un pronóstico muy bueno.

El punto de rompimiento de este paciente fue en q13q23, Dambruso, Boni., *et al* (2017) menciona que la extensión de la eliminación de 11q es bastante variable, y que en la RT-PCR pueden revelarse amplificaciones de la banda 11q23-24 que involucran otros genes potencialmente oncogénicos en lugar del gen KMT2A, este gen se encuentra en q23.3 del cromosoma 11 y codifica un coactivador transcripcional que desempeña un papel esencial en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo temprano y la hematopoyesis.

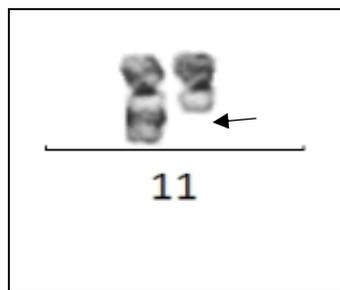


Figura 25. Cariotipo parcial mostrando del(11)(q13q23). Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

Leucemia Linfoide Aguda

La Leucemia Linfoide Aguda (LLA) puede ser de células precursoras B (pre-B) o células precursoras T (pre-T), los 8 sujetos de estudio que se categorizaron en LLA fueron pre-B. Los subgrupos citogenéticos de esta enfermedad son de importancia pronóstica. Shago, (2016) menciona que la hiperdiploidía y la translocación entre la región 13 del brazo corto del cromosoma 12 con la región q22 del brazo largo del cromosoma 21, [t(12;21)(p13;q22)] tienen un pronóstico favorable, mientras que la hipodiploidía, la t(9;22) y los reordenamientos del gen KMT2A(MLL) y iAMP21 tienen un pronóstico adverso.

La LLA afecta tanto a niños como a adultos, de los 8 pacientes, la mitad eran del género femenino y la otra mitad eran del género masculino, el rango de edad estaba entre los 5 y 73 años con una media de 30.12 y una desviación estándar de 25.79. Cao, Yu., *et al* (2018) menciona que hay una prevalencia máxima entre los 2 a 5 años de edad y nuevamente después de los 50 años.

En el cuadro 19 observamos que de los 8 pacientes con LLA, 1 paciente presentó la t(12;21)(p12;q22), 1 paciente la t(1;15)(q10;q25), 3 pacientes presentaron la t(1;19)(q23;p13) y 3 pacientes presentaron el cromosoma Ph+.

Cuadro 18. Alteraciones obtenidas en pacientes con LLA mediante, cariotipo, FISH y PCR.

n	Alteraciones	Cariotipo	FISH	PCR
1	t(12;21)(p12;q22)	X	X	√
1 91/18	47,XX,t(1;15)(q10;q25),+der(15),t(1;15)(q10;q25)[2]/ 46,XX[18]	√	X	X
1	t(1;19)(q23;p13)	X	X	√
1 198/18	46,XX,t(1;19)(q23;p13)[11]/46,XX[15]	√	X	√
1 93/18	46,XX,+der(19)t(1;19)(q23;p13)/46,XX	√	X	X
1 134/18	nuc ish(ABL,BCR)x2(ABL con BCRx1)[6]/ (ABLx2, BCRX2)[194] /(ABLX3,BCRx2) [30]	X	√	X
1 214/18	nuc ish(ABLx3,BCRX2)(ABL con BCRx1)[2]/ (ABLx2,BCRX2)(ABL con BCRx1)[12]/ (ABL,BCR)X2[186]	X	√	X
1 222/18	nuc ish(ABL,BCR) X2 (ABL con BCRx1)[110] / (ABL1X3,BCR X2)(ABL con BCRx1)[13]/ (ABL, BCR)x 2 [77]	X	√	X

Pacientes con alteraciones recurrentes en LLA mediante pruebas citogenéticas convencional o molecular (cariotipo, PCR, FISH). (√ = prueba realizada, X = prueba no realizada) Nomenclatura basada en ISCN 2016. n= número de casos que presentaron la alteración.

En la LLA existen algunas alteraciones citogenéticas que no se pueden ver a través de la citogenética convencional, estas alteraciones reciben el nombre de reordenamientos crípticos y son muy pequeños, para ello, el diagnóstico se realiza por medio de la citogenética molecular, ya sea PCR, FISH, o Microarray. Un ejemplo de este tipo de alteraciones es la t(12;21)(p12;q22) que involucra a los genes ETV6 (TEL) y RUNX1 (AML1), Wang, Tang., *et al* (2015) menciona que el patrón de ruptura principal implica la ruptura dentro del intrón 5 de ETV6 y el intrón 1 de RUNX1 o los patrones de ruptura menor se encuentran en aproximadamente el 10% de ETV6-RUNX1 y se rompe dentro del intrón 5 de ETV6 y el intrón 2 o 3 de RUNX1. Cao Yu., *et al* (2018) menciona que ETV6 es un importante regulador en el desarrollo de células hematopoyéticas y el gen RUNX1 desempeña un papel importante en la hematopoyesis embrionaria definitiva, por lo tanto, la presencia de la proteína de fusión ETV6-RUNX1 en los progenitores de células B parece ser un sello distintivo de los linfoblastos leucémicos, y conduce a un desorden temprano en el desarrollo de linfocitos del linaje B, además en su estudio realizado la

frecuencia de esta fusión fue mayor en niños que en adultos. Nuestro único paciente con esta translocación tenía 5 años, lo cual concuerda con Cao, Yu, *et al* (2018) y con Shago, (2016) ya que mencionan que es la translocación más común en la LLA pre-B pediátrica. La t(12;21)(p12;q22) de nuestro paciente fue detectada mediante PCR, pero es importante que también se le hagan otro tipo de estudios citogenéticos ya que Kjeldsen., (2016) menciona que a pesar de que esta translocación tiene un pronóstico favorable, si se tienen alteraciones secundarias, como copia adicional de der(21)t(12;21) o ganancia de uno o 2 alelos de RUNX1, o eliminación del segundo alelo de ETV6, se tiene un pronóstico adverso.

La t(1;15)(q10;q25) fue detectada en un paciente mediante cariotipo, además podemos observar un der(15),t(1;15)(q10;q25), (ver Figura N°26), en la literatura no encontramos casos reportados con estos puntos de rompimiento, sin embargo algunos autores encontraron esta translocación con otros puntos de rompimiento. Park., *et al* (2007) menciona las translocaciones de brazos completos (WAT) no son comunes en tumores malignos hematológicos, una de estas WAT es la translocación desequilibrada de los brazos largos entre los cromosomas 1 y 15 y que dan como resultado una trisomía 1q completa, en este estudio se observaron 2 casos en LLA, pero también se han reportado en LMA, MDS y anemia aplásica. En un estudio reportado por Misuk, Mina., *et al* (2016) se mencionó sobre los ACA en la LMC, donde un paciente en fase blástica mostró la t(1;15)(q32;p13), pero también el cromosoma Ph+, debido a que la t(1;15) se informó previamente como posible alteración constitucional, el autor pensó que quizá podría considerarse primero, pero para descartar que fuera una alteración constitucional, se le administró al paciente durante 3 meses inhibidores de tirosina quinasa, desapareciendo el Ph+ y la t(1;15), el autor menciona otros ejemplos observados en la literatura de casos donde se obtuvo la t(1;15), todos con puntos de ruptura distintos, ya sea en el brazo corto o largo de ambos cromosomas, pero ninguno de ellos concuerda con los puntos de ruptura obtenidos en este trabajo, además de que todos tienen la t(9;22)(q34;q11), así como otro tipo de ACAs. Por último, en el artículo publicado por Kjeldsen., (2016) se encontró que, en un paciente positivo para la t(12;21), al momento de hacer el cariotipo se encontró del(1)(p22p13) y del(15)(q15) y en un

análisis de aCGH basado en oligo se revelaron reordenamientos que involucran a los cromosomas 1 y 15 describiéndose como $der(1),del(1)(p13.1p31.1)t(1;15)(q42;q15)$, este autor buscó en las bases de datos como Mitelman y PubMed más casos parecidos pero no encontró alteraciones similares en la $t(12;21)$, sin embargo pudo encontrar 1 caso con la $t(1;15)(q42;q15)$. Como ya mencionamos antes, no se encontraron los mismos puntos de ruptura que tuvo nuestro paciente con los de la literatura, descartamos que sea LMC porque ninguna metafase presentó el cromosoma Ph+.

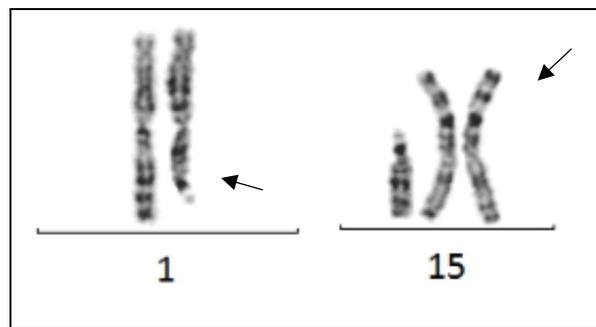


Figura 26. Cariotipo parcial mostrando $+der(15)t(1;15)(q10;q25)$. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

La $t(1;19)(q23;p13)$ [ver Figura N°27] da como resultado la fusión del gen PBX1 en 1q23 con el gen EA2 en 19p13.3. El gen PBX1 codifica una proteína nuclear que pertenece a la familia homeobox de PBX de factores transcripcionales, el gen EA2 (TCF3) codifica un miembro de la familia de proteínas E (clase I) de factores de transcripción hélice-bucle-hélice. Las proteínas E desempeñan un papel crítico en la linfopoyesis y la proteína codificada es necesaria para el desarrollo de linfocitos B y T. La eliminación de este gen o la actividad disminuida de la proteína codificada puede jugar un papel en las neoplasias malignas linfoides (NCBI,2019).

Shabsovich, Tirado., *et al* (2015) menciona que se observa en poblaciones adultas y pediátricas con una frecuencia general del 6%, 2 de nuestros pacientes eran adultos, mientras que 1 era niño. Shago (2016) menciona que, en aproximadamente un tercio de los pacientes, la translocación aparece en forma equilibrada, mientras

que 2 tercios de los pacientes tienen la forma desequilibrada con el cromosoma derivado 19 y dos cromosomas normales 1. En nuestro trabajo 3 pacientes presentaron esta translocación, el resultado de uno de ellos fue solo por PCR, por lo que no sabemos si presenta la translocación equilibrada o desequilibrada, los otros 2 pacientes si tienen cariotipo, donde podemos observar que uno de ellos presenta la equilibrada y el otro la desequilibrada, también menciona que esta translocación puede estar acompañada por del(6q), del(9p), i(9q) y del(13q), pero ninguno de nuestros pacientes presentó otra alteración adicional, y que algunos casos, además de presentar la $t(1;19)(q23;p13) / der(19)t(1;19)(q23;p13)$ también presentan hiperdiploidía, pero que estos casos deberán evaluarse mediante métodos moleculares para determinar la presencia del reordenamiento del gen EA2-PBX1 ya que Shabsovich, Tirado., *et al* (2015) menciona que la $t(1;19)(q23;p13) / der(19)t(1;19)(q23;p13)$ generalmente se encuentra como alteración única y que generalmente se asocia con un pronóstico intermedio, sin embargo, cuando esta translocación se presenta con cariotipo hiperdiploide se asocia a un mal pronóstico, en otros artículos publicados observo que el 95% con la translocación ya sea equilibrada o desequilibrada con cromosomas <50 expresaban la transcripción de la fusión EA2-PBX1, mientras que solo el 25% de los casos con >50 cromosomas lo presentaron, por lo que las variantes positivas y negativas de TCF3-PBX1 de $t(1;19) / LLA$ hiperdiploide B representan subtipos distintos de la enfermedad, es por esta razón que es de gran importancia utilizar FISH y PCR para una correcta clasificación citogenética y molecular de la enfermedad.

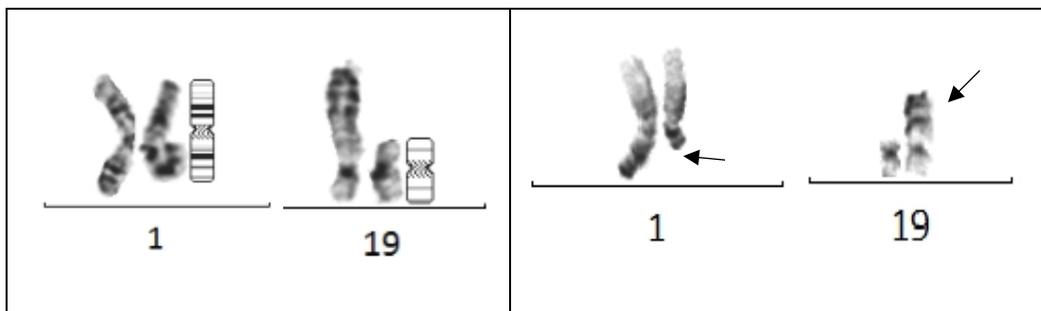


Figura 27. *Cariotipo parcial de $t(1;19)(q23;p12)$. Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.*

Como ya mencionamos en el apartado de LGC, la t(9;22)(q34;q11.2) involucra a los genes BCR y ABR formando un gen quimérico BCR-ABL, el gen BCR tiene 3 puntos de rompimiento, el M-BCR que se presenta en la LGC, el μ -bcr en la LMC neutrofilica y el m-bcr que se presenta en la LLA. Los 3 pacientes que presentaron esta translocación tenían 5, 23 y 56 años, Shago., (2016) menciona que aproximadamente el 3% de pacientes pediátricos con B-ALL presentan esta translocación y que es un indicador de pronóstico adverso en la LLA, mientras que Chang., *et al* (2017) que menciona que el cromosoma Ph+ se observa en el 50% de pacientes con LLA entre los 40 y 50 años. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en estos 3 pacientes fueron obtenidos mediante FISH (ver Figura N°28), lo cual debió corroborarse con el cariotipo ya que Shago., (2016) menciona que hay alteraciones secundarias en aproximadamente 2 tercios de los pacientes con la t(9;22)(q34;q11.2) las cuales tienen un impacto negativo en el resultado, estas alteraciones incluyen la ganancia de una copia adicional del cromosoma 22, pérdida del cromosoma 7, del(7p), del(9p), trisomía 8 e hiperdiploidía y Chang., *et al* (2017) menciona que los ACA se observan con frecuencia en pacientes con LLA con Ph+, en estudios revisados por él, la frecuencia de ACA en adultos fue de 42-71%, y observo que en algunos estudios los pacientes que tenían ACAs, no mostraron peor pronóstico en comparación con los que solo tenían la t(9;22)(q34;q11.2) pero en otros estudios si hubo peor pronóstico, por lo que realizó un estudio a 122 pacientes diagnosticados con Ph+ para LLA, la edad media fue de 49.5 años y los ACA estuvieron presentes en el 73% de los pacientes, los ACA encontrados fueron hipodiploidía, hiperdiploidía, Ph extra, pérdida del cromosoma 9 o deleción de su brazo corto (-9/[del(9p)], pérdida del cromosoma 7 o deleción de su brazo corto (-7/[del(7p)], trisomía 8 o ganancia de X.

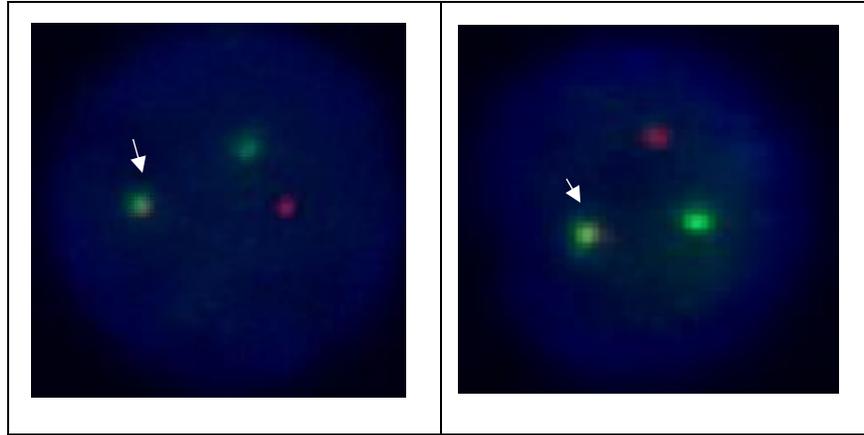


Figura 28. FISH interfásico de paciente con LLA.(BCR/ABL). Se observan 1 señal verde, 1 señal roja y una fusionada lo cual indica el punto de rompimiento menor (m-bcr). (ABL:señal roja, BCR:señal verde). Marca comercial Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, dual fusión translocation) Cortesía de Laboratorio de biología y genética molecular del HJM.

VII. Conclusiones

Se logró con éxito la estandarización mediante la combinación de técnicas observadas en la literatura, debido a que algunas veces era difícil obtener el cariotipo ya sea porque la cantidad de la muestra era muy pequeña, estaba muy diluida o no había buen crecimiento celular, se le realizaba FISH o PCR, además de que en ocasiones se realizaban adicionalmente estas técnicas de citogenética molecular a las muestras con el fin de corroborar resultados.

Se logró identificar las alteraciones cromosómicas de los pacientes mediante las técnicas de citogenética clásica y molecular, las cuales reportamos basándonos en la nomenclatura ISCN (2016).

Se logró correlacionar los resultados de nuestras técnicas empleadas, ya que estas se complementaban unas con otras, y también se correlacionaron los resultados con los datos hematológicos obtenidos de algunos pacientes, como WBC, % de blastos en SP y MO y el inmunofenotipo, pero al momento de analizar los datos y revisar la literatura se observó que también es de gran importancia contar con el número de plaquetas.

En este trabajo podemos concluir que el análisis citogenético tanto convencional como molecular (combinado) es de gran importancia para la detección de alteraciones citogenéticas, pero es de gran ayuda contar con otros análisis clínicos para direccionar la búsqueda de dichas alteraciones y así obtener un correcto diagnóstico para que se le pueda ofrecer al paciente un tratamiento dirigido.

VIII. Referencias

1. Arias S., Valero G., (2013) Leucemia Linfocítica Crónica. Lux médica. #25
2. Arroyave, J., Röthlisberger, S., et al (2017). Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 31(1), 63–76. (sci-hub.tw/10.1016/j.blre.2016.08.005)
3. Arsham M., Barch M., et al (2017) The AGT Cytogenetics Laboratory Manual. 4^a ed. USA: Wiley Blackwell
4. Avila C., Gonzalez P., (2014) Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter.* 2014;30(1):47-58
5. Azaad N., et al (2018) Prognostic Implication of BCR-ABL Fusion Transcript Variants in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib. A First of Its Kind Study on CML Patients of Kashmir. India. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19 (6). Page 1479-1485. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.6.1479
6. Balducci, E., Loosveld, M., et al (2017). Interphase FISH for BCR-ABL1 rearrangement on neutrophils: A decisive tool to discriminate a lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia from a de novo BCR-ABL1 positive acute lymphoblastic leukemia. France. *Hematological Oncology*, 36(1), 344–348. doi:10.1002/hon.2416
sci-hub.tw/10.1002/hon.2416
7. Barbouti, A., Stankiewicz, P., et al (2004). The Breakpoint Region of the Most Common Isochromosome, i(17q), in Human Neoplasia Is Characterized by a Complex Genomic Architecture with Large, Palindromic, Low-Copy Repeats. Belgium. *The American Journal of Human Genetics*, 74(1), 1–10. doi:10.1086/380648
sci-hub.tw/10.1086/380648
8. Bellomo M., Parlier V., et al (1992) Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* ;59(2):138-60.

9. Bono E., McLornarn D., et al (2019) Clinical, histopathological and molecular characterization of hypoplastic myelodysplastic síndrome. Springer nature. <https://sci-hub.tw/10.1038/s41375-019-0457-1>
10. Cabrero, M., Wei, Y., et al. (2016). *Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndromes.* United states: Esevier *Leukemia Research*, 44, 1–7. doi:10.1016/j.leukres.2016.02.009
sci-hub.tw/10.1016/j.leukres.2016.02.009
11. Cao P., Yu Y., et al (2018) Fluorescence in situ hybridization comparison of the prognostic factors in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia: A retrospective analysis of 282 cases. China. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE* 16: 4674-4684. DOI 10.3892/etm.2018.6821
12. Carnot U., Síndromes mielodisplásticos. Manual de Prácticas Médicas-Hospital Hermanos Ameijeiras. <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/hematologia/smdarreglado.pdf>
13. Carr J. Rodak F. (2010) Atlas de hematología clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.
14. Castro J., Orozco V., et al., (2007) Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda en pediatría: incidencia, mortalidad y asociaciones causales. *Salud UIS* 2007; 39: 116-123
15. Chang A., et al (2017) Prognostic Significance of Recurrent Additional Chromosomal Abnormalities in Adult Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. Korea: Cancer Genetics. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.cancergen.2017.06.001>
16. Chavez G., Anaya S., et al (2009) La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de investigación clínica*. Vol 61 #3 pp221-232
17. Coronel M., (2005) Importancia del laboratorio en el diagnóstico y pronóstico de leucemia aguda linfoblástica de la infancia. *Acta Pediatr Mex* 2005;26(3)129-36 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=423640828005>

18. Crisan A., Coriu D., et al (2015) The impact of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis and during therapy with tyrosine kinase inhibitors in Chronic Myeloid Leukaemia. *J Med life.* 8(4): 502-508. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656961/>
19. Cruise, M. (2017). *Immunohistochemistry in Acute Myeloid Leukemia. Acute Myeloid Leukemia*, vol. 1633. 33–49. [sci-hub.tw/10.1007/978-1-4939-7142-8_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7142-8_3)
20. Cruz F., (2018) Leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol Mex.* 2018 ene;19(1):24-40.
21. Curtis H., Schnek A., et al (2008) *Biologia*. 7^a ed: Buenos Aires: Medica Panamericana.
22. Dambruso I., Boni M., et al (2017) MDS/AML del(11)(q14) Share Common Morphological Features Despite Different Chromosomal Breakpoints. *Italy: ANTICANCER RESEARCH* 37: 645-650. doi:10.21873/anticancer.11359 ([sci-hub.tw/10.0000/ar.iijournals.org/ar/37/2/64](https://doi.org/10.0000/ar.iijournals.org/ar/37/2/64))
23. Fabarius, A., Leitner, A., et al (2011). Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*, 118(26), 6760–6768. doi:10.1182/blood-2011-08-373902 [sci-hub.tw/10.1182/blood-2011-08-373902](https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373902)
24. Farhat M., Habbal, W., et al (2016). *Frequency of BCR-ABL Transcript Types in Syrian CML Patients. Syria Journal of Oncology*, 2016, 1-5. doi:10.1155/2016/8420853 [sci-hub.tw/10.1155/2016/8420853](https://doi.org/10.1155/2016/8420853) <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8420853>
25. Fritz A., Percy C., et al (2003) CIE-O: clasificación internacional de enfermedades para oncología. 3ra ed. Washington
26. Filho M., M., Ferlay, et al (2018). *Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. The Lancet Haematology*, 5(1), e14–

e24. doi:10.1016/s2352-3026(17)30232-6
sci-hub.tw/10.1016/S2352-3026(17)30232-6

27. Gómez A., Jaime P. (2012) Hematología: la sangre y sus enfermedades. 3ª ed. México: McGraw Hill.
28. Greulich K., Heinze, B. (2012). *On the Power of Additional and Complex Chromosomal Aberrations in CML. Current Genomics*, 13(6), 471–476. doi:10.2174/138920212802510466
sci-hub.tw/10.2174/138920212802510466
29. Hartmann, L., Metzeler, K. (2019). Clonal hematopoiesis and pre-leukemia - genetics, biology and clinical implications. *Genes, Chromosomes and Cancer*. LMU Munich, Germany <https://sci-hub.tw/10.1002/gcc.22756>
30. *Hernández R., (2003) Leucemia linfocítica crónica. Diagnóstico y factores pronósticos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* v.19 n.2-3 Ciudad de la Habana Mayo-dic. 2003. Scielo
31. Hurtado M., Solano E., et al (2012) Leucemia para el médico general. *Rev., Facmed*. artículo de revisión (55, 2).
32. Karp J., (2011) Leucemia mieloide aguda. *Leukemia y Lymphoma Society*. https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_aml.pdf
33. Kjeldsen, E. (2016). *Characterization of a novel acquired der(1)del(1)(p13p31)t(1;15)(q42;q15) in a high risk t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. Denmark: Gene*, 595(1), 39–48. doi:10.1016/j.gene.2016.09.030
sci-hub.tw/10.1016/j.gene.2016.09.030
34. Koch, D., Gebharter A., et al, (2017). *A causal Bayesian network model of disease progression mechanisms in chronic myeloid leukemia. Journal of Theoretical Biology*, 433, 94–105. doi:10.1016/j.jtbi.2017.08.023 (sci-hub.tw/10.1016/j.jtbi.2017.08.023)
35. Lagunas R., (2016) Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología* Volume 15, Issue 3, May–June 2016, Pages 150-157

36. Lassaletta A., (2016) Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integral* 2016; XX (6): 380–389
37. Lawce H., Olson S., et al (2017) MECOM (EVI1) Rearrangements: A Review and Case Report of Two MDS Patients with Complex 3q Inversion/Deletions. *J Assoc Genet Technol.* ;43(1):9-14
38. Lee S, Park T., et al (2010) Constitutional Pericentric Inversion 9 and Hematological Disorders: A Korean Tertiary Institution's Experience over Eight Years Korea, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(3) <http://www.annclinlabsci.org/content/40/3/273.long>
39. López C., Paz M., (2014) *Genética molecular y citogenética humana*. Ecuador: Yachay EP.
40. Louis J., (2017) Síndromes mielodisplásicos. *Leukemia Y Lymphoma society*
41. McGowan J., Simons A., et al (2016) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. London: Karger.
42. Mejia A., Núñez E., et al (2016) Epidemiología descriptiva de la leucemia mieloide aguda (LMA) en niños residentes de la Ciudad de México: reporte del Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños. *Gac Med Mex.* 152:66-77
43. Melo A., Artiagas A., (2013) Perfil de Metilación de Genes Supresores de Tumores APAF1, ASSP1, p73 y FHIT en Pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil. *Int. J. Morphol.*, 31(3):973-979, 2013.
44. Misuk., Mina H., et al (2016) Chronic Myelogenous Leukemia-Chronic Phase. Korea: *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 46(3) <http://www.annclinlabsci.org/content/46/3/308.full.pdf+html>
45. Morales K., Bourlon, C., et al (2019). *Impact of Additional Cytogenetic Abnormalities on the Clinical Behavior of Patients With Chronic Myeloid Leukemia: Report on a Latin American Population. Clinical Lymphoma*

Myeloma and Leukemia. Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Elsevier Mexico City, Mexico <https://sci-hub.tw/10.1016/j.clml.2019.02.007>

46. Mota C., Bautista C., et al, (2016) *Biología molecular y citogenética*. España: Parainfo.
47. Mourad, Z., Farahat, N., et al (2018). *The prognostic impact of loss of chromosome 7 material detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in myeloid malignancies*. *Egypt: Journal of the Egyptian National Cancer Institute*.doi:10.1016/j.jnci.2018.11.001
sci-hub.tw/10.1016/j.jnci.2018.11.001
48. NCBI. National Center for Biotechnology Information. (2019). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
49. Nybakken, G., Bagg A. (2014). *The Genetic Basis and Expanding Role of Molecular Analysis in the Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Design for Myelodysplastic Syndromes*. Philadelphia: *The Journal of Molecular Diagnostics*, 16(2), 145–158.doi:10.1016/j.jmoldx.2013.11.005
sci-hub.tw/10.1016/j.jmoldx.2013.11.005
50. Oliva R., Ballesta F., et al, (2004) *Genética Médica*. 3ª ed. Barcelona: Univesidad de Barcelona.
51. Ortega S., Osaya O., et al (2007) *Leucemia linfoblástica aguda*. *Medicina Interna de México* Volumen 23, Núm. 1, pp26-33
52. Park, T., Song J., et al (2007). *A der(1;15)(q10;q10) is a rare nonrandom whole-arm translocation in patients with acute lymphoblastic leukemia*. *Korea: Cancer Genetics and Cytogenetics*, 179(2), 132–135.doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.08.008
sci-hub.tw/10.1016/j.cancergencyto.2007.08.00
53. Passarge E., (2007) *Genética: texto y atlas*. 3ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana.

54. Pavon M., Hernandez R., et al (2005) Leucemia mieloide crónica. Actualización en Citogenética y Biología Molecular. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter v.21 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2005
55. Pezeshki, A., Podder, S., et al. (2017). *Monosomy 7/del (7q) in inherited bone marrow failure syndromes: A systematic review. Virginia: Pediatric Blood & Cancer, 64(12), e26714. doi:10.1002/pbc.26714*
sci-hub.tw/10.1002/pbc.26714
56. Pulikkan J., y Castilla L., (2018) Preleukemia and Leukemia-Initiating Cell Activity in inv(16) Acute Myeloid Leukemia. United States. Journal List. Front Oncol Vol 8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932169/>
57. Quesada D., Bello A., (2011) Resultados citogenéticos en pacientes con leucemia mieloide crónica. Rev cubana med vol.50 no.4 Ciudad de la Habana oct.-dic.
58. Qin, Y., Jiang, Q., et al (2016). *Combination of White Blood Cell Count at Presentation With Molecular Response at 3 Months Better Predicts Deep Molecular Responses to Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Patients. Medicine, 95(2), e2486*
doi:10.1097/md.0000000000002486
sci-hub.tw/10.1097/MD.0000000000002486
59. Ramachandran K., Narayanan G., et al., (2019). *Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. Frontiers in Oncology, 9, doi:10.3389/fonc.2019.00088* (sci-hub.tw/10.3389/fonc.2019.00088)
60. Ramos C., Rozen E., et al (2011) Tratamiento de la leucemia linfocítica aguda del adulto. Experiencia de un hospital en la Ciudad de México. Rev. méd. Chile vol.139 no.9 1135-1142 (<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000900004>)
61. San miguel J., Sánchez G (2020). Hematología. Manual básico razonado. 5ª ed. España: Elsevier.

62. Sarrantonio C., Rotoli B., et al (1999) Alpha IFN-induced hematologic and cytogenetic remission in chronic eosinophilic leukemia with t(1;5). Italy: *Haematologica*; 84:651-653. <http://www.haematologica.org/content/84/7/651>
63. Shabsovich, D., Tirado A., et al (2015) A (1;19) translocation involving TCF3-PBX1 fusion within the context of a hyperdiploid karyotype in adult B-ALL: a case report and review of the literature. *Biomarker Research*, 3(1). doi:10.1186/s40364-015-0029-0
sci-hub.tw/10.1186/s40364-015-0029-0
64. Shago, M. (2016). *Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cytogenetics*, 257–278. doi:10.1007/978-1-4939-6703-2_21
sci-hub.tw/10.1007/978-1-4939-6703-2_21
65. Shahjahani, M., Hadad, E., et al (2019). Complex karyotype in myelodysplastic syndromes: Diagnostic procedure and prognostic susceptibility. *Oncology Reviews*, 13(1). doi:10.4081/oncol.2019.389
66. Shahrabi, S., Khodadi, E., et al (2017). Sex chromosome changes in leukemia: cytogenetics and molecular aspects. *Hematology*, 23(3), 139–147. doi:10.1080/10245332.2017.1375063
67. Sheth, F., Sheth J., et al (2006). Case of near triploidy with i(17)(q10) in blast crisis CML. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 164(2), 177–178. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.07.022
sci-hub.tw/10.1016/j.cancergencyto.2005.07.022
68. Stengel, A., Kern W., et al (2017). MDS with deletions in the long arm of chromosome 11 are associated with a high frequency of SF3B1 mutations. *Leukemia*, 31(9), 1995–1997. doi:10.1038/leu.2017.180
sci-hub.tw/10.1038/leu.2017.180
69. Tamar S., Constanza C., et al (2008) Utilidad de la citogenética en la medicina actual. *ACTA MED COLOMB*. 33(4)
70. Thomas S., (2017) *Cancer cytogenetics. Methods and protocols*. China: Humana press.

71. Torres C., Valencia Z., et al (2010) Leucemia mieloide crónica: diagnóstico y tratamiento. CES Medicina, vol. 24, núm. 1, enero-junio, 2010, pp. 97-108 Universidad CES Medellín, Colombia.
72. Turnpenny P., Ellard S., (2009) Elementos de genética médica. 13ª ed. Barcelona: Elsevier.
73. Uranga H., et al (2012) Genética clínica. México: Manual Moderno.
74. Valdespino G., (2014) Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B: un modelo personalizado de valoración clínica y molecular. Rev Hematol Mex 2014;15:103-121. <http://www.medigraphic.com/pdfs/hematologia/re-2014/re143d.pdf>
75. Valdespino G., Valdespino C (2015) Alteraciones genómicas y epigenómicas de las clonas de leucemia linfocítica crónica relacionadas con sus funciones básicas celulares. Rev Hematol Mex 2015;16(1) :53-69.
76. Venegas P., (2001) Translocación t(4;11) en médula ósea de infantes con leucemia linfocítica aguda. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) vol.36 n.1-2 San José Jan. 2001
77. Venegas P., Rivera J (2004) Estudios citogenéticos en niños con Leucemia Linfocítica Aguda-B en Costa Rica. Rev. biol. trop vol.52 n.3 San José Sep. 2004
78. Wang, X., Tang, J., et al (2015). *Determination of ETV6-RUNX1 genomic breakpoint by next-generation sequencing. China: Cancer Medicine, 5(2), 337–351.*doi:10.1002/cam4.579
sci-hub.tw/10.1002/cam4.579
79. Wang, W., Chen, Z., et al (2016). *Clinical significance of trisomy 8 that emerges during therapy in chronic myeloid leukemia. Blood Cancer Journal, 6(11), e490–e490.*doi:10.1038/bcj.2016.96
sci-hub.tw/10.1038/bcj.2016.96
80. Wang, W., Ali, S., et al (2016). *Constitutional pericentric inversion of chromosome 9 has no impact on survival in chronic myelogenous leukemia. Berlin. Annals of Hematology, 95(4), 657–659.*doi:10.1007/s00277-016-2592-3

sci-hub.tw/10.1007/s00277-016-2592-3

81. Wang, W., Cortes, J., et al (2015). *Impact of trisomy 8 on treatment response and survival of patients with chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors. Leukemia, 29(11), 2263–2266. doi:10.1038/leu.2015.96*
ci-hub.tw/10.1038/leu.2015.96

82. Wilkinson, K. (2003). *Cloning of the t(1;5)(q23;q33) in a myeloproliferative disorder associated with eosinophilia: involvement of PDGFRB and response to imatinib. Brazil: Blood, 102(12), 4187–4190. doi:10.1182/blood-2003-04-1150*
sci-hub.tw/10.1182/blood-2003-04-1150

IX. Anexos

Preparación de Soluciones

*Medio de transporte

500mL medio RPMI + 60mL suero fetal bovino + 6mL (penicilina, estreptomina 10000 U/mL) + 6mL L-glutamina + 6mL MEM Non-Essential Amino Acids Solution + 2mL heparina (1000UI/ml).

*Siembra

Medio RPMI: 1 sobre de medio RPMI + 1000mL de agua destilada + 2g bicarbonato + 100mL de suero bovino fetal (10%) + 13mL Antibiótico (penicilina, estreptomina 10000 U/mL).

*Cosecha

*Colchicina:

- 1.- Stock: 0.01g colchicina en 10mL de agua destilada
- 2.- 1mL de Stock en 99mL de agua destilada

*Solución hipotónica:

- 1.- 4g de Cloruro de potasio en 1L de agua estilada
- 2.- 4g de Citrato de sodio en 1L de agua destilada

*Solución Carnoy: Metanol- Ácido acético (3:1)

*Bandeo

*Buffer A: 45.36g de Fosfato de potasio en 1L de agua destilada

*Buffer B: 59.32g de Fosfato de sodio en 1L de agua destilada

*Buffer de Wright: 1.28g de Fosfato de sodio + 3.31g de Fosfato de potasio + 500mL de agua destilada

*Buffer Gurr; 1 tableta en 1L de agua destilada.

*Solución salina: 9g de cloruro de sodio en 1L de agua destilada

*Tripsina: 2g Tripsina en 40mL de agua destilada. Formar alícuotas de 2mL en tubos eppendorf.