UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Descripción de variantes citogenéticas encontradas en cariotipo en médula ósea de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

Dirección de Enseñanza y Desarrollo Académico
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

P R E S E N T A:

Dra. Valeria Nayely Hernández Serratos

TUTOR:
Dr. H. Rodrigo Moreno Salgado

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO 2025

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

2. Hoja de firmas

Claudia Gutiérrez Camacho

Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Herbey Rodrigo Moreno Salgado

Jefe de Departamento de Genética Médica

Tutor académico

Linda Beatriz Muñoz Martínez

Adscrita al laboratorio de Citogenética

Tutora Metodológica

Valeria Nayely Hernández Serratos

Residente de Genética Médica

Sustentante

Dedicatoria

A mi madre, por todo el amor brindando y su apoyo incondicional, quién día a día me ha enseñado la resiliencia y la fuerza de voluntad para seguir adelante.

A mi hermana y amiga, Midori, por ser uno de mis pilares más importantes, por todo el apoyo y guía para realizar este trabajo, por darme ánimos para no desistir.

A mis abuelos y el resto de mi familia, porque a su modo, nunca me han dejado caer y siempre tienen palabras de aliento y amor para ofrecer.

A mi mentora, amiga y tutora metodológica, Linda Muñoz, porque sin ella esta tesis no existiría, y sobre todo gracias por ser un lugar seguro durante toda mi residencia.

A mi novio, Mauricio, por brindarme su amor y apoyo incondicional en los momentos más difíciles y ser mi cómplice en este camino.

A mis amigas y compañeras de Laboratorio, Ari y Romi, quienes me han hecho sentir que me encuentro un lugar muy especial y por su apoyo día a día.

A mis profesores adjuntos del Departamento de Genética, por las enseñanzas brindadas y la guía para desarrollarme como Genetista.

Al jefe del departamento, Rodrigo Moreno, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y estar dentro de esta grandiosa Institución.

Índice

1. **Antecedentes** ____ 6

2. **Marco teórico** ____ 7

- **Introducción** ____ 7
- **Hematopoyesis** ____ 7
- **Leucemogénesis** ____ 8
- **Clasificación de las neoplasias hematológicas** ____ 10
- **Inmunofenotipo** ____ 14
- **Citogenética y aplicación en hemato-oncolología** ____ 16
- **Variantes citogenéticas comunes en LMA** ____ 18
- **Variantes citogenéticas comunes en LLA** ____ 21

7. **Planteamiento del problema** ____ 27

8. **Pregunta de investigación** ____ 28

9. **Justificación** ____ 29

10. **Hipótesis** ____ 30

11. **Objetivos (General, específicos)** ____ 31

12. **Métodos** ____ 32

13. **Plan de análisis estadístico** ____ 34

14. **Descripción de variables** ____ 35

15. **Resultados** ____ 36

16. **Discusión** ____ 51

17. **Conclusión** ____ 56

18. **Cronograma de actividades** ____ 57

19. **Referencias bibliográficas** ____ 58

20. **Limitaciones del estudio** ____ 61

21. **Anexos** ____ 62

Abreviaturas

CMA: Microarreglos Cromosómicos

CMH: Células madre hematopoyéticas

CML: Células madre leucémicas

CNV: Variantes en el número de copias

CRL: Célula regeneradora de leucemia

CRT: Célula resistente a terapia

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMR: Enfermedad mínima residual

FISH: Hibridación Fluorescente *in situ*

LMA: Leucemia mieloide aguda

LLA: Leucemia linfoide aguda

LPM: Leucemia promielocítica

LSI: Sonda de secuencia única

MOG: Mapeo Óptico del Genoma

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEM: Progenitores eritroides de megacariocitos

PGM: Progenitores de Granulocitos y Macrófagos

PLC: Progenitores linfoides comunes

PMC: Progenitores mieloides comunes

PMP: Progenitores multipotentes

PMPL: Progenitores multipotentes preparados linfoides

RNA: Ácido ribonucleico

SMD: Síndrome mielodisplásico

SV: Variantes estructurales

TCR: Receptor de células T

WES: Secuenciación de Exoma Completo

2. Antecedentes

Las neoplasias hematolinfoides son un conjunto variado de enfermedades que se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, las cuales se diferencian en progenitores mieloides y linfoides, y en sus respectivas células maduras mieloides y linfoides.[1]

Como grupo, las neoplasias hematológicas son el sexto cáncer más mortal en los Estados Unidos, con un caso diagnosticado cada 3 minutos. [1]

Desde principios de la década de 1950 hasta mediados de 1970, todas las leucemias linfoblásticas agudas infantiles se trataron de acuerdo con un protocolo único. Se evidenció que algunos parámetros tenían importancia pronóstica: edad, recuento de glóbulos blancos, afectación meníngea inicial, masa mediastínica, eficacia del tratamiento y, más recientemente, marcadores inmunológicos y citogenéticos. [2]

Posteriormente, se demostró que el cariotipo es un factor pronóstico independiente para la supervivencia, incluso cuando se consideran la edad, el recuento de glóbulos blancos, la carga tumoral y los parámetros inmunológicos. [2]

Con ello se resaltó la importancia de la detección de las anomalías citogenéticas, que ocurren en el 90% de los casos, y su utilidad en la determinación del pronóstico y el seguimiento longitudinal de la enfermedad. Se consideró que ciertas alteraciones cromosómicas podrían asociarse con tipos citológicos específicos y que el conocimiento de la localización de oncogenes permitiría dar un enfoque fisiopatológico. [3]

Se destacó en cómo la presencia o ausencia de ciertas anomalías cromosómicas influía en el pronóstico y en la respuesta al tratamiento. Se concluyó que la identificación de factores pronósticos es fundamental para seleccionar enfoques terapéuticos adecuados en pacientes con leucemia linfoide aguda (LLA) infantil.[3]

Desde la identificación en 1960 del cromosoma Filadelfia (Ph) producto de t(9;22) *BCR/ABL* como una variante citogenética vinculada con la leucemia mieloide crónica, se ha documentado una amplia variedad de anomalías citogenéticas. Actualmente, realizar estos estudios es esencial para diagnosticar y clasificar adecuadamente las leucemias y los linfomas, y también son cruciales como indicadores pronósticos. [4]

De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha integrado como pilar esencial del abordaje diagnóstico de estas enfermedades. La evolución de técnicas como la Hibridación Fluorescente *in situ* y otras pruebas moleculares, ha enriquecido nuestro entendimiento de estas condiciones, considerándose como complementos valiosos a los estudios citogenéticos. En muchas ocasiones, los cambios citogenéticos son determinantes en la planificación del tratamiento de estos pacientes.[4]

3. Marco teórico

a. Introducción

Las neoplasias hematológicas son el cáncer infantil más común en todo el mundo, siendo la leucemia linfoblástica aguda (LLA) el tipo más prevalente. Generalmente, muestra un pico de incidencia entre los 2 y 5 años, siendo más frecuente en varones. [5]

Dichos trastornos, surgen de la transformación maligna de una célula progenitora linfoide inmadura, que puede proliferar y generar un clon de células progenitoras similares, bloqueadas en una etapa de su diferenciación y con capacidad para infiltrar diversos tejidos.[5]

La American Cancer Society estimó que en 2023 se registrarían aproximadamente 60,000 nuevos casos de leucemia (de todos los tipos) en adultos y niños en los Estados Unidos, con alrededor de 24,000 muertes.[6]

En México, entre 2007 y 2010, se reportó una incidencia anual de leucemias de 75.3 millones para la población de 0 a 18 años, siendo el grupo de 0 a 4 años el más afectado. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituyó el 83% de los casos. [7]

Diversos estudios han mostrado que en México la incidencia de leucemia linfoblástica aguda es superior a la observada en países industrializados. En 2011, se destacó que la población mexicana tiene una incidencia de 57.6 nuevos casos por millón en menores de 18 años, siendo una de las tasas más altas a nivel mundial.[6]

La leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) son tipos diversos de trastornos neoplásicos caracterizados por la proliferación clonal de blastos hematopoyéticos de los linajes mieloide y linfoide, respectivamente. [6]

Inicialmente, en 1976, estas leucemias agudas fueron clasificadas siguiendo criterios morfológicos y citoquímicos por un grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB). Sin embargo, la limitada relevancia clínica y la falta de comprensión de la base biológica subyacente de la enfermedad, así como la estratificación del tratamiento, han sido desafíos importantes de este sistema de clasificación. [7]

Por consiguiente, se produjo un cambio de paradigma con respecto a la Clasificación de la FAB, adoptando la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2001 para las leucemias mieloides y linfoblásticas agudas, la cual fue revisada en 2008 y, más recientemente, en 2016. [7]

El sistema de la OMS ha adoptado cambios significativos, incluyendo un límite inferior de blastos del 20%, y ha integrado anomalías citogenéticas y moleculares junto con parámetros clínicos, morfológicos, citoquímicos e inmunofenotípicos para establecer el diagnóstico. [7]

En los últimos tiempos, se ha notado un progreso en los desenlaces de los pacientes que padecen leucemias agudas gracias a la identificación y descripción de anomalías citogenéticas. Esto ha facilitado la comprensión de los procesos patológicos subyacentes de la enfermedad y sus posibles consecuencias pronósticas. De manera que, este avance está contribuyendo a que los médicos organicen la estratificación del riesgo y las alternativas terapéuticas basadas en la citogenética.[8]

b. Hematopoyesis

La hematopoyesis se organiza como un proceso jerárquico que se origina a partir de una población rara de células madre hematopoyéticas (CMH) multipotentes y autorrenovables que proporcionan un suministro de por vida de múltiples tipos diferentes de células sanguíneas maduras morfológicamente distintas, a través de una serie de células progenitoras intermedias. [10,11]

Ocurre principalmente en la médula ósea, aunque algunos linfocitos se producen en tejidos linfoides como el timo y el bazo y puede clasificarse en términos generales según las células precursoras en varios linajes. [10,11]

Células Madre Hematopoyéticas (CMH): Son células multipotentes con la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas ubicadas en la médula ósea. Pueden autorrenovarse para mantener el conjunto de células madre y también diferenciarse en células progenitoras. [11,12]

Células Progenitoras: Son células intermedias derivadas de las CMH que tienen un potencial de diferenciación más restringido. Las células progenitoras dan origen a los diferentes tipos de células sanguíneas mediante un proceso llamado diferenciación hematopoyética. [11,12]

Eritropoyesis: Este es el proceso de formación de glóbulos rojos (eritrocitos). Involucra la diferenciación de las células progenitoras eritroides en eritrocitos maduros, que son responsables de transportar oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos. [11,12]

Granulopoyesis: Esta es la formación de granulocitos, que incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La granulopoyesis comienza con la diferenciación de las células progenitoras mieloides y resulta en la producción de granulocitos maduros involucrados en la respuesta inmune del cuerpo. [11,12]

Megacariopoyesis: Este es el proceso de formación de plaquetas. Los megacariocitos, células precursoras grandes encontradas en la médula ósea, experimentan un proceso llamado trombopoyesis para producir plaquetas, que son esenciales para la coagulación sanguínea y la cicatrización de heridas. [11,12]

Linfopoyesis: Esta es la formación de linfocitos, incluyendo células T, células B y células asesinas naturales (NK). La linfopoyesis ocurre principalmente en tejidos linfoides como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. [11,12]

La hematopoyesis es un proceso regulado de manera precisa que asegura la producción continua de células sanguíneas para mantener la homeostasis en el cuerpo. La desregulación de la hematopoyesis puede llevar a diversos trastornos y enfermedades sanguíneas. [12]

c. Leucemogénesis

Múltiples autores y revisiones, sugieren que la leucemia y sus células madre leucémicas surgen de células madre hematopoyéticas o de progenitores mieloides/linfoides comprometidos relativamente temprano. [12]

Las células leucemogénicas, incluidas las células clonales y transformadas, pero no francamente leucémicas, residen y probablemente proliferan en el mismo nicho estromal de la médula ósea ocupado por células madre hematopoyéticas y progenitores tempranos. [12]

Mediante la adquisición gradual de (en la mayoría de los casos) múltiples mutaciones transformadoras, las células madre leucémicas se transforman en células agresivas con un bloqueo relativo o absoluto en la diferenciación en células mieloides morfológica y funcionalmente normales.

Los eventos transformantes confieren ventajas de supervivencia y proliferación a las células leucémicas frente a las células hematopoyéticas normales, lo que resulta en la supresión y falla de la hematopoyesis normal.[13,14]

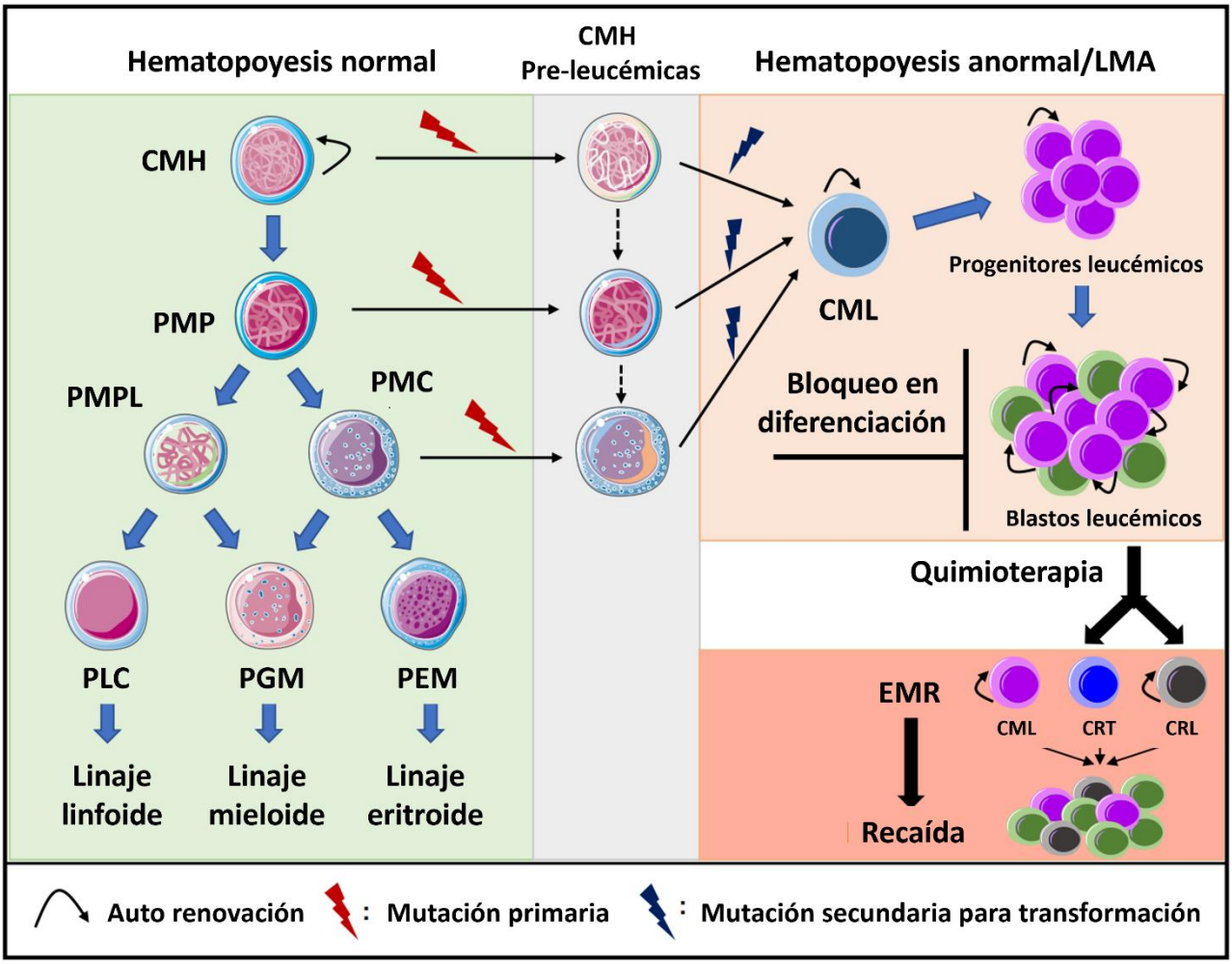
Además de las muchas y variadas mutaciones genómicas a nivel estructural y de secuencia identificadas en la leucemia humana, también se han identificado muchos cambios. Los cuales tienen efecto sobre la expresión genética tanto a nivel del gen que codifica la proteína somática como del RNA mensajero. La relación entre estos cambios genéticos y los cambios generales en la expresión genética en las leucemias y sus células madre se está investigando activamente en muchos LABORATORIOs.[13]

Se han realizado muchos esfuerzos para caracterizar y diferenciar el fenotipo de la superficie celular de las células madre leucémicas (CML) de las no leucémicas. Gracias a estos esfuerzos, se han encontrado marcadores de superficie que se sobreexpresan en las CML y marcadores adicionales que se expresan de forma única. Por lo que la búsqueda de estos marcadores de superficie cumple un papel fundamental en la identificación de diversos tipos celulares. [12]

En la figura 1, representada en el recuadro verde, se detalla la hematopoyesis normal, donde las células madre hematopoyéticas, que están en estado de reposo y tienen capacidad de autorrenovación, dan lugar a progenitores multipotentes. Estos pueden diferenciarse en progenitores multipotentes linfoides, progenitores mieloides comunes, progenitores linfoides comunes, progenitores granulocitos-macrófagos (GMP) y progenitores eritroides megacariocitos. Las mutaciones primarias o iniciales en las CMH y las células progenitoras conducen a la formación de células madre preleucémicas, que con el tiempo pueden transformarse en células madre leucémicas (CML). En muchos casos, este proceso no implica un estado preleucémico clínicamente reconocido, pero generalmente se requieren múltiples mutaciones para desarrollar una leucemia aguda franca. [10]

Un progenitor restringido puede convertirse en CML mediante mutaciones secundarias que confieren capacidad de autorrenovación. La leucemia mieloide aguda (LMA) se origina a partir de la transformación de CMH normales, progenitores multipotentes u otros progenitores más comprometidos, que se convierten en CML y luego pueden dar lugar a una leucemia franca. Aunque la quimioterapia de inducción estándar suele producir una remisión completa en la mayoría de los pacientes con LMA, una población de células resistentes a la quimioterapia (TRC), que comprenden células de LMA con capacidad para iniciar la leucemia, sobreviven al tratamiento. [13,14]

Las CML con potencial para iniciar la leucemia dentro de la enfermedad residual mínima (ERM) podrían desencadenar una recaída. En lugar de una selección quimioterapéutica de subpoblaciones preexistentes de CML, las células de LMA podrían adquirir de manera adaptativa un fenotipo de célula regeneradora de leucemia transitoria (LRC) después de la exposición al tratamiento, lo que permite la regeneración de la leucemia y la recurrencia clínica. [13,14]



CMH: Células madre hematopoyéticas, LMA: Leucemia mieloide aguda, PMP: Progenitores multipotentes, PMPL: progenitores multipotentes preparados linfoides, PMC: Progenitores mieloides comunes, PLC: Progenitores linfoides comunes, PGM: Progenitores de Granulocitos y Macrófagos, PEM: Progenitores eritroides de megacariocitos, CML: Células madre leucémicas, EMR: Enfermedad mínima residual, CRL: Célula regeneradora de leucemia, CRT: Célula resistente a terapia.

Figura 1. Hematopoyesis normal y anormal. Modificada de Stem Cell Reviews and Reports (2022) 18:1211–1226.

d. Clasificación de las neoplasias hematológicas

La clasificación actual de las neoplasias hematológicas ha evolucionado continuamente, integrando características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y genéticas moleculares para definir entidades patológicas de relevancia clínica. No obstante, el descubrimiento reciente de características moleculares ha proporcionado nuevas perspectivas sobre los marcadores de diagnóstico y pronóstico, aportando conocimientos novedosos para comprender la base fisiopatológica de estos trastornos.[9,11]

- **Organización Mundial de la Salud (OMS):**

Diversos estudios clínico-patológicos han confirmado el enfoque integrado propuesto por la Organización Mundial de la Salud, que incluye hallazgos hematológicos, morfológicos, citogenéticos y genéticos moleculares. La última clasificación realizada por la OMS en 2016, que se detalla a continuación en la tabla 1, enumera los principales subtipos de neoplasias mieloides y leucemias agudas.[9]

Tabla 1. Clasificación de la OMS para neoplasias mieloides y leucemia aguda 2016.[9]

Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias relacionadas
LMA con anomalías genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
LMA con *PML-RARA*
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2* , *MECOM*
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*
Entidad provisional: AML con BCR-ABL1
LMA con *NPM1* mutado
LMA con mutaciones bialélicas de *CEBPA*
Entidad provisional: AML con RUNX1 mutado
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con la terapia
LMA NE
LMA con diferenciación mínima
LMA sin maduración
LMA con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritroide pura
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basófila aguda
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
Mielopoyesis anormal transitoria (MAT)
Leucemia mieloide asociada al síndrome de Down

NE: no especificado

Leucemia/linfoma linfoblástico B
Leucemia/linfoma linfoblástico B, NE
Leucemia/linfoma linfoblástico B con anomalías genéticas recurrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(v;11q23.3); KMT2A rearreglos
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
Leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1

Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico B, tipo BCR-ABL1
Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico B con iAMP21

NE: no especificado, v: variable

Leucemia/linfoma linfoblástico T
Entidad provisional: leucemia linfoblástica temprana de precursores de células T
Entidad provisional: leucemia/linfoma linfoblástico de células asesinas naturales (NK)

Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas
Leucemias agudas de linaje ambiguo
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda de fenotipo mixto (LAFM) con t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
LAFM con t(v;11q23.3); *KMT2A* reorganizado
LAFM, B/mieloide, NE
LAFM, T/mieloide, NE

NE: no especificado

Neoplasias Mieloproliferativas (NMP)
Leucemia mieloide crónica (LMC), *BCR-ABL1* $^{+}$
Leucemia neutrofílica crónica (CNL)
Policitemia vera (PV)
Mielofibrosis primaria (PMF)
PMF, prefibrótica/etapa temprana
PMF, etapa fibrótica manifiesta
Trombocitemia esencial (TE)
Leucemia eosinofílica crónica, no especificada de otra manera (NOS)
NMP inclasificable
Mastocitosis

Neoplasias mieloides/linfoides con eosinofilia y reordenamiento de *PDGFRA, PDGFRB o FGFR1*, o con *PCM1-JAK2*
Neoplasias mieloides/linfoides con reordenamiento *PDGFRA*
Neoplasias mieloides/linfoides con reordenamiento *de PDGFRB*
Neoplasias mieloides/linfoides con reordenamiento *de FGFR1*
Entidad provisional: neoplasias mieloides/linfoides con PCM1-JAK2

Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP)
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)
Leucemia mieloide crónica atípica (aCML), *BCR-ABL1* (−)
Leucemia mielomonocítica juvenil (JMML)
NMD/NMP con sideroblastos en anillo y trombocitosis (MDS/MPN-RS-T)
NMD/NMP inclasificable

Síndromes mielodisplásicos (SMD)
SMD con displasia de linaje único
SMD con sideroblastos en anillo (SMD-RS)
SMD -RS y displasia de linaje único
SMD -RS y displasia multilinaje

SMD con displasia multilinaje
SMD con exceso de explosiones
SMD con del(5q) aislado
SMD inclasificable
Entidad provisional: Citopenia refractaria de la infancia
Neoplasias mieloides con predisposición a la línea germinal

- Clasificación por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB):

La clasificación convencional de la leucemia mieloide aguda (LMA) se fundamentó en los criterios de la FAB, que categorizaron a los pacientes en ocho grupos distintos, M0-M7, según características morfológicas y citoquímicas (ver tabla 2).[15]

Aunque las clasificaciones actuales han evolucionado hacia un enfoque más centrado en las anomalías genéticas recurrentes, los hallazgos morfológicos continúan siendo fundamentales en la clasificación de la LMA.[15]

Tabla 2. Clasificación de la FAB para LMA[15]

Subtipo	Descripción
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima
M2	Leucemia mieloblástica 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 megacariocítica aguda

La LLA se caracteriza por la interrupción en la maduración de las células progenitoras linfoides en etapas tempranas debido a translocaciones cromosómicas y otras alteraciones genéticas y/o epigenéticas. El pronóstico de un paciente con LLA varía según el subtipo de la enfermedad. Históricamente, la clasificación según la FAB se basó en la morfología de la LLA y asignó a los pacientes a uno de los tres grupos (ver tabla 3).[15]

Tabla 3. Clasificación de la FAB para LLA[15]

Subtipo	Descripción
L1	Células de tamaño reducido con cromatina nuclear uniforme, núcleo de forma regular, nucleolos pequeños o ausentes, citoplasma escaso y una ligera a moderada basofilia.
L2	Células de gran tamaño y variabilidad, con cromatina nuclear que varía, núcleo de forma irregular, más de un nucleolo visible, cantidad de citoplasma variable y basofilia que puede variar.
L3	Células grandes y uniformes con cromatina finamente punteada, núcleo de forma regular, nucleolos prominentes, citoplasma abundante y marcadamente basófilo, destacándose por su notable vacuolización citoplasmática como característica distintiva.

e. Inmunofenotipo

El inmunofenotipado por citometría de flujo es esencial para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de enfermedades hematopoyéticas clonales, en particular de neoplasias malignas hematológicas e inmunodeficiencias primarias. [16]

En la actualidad, está bien establecido que las células hematopoyéticas tumorales imitan las características fenotípicas de sus correspondientes homólogos normales. Sin embargo, las células tumorales muestran sistemáticamente desviaciones/alteraciones fenotípicas de los perfiles normales de expresión de antígenos (tabla 4).[16]

Tabla 4. Hallazgos fenotípicos de superficie para las CML [10]

Marcador de superficie celular	Función del marcador	CMH	CML
CD9	Microdominio enriquecido con tetraspanina	-	-/+
CD25	Cadena α del receptor de interleucina-2 de alta afinidad	-	-/+
CD27	Receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, receptor para CD70	-	+
CD32	Receptor Fc-γ II	-	-/+
CD33	Antígeno de superficie de células mieloides	+	+
CD44	Molécula de adhesión, señalización intracelular.	+	++
CD45RA	Isoforma de CD45 (normalmente expresada en células T vírgenes)	-	-/+
CD47	Ligando/receptor para SIRPα	+	++
CD52	Antígeno Campath-1	-/+	-/+
CD70	Ligando de CD27 (papel en la activación inmune)	-	+
CD82	Tetraspanina-27	-/+	+
CD93	Componente del complemento 1 Subcomponente Q receptor 1	-	-/+
CD96	Proteína de superficie celular T	+	++
CD97	Receptor E5 acoplado a proteína G de adhesión	-/+	+
CD99	Glicoproteína E2 de la superficie de las células T	+	+
CD123	Subunidad α del receptor de interleucina 3	-/+	+
CD200	Miembro de superfamilia de inmunoglobulina	-/+	+
CD366 (TIM3)	Regulador negativo de la inmunidad de las células T Th1	-/+	+
CD371 (CLL-1)	Glicoproteína transmembrana	-	-/+
DRD2	Receptor de dopamina D2	-	++*
GPR56	Receptor acoplado a proteína G de adhesión 56	+	+
IL1RAP	Proteína accesoria del receptor de interleucina 1	-	-/+

MH: células madre hematopoyéticas, CML: células madre leucémicas.
** expresado en postquimioterapia. Modificada de Stem Cell Reviews and Reports (2022) 18:1211–1226.

Los fenotipos anómalos de las células tumorales hematopoyéticas suelen clasificarse según los patrones de desviación en la expresión de antígenos en comparación con los fenotipos normales. Estos incluyen: a) expresión de antígenos de manera no simultánea (es decir, ausencia o presencia de marcadores que deberían estar presentes durante la hematopoyesis normal en las mismas o diferentes etapas de maduración, respectivamente); b) reactividad anormalmente disminuida (infraexpresión) o aumentada (sobreexpresión) para un marcador individual en una población celular específica; c) fenotipos de linaje mixto definidos por la coexpresión en células tumorales individuales de dos o más marcadores de diferentes linajes; y, d) fenotipos ectópicos, caracterizados por perfiles fenotípicos asociados a tumores que corresponden a un tejido diferente en individuos sanos. [17]

La identificación específica de células tumorales a través de citometría de flujo basada en sus fenotipos anómalos es extremadamente útil en el ámbito clínico, especialmente para la detección mínima de enfermedades, ya sea en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento posterior a la terapia. Además, ciertos fenotipos anómalos de células tumorales hematopoyéticas están estrechamente relacionados con alteraciones genéticas o moleculares subyacentes, y podrían ser utilizados como marcadores sustitutos para guiar análisis moleculares adicionales. [16]

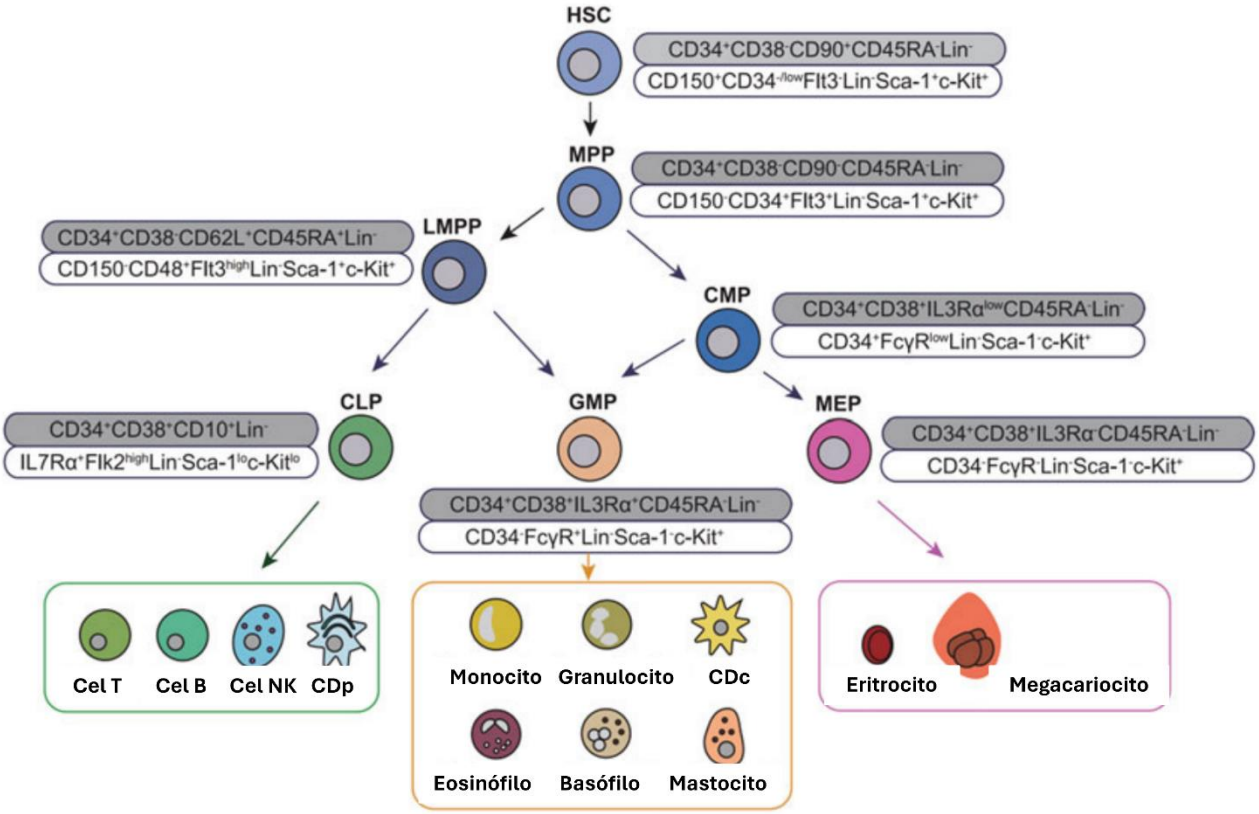


Figura 2: Marcadores de superficie celular en hematopoyesis[18] Modificada de Adv Exp Med Biol. 2023:1442:159-175.

f. Citogenética y aplicación en hemato-oncolología

La citogenética convencional sigue siendo el método más completo para detectar anomalías cromosómicas (figura 3), especialmente las relacionadas con cambios en el número o la estructura de los cromosomas.[19]

Estas alteraciones pueden ejercer su efecto mediante la ganancia o pérdida de material genético o mediante cambios estructurales o regulatorios provocados por la reubicación de segmentos cromosómicos (figura 4). [19]

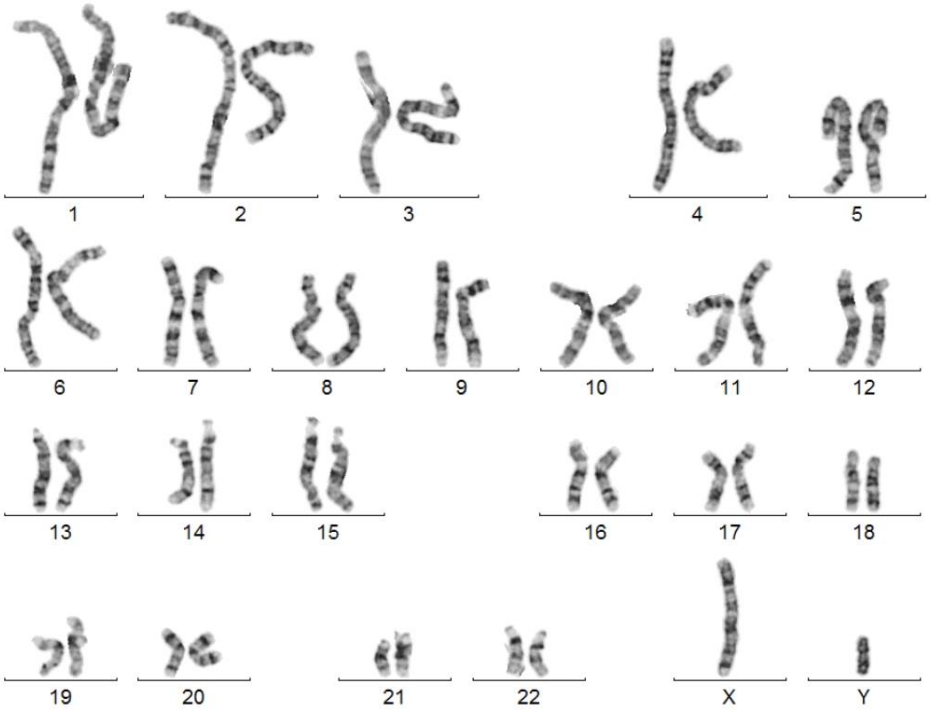


Figura 3. Cariograma correspondiente a 46,XY (masculino); obtenida del 2 de Citogenética de HIMFG.

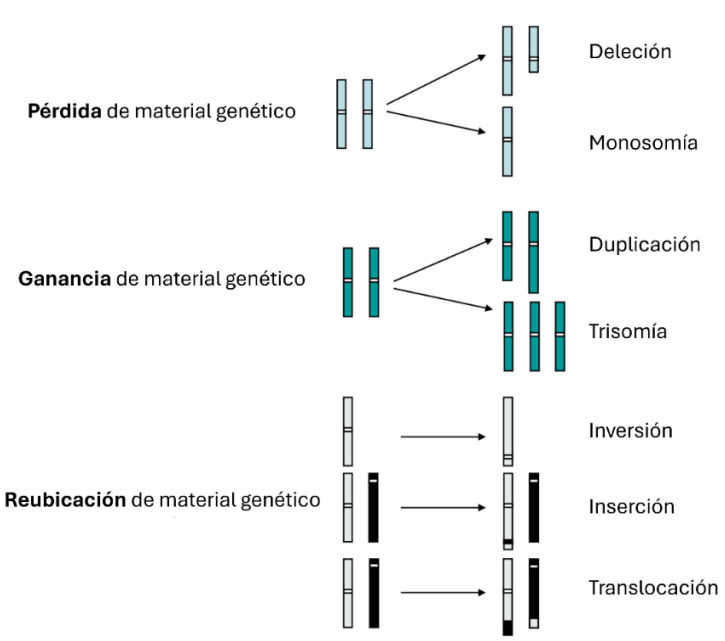


Figura 4: Alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales[19] Modificada de Heim, S. (2015).

Sin embargo, ciertas cuestiones técnicas asociadas con la citogenética, como la necesidad de muestras frescas y las dificultades para identificar rearreglos estructurales debido a la limitada resolución de las técnicas tradicionales de tinción (tabla 5), han motivado un mayor uso de técnicas complementarias, como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), Microarreglos cromosómicos (CMA), Secuenciación Masiva en Paralelo (NGS) y Mapeo Óptico del Genoma (MOG).[18]

Tabla 5. Ventajas y desventajas del análisis citogenético[20]

Ventajas	Desventajas
Descripción general del cariotipo completo	Requiere tejido fresco
Puede detectar rearreglos complejos	Traslocaciones equilibradas
Hallazgos inesperados	Trabajo intensivo
Proporciona una evaluación general del genoma completo y ayuda a dirigir análisis posteriores (sondas específicas para FISH y/o PCR)	Índice mitótico bajo (falta de células en división en tumores de bajo grado o tumores con baja fracción de proliferación)
	Proceso largo
	Técnicamente difícil: presencia de múltiples líneas celulares anormales, complejidad del patrón cromosómico
	Requiere personal altamente calificado
	No se pueden detectar deleciones pequeñas
	Fallo del cultivo (falta de células viables, sobrecrecimiento bacteriano, estimulación de elementos benignos no neoplásicos, error de muestreo)

La Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH), se trata de una técnica de citogenética molecular en la que se emplean sondas DNA marcadas que se unen a una secuencia de DNA específica y son visibles mediante fluorescencia. Es una técnica rápida y sensible, especialmente útil para identificar anormalidades cromosómicas recurrentes. Suele ser más efectivo que los métodos tradicionales para detectar pequeñas alteraciones genéticas que no son evidentes en el análisis morfológico. Además, puede confirmar reordenamientos cromosómicos sospechados previamente en estudios microscópicos. [20]

Sin embargo, este método por sí solo no detectara anomalías adicionales o múltiples clones. Por lo tanto, en la mayoría de los casos clínicos, el FISH se utiliza como complemento al análisis citogenético convencional.[20]

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede incrementar notablemente la sensibilidad en la detección de anomalías cromosómicas. La PCR puede detectar anomalías en muestras de médula ósea o sangre a un nivel de 1 en 10^5 a 1 en 10^6 células normales. La alta sensibilidad de la PCR permite que se realicen pruebas en pacientes en remisión clínica para detectar enfermedad residual mínima.[20,21]

La técnica de PCR puede mejorar significativamente la capacidad de detectar anomalías cromosómicas. Con esta técnica, es posible identificar anormalidades en muestras de médula ósea o sangre incluso cuando hay una baja proporción de células anormales, hasta en una de cada cien mil a un millón de células normales. Esta alta sensibilidad permite realizar pruebas en pacientes que están en remisión clínica para detectar la presencia mínima de enfermedad residual.[20,21]

El uso de Microarreglos Cromosómicos (CMA) para analizar el número de copias del genoma, está ganando importancia en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hematológicas y diversos trastornos. Esta tecnología de alta resolución permite genotipificar todo el genoma utilizando polimorfismos de un solo nucleótido. Varios estudios han confirmado la utilidad diagnóstica de esta tecnología, y muchos laboratorios la ofrecen como una herramienta complementaria a la citogenética convencional y FISH para análisis de perfiles genómicos. [22]

La Secuenciación del Exoma Completo (WES) abarca todas las secuencias exónicas y tiene el potencial de reducir significativamente la variabilidad genómica. Aunque los costos de WES han experimentado una marcada disminución en los últimos cinco años, siguen siendo una limitación en muchas regiones del mundo. [23,24]

Los avances en algoritmos bioinformáticos han mejorado la capacidad del WES para detectar la mayoría de las variaciones en el número de copias (CNV), aunque su eficacia varía según la calidad y profundidad de los datos de secuenciación, así como los parámetros de normalización utilizados. [23,24]

Sin embargo, debido a que WES excluye regiones genómicas intrónicas y reguladoras, no puede detectar un importante subconjunto de variantes estrcuturales (SV). Esta deficiencia es relevante, ya que la detección de algunas SV intrónicas es crucial para evaluar ciertos tipos de neoplasias hematológicas. [23,24]

Por lo tanto, aunque WES tiene el potencial de adaptarse rápidamente a nueva información derivada de la investigación traslacional, también carece de la capacidad de detectar todas las anomalías genómicas relevantes. [23,24]

La técnica de Mapeo Óptico del Genoma (MOG) ofrece ventajas significativas en el diagnóstico y clasificación de pacientes con malignidades hematológicas. Al ser capaz de detectar variaciones genómicas complejas y de número de copias en una sola prueba, el MOG proporciona una visión más detallada y precisa de las alteraciones genéticas presentes en los pacientes. Esto permite una mejor clasificación de las enfermedades hematológicas, lo que a su vez puede guiar decisiones terapéuticas más personalizadas y efectivas.[24]

Estas técnicas permiten identificar y complementar el abordaje en búsqueda de anomalías específicas que son útiles en el diagnóstico o tratamiento de trastornos hematológicos. La automatización y la alta sensibilidad han contribuido al creciente interés en las tecnologías de PCR, especialmente para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades. [22,24]

g. Variantes citogenéticas comunes en LMA[25]

El espectro de anomalías cromosómicas asociadas con la leucemogénesis de la leucemia mieloide aguda (LMA) es amplia y heterogénea en comparación con la leucemia mieloide crónica y otras neoplasias mieloides. Con frecuencia se detectan translocaciones cromosómicas recurrentes como t(8;21), t(15;17) e inv(16), pero también existen cientos de otras aberraciones cromosómicas poco comunes de la LMA.

Dentro de las variantes citogenéticas que se consideran de buen pronóstico en la leucemia mieloide aguda en la edad pediátrica podemos encontrar:

Traslocación (8;21)(q22;q22): Rearreglo *RUNX1-RUNX1T1*[25]

Es una de las translocaciones cromosómicas más comunes en la LMA, permitiendo su diagnóstico independientemente del recuento de blastos en sangre periférica o médula ósea.

Se encuentra en el 5-10% de los casos de LMA, principalmente en individuos jóvenes y se correlaciona con la clasificación M2. Esta translocación suele presentarse con anomalías cromosómicas adicionales, y en algunos casos puede involucrar otros cromosomas.

Implica los genes *RUNX1* y *RUNX1T1*, generando el transcrito de fusión RUNX1-RUNX1T1 que inhibe la apoptosis al aumentar la expresión de BCL2 (figura 5).

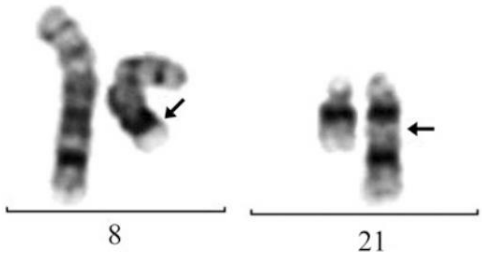


Figura 5. Cariograma parcial que muestra t(8;21)(q22;q22). Las flechas indican los puntos de ruptura (tomada de John J. Yang, et al. Cytogenetic Abnormalities in AML)

Inversión 16: (p13.1q22) o Translocación (16;16)(p13.1;q22): Rearreglo *CBFB-MYH11*[25]

Alteraciones del cromosoma 16 se encuentran hasta en el 5-8% de pacientes con LMA y se asocian a subtipos específicos como M4 con eosinofilia, M2 y M5.

La inv(16) suele estar acompañada de anomalías citogenéticas secundarias (40%). Las anormalidades adicionales comunes son +22, +8, del(7q) y +21 (figura 6).

Estas aberraciones cromosómicas involucran los genes *CBFB y MYH11*, formando el transcrito de fusión CBFB-MYH11.

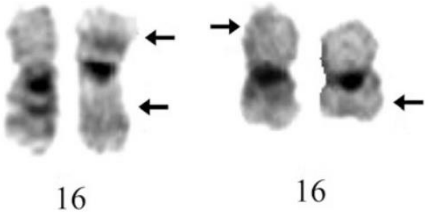


Figura 6. Cariograma parcial que muestra inv(16)(p13.1q22) en el panel izquierdo y t(16;16)(p13.1;q22), las flechas indican los puntos de ruptura (tomada de John J. Yang, et al. Cytogenetic Abnormalities in AML)

Por otro lado, algunas variantes citogenéticas asociadas a un mal pronóstico o con mayor tasa de recaída al tratamiento son:

Monosomía del 5 o deleción 5q[25]

Se puede observar en todas las LMA, sin embargo, es mucho más frecuente en la M6.

La monosomía del 5/del(5q) junto con la monosomía del 7/del(7q) representan las anomalías citogenéticas más comunes en SMD y AML relacionados a tratamiento, son fuertemente asociados a exposición previa a agentes alquilantes.

La LMA con deleción de (5q) o monosomía 5 (-5) se asocia con un pronóstico muy malo, similar a la LMA con anomalías cromosómicas complejas, monosomía 7 (-7) y t(9;22) (figura 7).

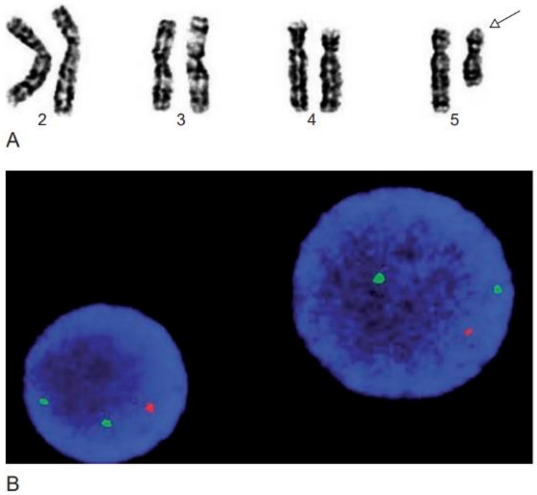


Figura 7. Cariograma parcial que muestra del(5q) en el panel A y en el panel B, FISH en interfase para *EGR1*. (tomada de Gorczyca, W. *et.al.* 2008)

Monosomía del 7 o deleción 7q[25]

La pérdida de material del brazo largo del cromosoma 7 o la monosomía completa del mismo cromosoma es un hallazgo frecuente en pacientes con LMA y se ha asociado a una pobre respuesta al tratamiento y a un mal pronóstico.

Es el hallazgo citogenético más común en pacientes pediátricos con SMD (figura 8).

Los niños con LMA y monosomía 7 tienen mala supervivencia libre de enfermedad cuando se trata con métodos convencionales quimioterapia, inmunosupresión o medidas de apoyo.

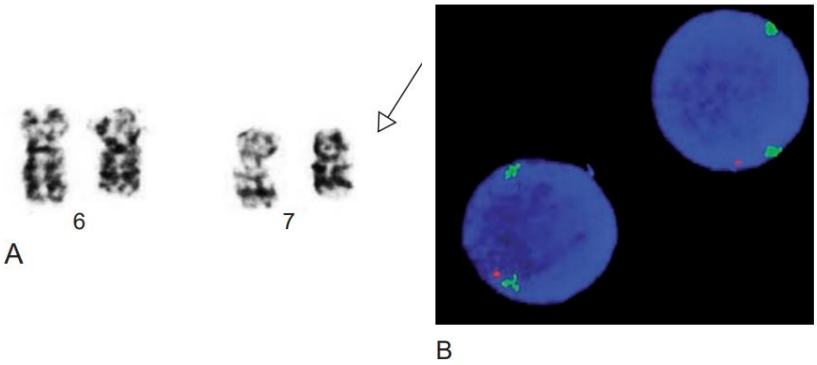


Figura 8. Cariograma parcial que muestra del(7q) en el panel A y en el panel B, FISH en interfase para CEP7/D7S522 (tomada de Gorczyca, W. *et.al.* 2008)

Rearreglos 11q23 o rearreglos de *KMT2A*[25]

Las anomalías de 11q23 son alteraciones citogenéticas recurrentes observadas tanto en la LMA como en la LLA.

El gen *MLL (KMT2A)* ubicado en 11q23 se describe como el principal gen que en el que se detectan reordenamientos, en aproximadamente el 5% de la LMA. El reordenamiento de *MLL* se correlaciona morfológicamente con los subtipos M4 y M5 de la FAB, y en términos generales se asocia con un mal pronóstico.

Se ha identificado que los reordenamientos de MLL ocurren principalmente a través de deleciones terminales de 11q23, inversiones de 11q y translocaciones recíprocas con alrededor de 80 genes de fusión diferentes.

h. Variantes citogenéticas comunes en LLA

I. LLA-B

Translocación (9;22)(q34;q11.2), cromosoma Philadelphia o fusión *BCR-ABL1*[26]

Es una de las anomalías genéticas más comunes observadas en la leucemia linfoblástica aguda de células B, presente en cerca del 25% de los casos en adultos y aproximadamente en el 5% de los casos en niños con LLA-B.

La translocación resulta en una quinasa ABL1 constitutivamente activa. Se activan múltiples vías de señalización río abajo, incluidas las vías RAS/MEK/ERK (activación de factores de transcripción, incluido NF-kB), PIK-3/AKT (crecimiento celular, supervivencia celular e inhibición de la apoptosis) y JAK-STAT (crecimiento y supervivencia celular).

Reordenamiento *KMT2A (MLL*) o translocación variable con el cromosoma 11 (11q23.3)[26]

El reordenamiento del gen *KMT2A* en el cromosoma 11, identificado como t(v;11q23.3), junto con una variedad de genes de fusión asociados, es una anomalía citogenética recurrente que ocurre con mayor frecuencia en edades muy tempranas.

Es más común que este reordenamiento se presente como t(4;11), lo que conduce a la fusión KMT2A-AFF1 (MLL-AF4). En general, la presencia del reordenamiento de *KMT2A* se asocia con un pronóstico poco favorable, siendo particularmente sombrío en el caso de la LLA-B infantil.

Translocación (12;21)(p13.2;q22.1) *ETV6/RUNX1*[26]

Esta translocación conduce a la fusión de los genes *ETV6-RUNX1,* está presente en aproximadamente el 25% de los casos de LLA infantil, donde se asocia con un excelente pronóstico. Se trata de una translocación críptica que no es detectable mediante citogenética convencional y requiere un estudio FISH para su diagnóstico.

Translocación (1;19) *TCF3/PBX1*[26]

Con dicha translocación se presenta una fusión entre el gen *TCF3* (también conocido como *E2A*) en el cromosoma 19 y el gen *PBX1* en el cromosoma 1.

Representa aproximadamente el 6% de los casos de LLA-B infantil y es menos común en adultos. Este subtipo no parece tener relevancia pronóstica.

Según la 5ta edición de la Clasificación de Tumores Hematolinfoides de la Organización Mundial de la Salud de 2022, las neoplasias de precursores de células B se categorizan en función de los cambios de ploidía, como la hiperdiploidía y la hipodiploidía, además de los cambios en la estructura cromosómica o la presencia de otras variantes genéticas (Figura 9). [26,27]

Hiperdiploidía[26]

Las células blásticas leucémicas en este subtipo tienen más de 50 cromosomas (generalmente menos de 66). Se observa en aproximadamente el 25% de los niños, pero no es común en adultos.

Las copias adicionales de los cromosomas 4, 14, 21 y X son las más comunes, y las anomalías estructurales son poco frecuentes.

Estos casos presentan un inmunofenotipo típico de LLA-B. El pronóstico de la LLA-B hiperdiploide es muy favorable, con una tasa de curación superior al 90% en los niños.

Hipodiploidia[26]

Las células blásticas de LLA-B hipodiploide, por definición, contienen menos de 46 cromosomas. Este subtipo ocurre en aproximadamente el 5% de los casos de LLA-B tanto en niños como en adultos.

La LLA hipodiploide se ha subdividido en subtipos basados en el número de cromosomas:

A. Baja hipodiploidía (definido como 33-39 cromosomas) presenta variantes patogénicas en el gen *TP53* en más del 90% de los casos, y la mayoría también muestra monosomía del cromosoma 17 según estudios citogenéticos.
B. La LLA cercano a haploide con 23-29 cromosomas a menudo presenta variantes patogénicas en el gen *RAS*, deleciones de *IKZF3* o alteraciones en los receptores de tirosina cinasa.
C. LLA con alta hipodiploidía alta con 40-43 cromosomas y las LLA casi diploides con 44-45 cromosomas, siendo estas últimas las que tienen un mejor pronóstico en comparación con los otros subtipos.

En algunos casos, la hipodiploidía puede no ser detectada por citogenética convencional si el clon hipodiploide bajo o cercano a haploide ha experimentado endoduplicación, lo que resulta en un aumento del número de cromosomas, y debe sospecharse en casos de discrepancia en el número de cromosomas entre estudios de FISH y citogenéticos.[26, 27]

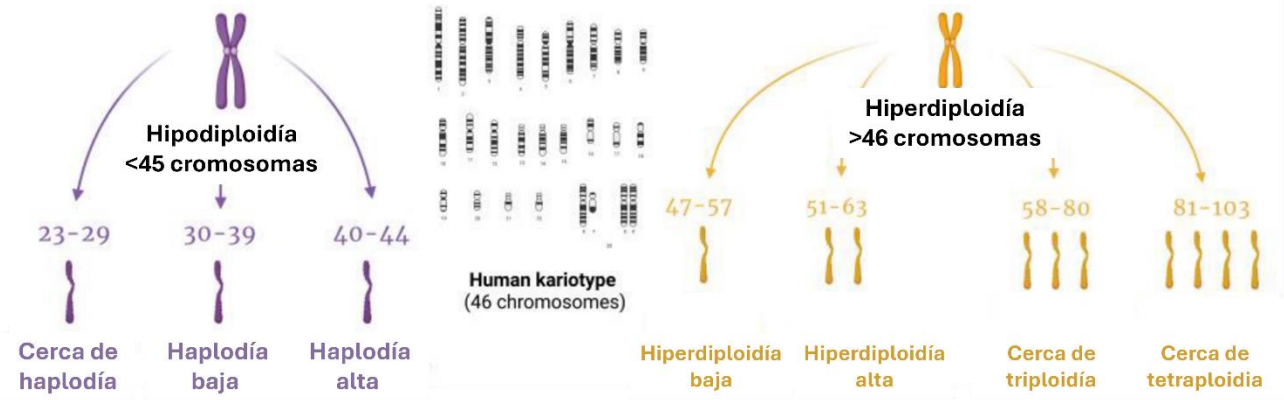


Figura 9. Clasificación de acuerdo a ploidía. Modificada de Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 8764

II. LLA-T[26]

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de tipo pro-T y pre-T se ha reclasificado bajo el subtipo de leucemia T precursora temprana (LLA-ETP). Este subtipo constituye entre el 10 y el 13% de los casos de LLA-T en niños y entre el 5 y el 10% en adultos.

Las alteraciones citogenéticas se presentan en aproximadamente el 50-70% de los casos de LLA-T. Frecuentemente implican reordenamientos de los genes del receptor de células T (TCR) alfa y delta, seguidos por anormalidades en los genes TCR beta y gamma.

Sin embargo, en hasta el 20% de los casos también se encuentran reordenamientos simultáneos del gen IGH. Los genes más comúnmente afectados son los factores de transcripción *TLX1* (también conocido como *HOX11*) en 10q24, presente en el 7% de los casos pediátricos y el 30% de los casos adultos, y *TLX3*, presente en el 20% de los casos en niños y en entre el 10% y el 15% de los casos en adultos.

Otros genes involucrados incluyen *KMT2A* (*MLL*), *MYC, TCF3, TAL1, STIL, PICALM, MLLT10, NUP98, LCK, LMO, LYL1, RBTN1 y RBTN2.* Las alteraciones en el gen *TLX1* están asociadas con un pronóstico favorable.

La fusión *PICALM-MLLT10* (también conocida como *CALM-AF10*) resultante de la t(10;11)(p12;q14) es una de las fusiones recurrentes en LLA-T, pero también se observa en LMA y leucemia de linaje mixto. El pronóstico de los pacientes con esta fusión puede variar dependiendo del inmunofenotipo y de la presencia de mutaciones en *EZH2*.

Una fusión *NUP214-ABL1*, que produce una tirosina cinasa activada de manera constitutiva, se ha encontrado en LLA-T y en LLA similar a Ph y puede ser tratada con inhibidores de tirosina cinasa.

A menudo, se requieren estudios de secuenciación de nueva generación (NGS) para identificar estas fusiones génicas en la LLA-T, ya que muchos de estos reordenamientos no se detectan mediante cariotipo convencional.

Sin embargo, debido a la complejidad de la base genética para el desarrollo de neoplasias hematológicas, existen muchos otros rearreglos genómicos que es posible encontrar en los pacientes con estos padecimientos.

En las tablas 6, 7 y 8, así como en la figura 10, se describen las alteraciones citogenéticas más frecuentes en la LLA, LMA y SMD.[27]

Tabla 6. Características citogenéticas, moleculares y clínicas de las aberraciones cromosómicas asociadas a la leucemia mieloide aguda (LMA)[19]

Alteración cromosómica	Hallazgos moleculares	Sexo	Edad	Características clínicas	Pronóstico
t(1;16)(p31;q24)	*NFIA/CBFA2 T3*	M>F	1	Eritroleucemia	Pobre
t(1;11)(p32;q23)	*MLL/EPS15*	F=M	7	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica, *de novo*	No claro
t(1;22)(p13;q13)	*RBM15–MKL1*	F>M	<1	LMA megacarioblástica, no relacionada con síndrome Down	Intermedio
t(1;11)(q21;q23)	*MLL–MLLT11*	F=M	2	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica, *de novo*	Favorable
t(4;11)(q21;q23)	*MLL–AFF1*	F>M	<1	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica	Pobre
t(5;11)(q31;q23)	*MLL–ARHGAP26*	M>F	<1	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica, *de novo*	No claro
t(5;11)(q35;p15)	*NUP98–NSD1*	M>F	<15	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica, *de novo*	Pobre

t(5;17)(q35;q21)	*NPM1–RARA*	F=M	<15	LMA promielocítica, no bastones de Auer	Favorable
t(7;12)(q36;p13)	Disregulación *MNX1*	F=M	<1	Diferenciación minima/sin maduración	Pobre
inv(8)(p11q13)	*KAT6A–NCOA2*	F>M	15	Eritrofagocitosis, monoblástica	Pobre
Rearreglo t(10;11)(p12;q14)	*MLL–MLLT10*	M>F	2	Monoblástica, *de novo*	Pobre
t(11;12)(p15;p13)	*NUP98–KDM5A*	F=M	2	LMA megacarioblástica, no relacionada con síndrome Down	Pobre
t(11;17)(q23;q12)	*MLL–MLLT6*	F=M	15	Mielomonocítica/monoblástica/monocítica, *de novo*	Pobre
t(11;19) (q23;p13.3)	*MLL–MLLT1*	F=M	7	LMA relacionada a tratamiento, mielomonocítica/monoblástica/monocítica	Pobre
inv(16)(p13q24)	*CBFA2T3–GLIS2*	F>M	1	LMA megacarioblástica, no relacionada con síndrome Down	Intermedio Pobre
t(X;6)(p11;q23)	*MYB–GATA1*	M>F	<1	LMA basofílica, hiperhistaminemia	Poco claro
Rearreglo Xq24/11q23	*MLL–SEPT6*	F=M	<1	LMA con maduración, mielomonocítica, *de novo.*	Poco claro

Tabla 7. Características citogenéticas, moleculares y clínicas de las aberraciones cromosómicas asociadas a la leucemia linfoide aguda (LLA).[19]

Alteración cromosómica	Genes relacionados	Características clínicas	Pronóstico
Alta hiperdiploidía	Ganancia de cromosomas completos.	Pre-B temprana CD10+	Favorable
Casi haploide		Pre-B	Pobre
Alta hipodiploidía		Linaje B y T	Pobre
Trisomía 5	Ganancia de cromosoma 5 completo	Pre-B	Pobre
t(1;5)(q21;q33)	*MEF2D, CSF1R*	Pre-B	Incierto
t(1;7)(p32;q34)	*TAL1, TRB*	LLA linaje T	Mejor que otras variantes en linaje T
t(1;14)(p32;q11)	*TAL1, TRA/TRD*	LLA linaje T	Mejor que otras variantes en linaje T
t(2;8)(p11;q24)	*IGK, MYC*	LLA linaje B maduro	Favorable
t(4;11)(q21;q23)	*AFF1, MLL*	Pre-B temprana. CD10-, CD19+.	Pobre
del(5)(q32q33.3)	*EBF1, PDGFRB*	Pre-B	Pobre
t(5;9)(q22;q34)	*SNX2, ABL1*	Pre-B	Pobre
t(5;14)(q35;q32)	*TLX3, BCL11B*	LLA linaje T	Pobre
t(6;11)(q27;q23)	*MLLT4, MLL*	Linaje B y T	Pobre
del(7)(p12.2p12.2)	*IKZF1*	Común, pre-B	Pobre

t(7;19)(q34;p13)	*TRB, LYL1*	Linaje T	Pobre
t(8;14)(q24;q32)	*MYC, IGH*	LLA linaje B maduro	Variable
dic(9;12) (p11~12;p11~13)	*PAX5, ETV6*	Pre-B	Favorable
dic(9;20)(p13;q11)	*PAX5*	Pre-B	Pobre
t(9;22)(q34;q11)	*ABL1, BCR*	Pre-B	Extremadamente pobre
t(10;11)(p12;q14)	*MLLT10, PICALM*	LLA linaje T	Pobre
t(10;14)(q24;q11)	*TLX1, TRA/TRD*	LLA linaje T, temprana cortical.	Mejor que otras variantes en linaje T
t(11;19)(q23;p13.3)	*MLL, MLLT1*	Pre-B	Pobre
t(12;21)(p13;q22)	*ETV6, RUNX1*	Pre-B	Favorable
Rearreglos 15q13~15	-	Linaje B	Estándar
t(17;19)(q22;p13)	*HLF, TCF3*	Pre-B, variante de (1;19)	Extremadamente pobre
del(21)(q22.2q22.2)	*ERG*	Pre-B	Bueno
iAMP21	*?RUNX1*	Común, Pre-B	Extremadamente pobre
t(X;14)(p22;q32)/ t(Y;14)(p11;q32)	*IGH, CRLF2*	Pre-B	Intermedio
del(X)(p22.33p22.33)/ del(Y)(p11.32p11.32)	*P2RY8, CRLF2*	Pre-B	Intermedio

Tabla 8. Alteraciones cromosómicas recurrentes en los síndromes mielodisplásicos (SMD).[19]

Enfermedad	Alteración cromosómica	Frecuencia	Genes relacionados	Consecuencia
SMD	**Desbalanceados**			
	+8	10%		
	−7/del(7q)	10%		
	del(5q)/t(5q)	10%		
	del(20q)	5–8%		
	−Y	5%		
	i(17q)/t(17p)	3–5%	*TP53*	Pérdida de función, respuesta a daño de DNA
	−13/del(13q)	3%		
	del(11q)	3%		
	del(12p)/t(12p)	3%		
	del(9q)	1-2%		
	idic(X)(q13)	1–2%		
	Balanceados			
	t(1;3)(p36.3;q21.3)	1%	*MMEL1/RPN1*	Disregulación de *MMEL1* Activación transcripcional
	t(2;11)(p21;q23.3) /t(11q23.3)	1%	*KMT2A/MLL*	Proteína de fusión KMT2A Regulación transcripcional alterado
	inv(3)(q21.3q26.2) /t(3;3)(q21.3;q26.2)	1%	*RPN1/ MECOM/EVI1*	Incremento en la expresión de *MECOM*.

				Regulación transcripcional alterada
	t(6;9)(p22.3;q34.1)	1%	*DEK/NUP214*	Proteína de fusion Proteína de poro nuclear.
SMD relacionado a tratamiento	−7/del(7q)	50%		
	del(5q)/t(5q)	40–45%		
	dic(5;17)(q11.1–13.3; p11.1–13)	5%	*TP53*	Pérdida de función, respuesta a daño de DNA
	der(1;7)(q10;p10)	3%		
	t(3;21)(q26.2;q22.1)	3%	*MECOM/ RUNX1*	Gen de fusión *MECOM-RUNX1*, lo que lleva a la pérdida de *RUNX1* y sobreexpresión de *MECOM*. Transcripcional alterada regulación
	t(11;16)(q23.3;p13.3) /t(11q23.3)	2%	*KMT2A/MLL CREBBP*	Proteína de fusión KMT2A Regulación transcripcional alterado

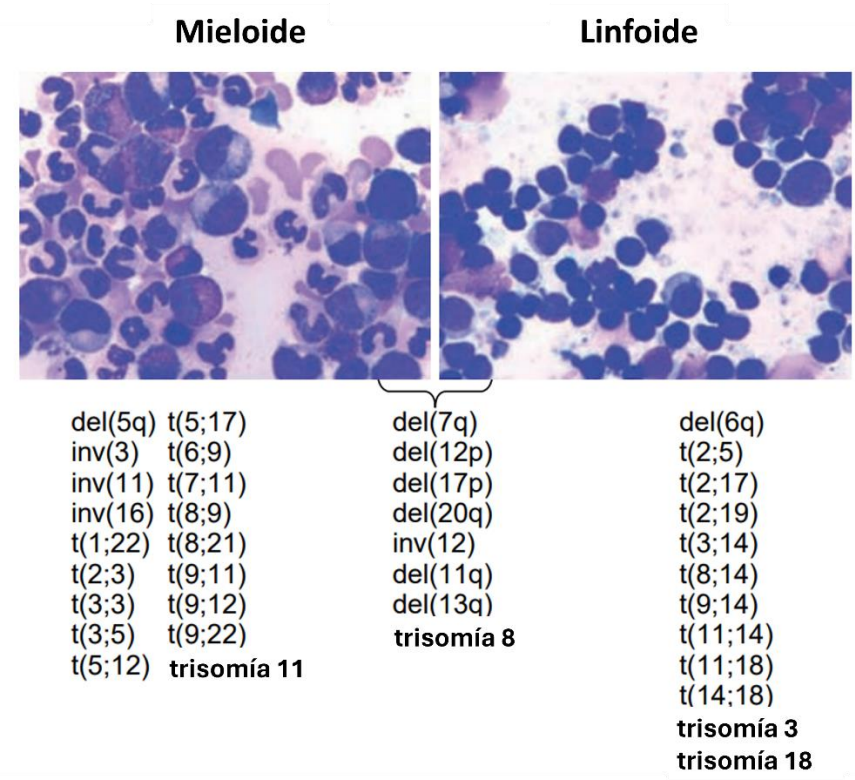


Figura 10. Alteraciones cromosómicas frecuentes en trastornos hematooncológicos mieloides y linfoides, así como su morfología. Modificada de Heim, S., & Mitelman, F. (2015). Cancer cytogenetics.

7. Planteamiento del problema

Las neoplasias hematológicas son la causa principal de mortalidad infantil en México y a nivel mundial.

La leucemia aguda es la causa más frecuente de mortalidad por enfermedad entre los niños a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo. En estas regiones, el incremento de casos con mal pronóstico y riesgo de recaídas tempranas ha destacado la urgencia de abordar esta enfermedad como una prioridad de salud pública.

En México, la leucemia aguda constituye la mitad de los casos de leucemia infantil, con una incidencia estimada de aproximadamente 49.5 nuevos casos por millón de habitantes al año.

El Hospital Infantil de México Federico Gómez se considera un centro de referencia a nivel nacional para patologías oncológicas y de alta complejidad. Se estima que al año se reciben alrededor de 300 a 400 pacientes de recién diagnóstico oncológico, por lo que es de suma importancia el abordaje diagnóstico que se establece.

Según las guías internacionales, dentro de las herramientas necesarias para la estadificación de las neoplasias hematológicas es necesario realizar un inmunofenotipado, búsqueda de las alteraciones cromosómicas más frecuentes mediante diferentes metodologías (panel de translocaciones) y el cariotipo en médula ósea, ya que estos sirven como herramientas diagnósticas, pronósticas y algunos casos para la elección de un tratamiento individualizado, según sea la alteración citogenética encontrada.

8. Pregunta de investigación

¿Cuáles serán las variantes citogenéticas identificadas en el cariotipo en médula ósea de pacientes pediátricos con sospecha de neoplasia hematológica en el período comprendido de enero 2023 a abril 2024 atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

9. Justificación

La mayoría de los cánceres de la sangre poseen reordenamientos estructurales cromosómicos recurrentes, por ejemplo, deleciones, inversiones, isocromosomas y translocaciones. Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides, las anomalías cromosómicas recurrentes únicas se asocian con características clínicas y patológicas, así como un impacto en el pronóstico. [1]

En México, el cáncer infantil representa la principal causa de mortalidad por enfermedad en niños de 5 a 14 años. Se estima que cada año se presentan 2,000 casos nuevos en menores de 18 años, siendo la leucemia linfoide aguda la neoplasia más frecuente.

La implementación de estrategias para el diagnóstico preciso y oportuno de la LLA, como lo es el cariotipo en médula ósea, influye de forma directa en la identificación y supervivencia de estos padecimientos.

Al no realizarse de forma rutinaria en nuestra Institución, desconocemos el impacto de la realización del cariotipo en médula ósea y la búsqueda intencionada de variantes citogenéticas específicas de la sospecha neoplásica.

La identificación de variantes citogenéticas específicas, junto con pruebas complementarias como lo son la realización de inmunofenotipo y panel de alteraciones cromosómicas, nos ayudará a mejorar el diagnóstico de los pacientes por medio de cambios en su clasificación, manejo y pronóstico, así como brindar una atención de mayor calidad a ellos y sus familias.

La implementación del cariotipo en médula ósea nos podría acercar a lo descrito por los estándares internacionales para un adecuado abordaje y seguimiento nuestros pacientes con neoplasias hematológicas.

10. Hipótesis

Se encontrarán alteraciones citogenéticas en el cariotipo en médula ósea de pacientes con neoplasias hematológicas similar a lo reportado en la literatura internacional.

11. Objetivos

a. Generales:

Describir las variantes citogenéticas encontradas en el cariotipo de médula ósea de pacientes pediátricos con neoplasias hematológicas referidos por parte del servicio de Hematología y Oncología Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en el periodo comprendido de enero 2023 a abril 2024.

b. Específicos:

Determinar la frecuencia de las alteraciones encontradas en cariotipo de médula ósea.

Relacionar los resultados del cariotipo en médula ósea con las indicaciones de envío de las muestras.

12. Métodos

a. Diseño de estudio

- Descriptivo, observacional, transversal y prospectivo.

b. Población de estudio

- Pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en el período comprendido entre enero 2023 a abril de 2024, con sospecha diagnóstica de neoplasia hematológica.

c. Criterios de inclusión

- Pacientes de primera vez con sospecha diagnóstica de neoplasia hematológica que contaran con aspirado de médula ósea para análisis citogenético
- Edad menor a 18 años

d. Criterios de eliminación

- Pacientes con muestra de médula ósea coagulada
- Pacientes con muestra médula ósea contaminada
- Pacientes en que los que la muestra de médula ósea se haya utilizado otro anticoagulante que no sea heparina de sodio.

e. Tamaño de la muestra

- No probabilístico, por conveniencia

Se realizó la digitalización de la información recabada de cada paciente mediante una base de datos en un documento de Excel para el posterior análisis de los datos.

f. Procedimiento

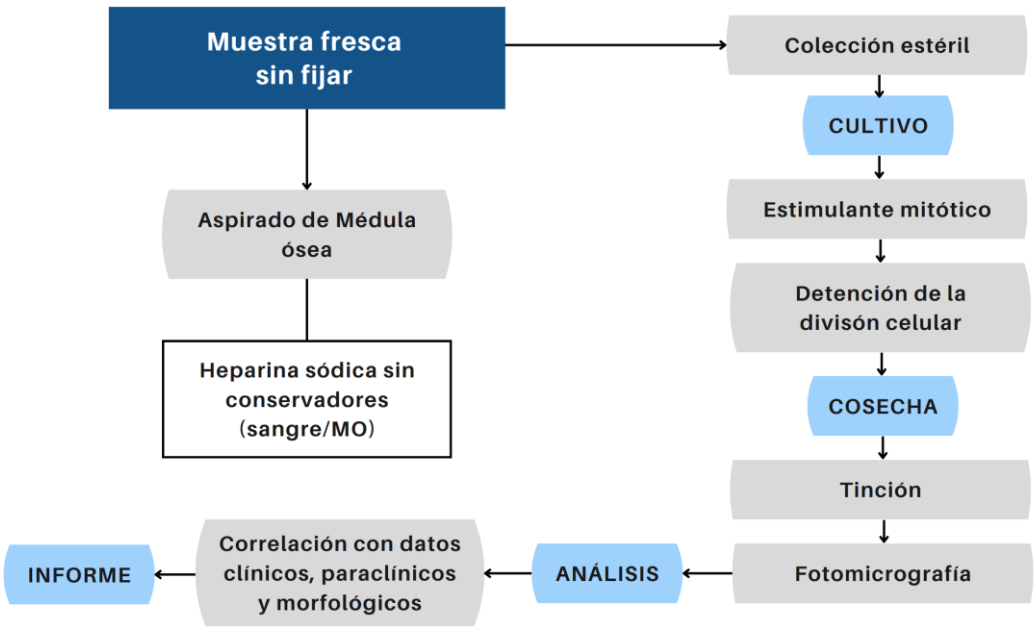


Figura 11: Algoritmo para análisis citogenético

13. Análisis estadístico

- Descripción de frecuencias
- Medidas de tendencia central
- Los datos obtenidos se graficaron en tablas de frecuencia, gráficas de barras, gráficas de pastel.

14. Tabla 9. Descripción de variables

Variable	Categoría	Definición	Escala de medición
Edad	Cuantitativa Continua	Tiempo que ha vivido una persona	Años meses
Sexo	Cualitativa Dicotómica	Condición orgánica, masculina o femenina	Masculino Femenino
Neoplasia hematológica	Cualitativa Categórica	Enfermedad neoplásica que afecta los órganos encargados de producir células sanguíneas, caracterizada por la proliferación maligna de leucocitos	Leucemia linfoide aguda Leucemia mieloide aguda Síndrome mielodisplásico
Alteración cromosómica numérica	Cualitativa Categórica	Pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas	Euploidías Aneuploidías
Euploidía	Cualitativa Categórica	Variaciones en el número normal de cromosomas (2n), pero que son múltiplos del número haploide	Hipodiploide Hiperdiploide
Aneuploidía	Cualitativa Categórica	Ganancia o pérdida de cromosomas individuales, no múltiplos del número haploide	Trisomía Monosomía
Alteración cromosómica estructural	Cualitativa Categórica	Cambios en la forma o estructura de los cromosomas	Deleción Duplicación Inversión Inserción Isocromosoma Cromosoma en anillo Cromosoma marcador Translocación
Deleción	Cualitativa Dicotómica	Existe pérdida de material cromosómico	Presente Ausente
Inversión	Cualitativa Dicotómica	Reorganización genética dentro de un mismo cromosoma que implica dos rupturas separadas para crear un segmento que se invierte 180°	Paracéntrica Pericéntrica
Translocación	Cualitativa Dicotómica	Intercambio de segmentos	Presente Ausente

		cromosómicos entre dos o más cromosomas	
Cromosoma marcador	Cualitativa Dicotómica	Cromosomas pequeños cuya identificación es difícil debido a su tamaño y forma	Presente Ausente

15. Resultados del estudio

En el periodo comprendido de enero 2023 hasta abril del 2024 se recibieron 40 muestras de médula ósea para el estudio de cariotipo de pacientes provenientes de los servicios de Hematología y Oncología pediátrica, del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dichas muestras cumplían con las características para la obtención de éstas, descritas en el anexo 1.

Al ser un laboratorio que realiza cariotipo en sangre periférica y poder implementar e incorporar como estudio el cariotipo en médula ósea, primero se estandarizó el tiempo de cultivo para la obtención de material celular y que se tuviesen metafases con la calidad para ser analizadas.

De las 40 muestras recibidas, las primeras 23 muestras se procesaron dependiendo de la cantidad de muestra enviada y de la sospecha de diagnóstico, de forma directa, así como, uno o dos tubos más en un cultivo celular con medio MarrowMax® en un tiempo de 24, 48 y/o 72 horas, con el objetivo de estandarizar el tiempo necesario de cultivo para las obtener crecimiento celular y metafases.

Para implementar de manera rutinaria el estudio, se estableció que las muestras se procesarían en dos tubos con dos tiempos diferentes, un tubo con proceso directo y un tubo en cultivo de 48 horas, siempre y cuando tuvieran suficiente cantidad, por lo que, las 17 muestras restantes se procesaron de esa manera (el proceso completo de la técnica se encuentra en los anexos 2 al 8).

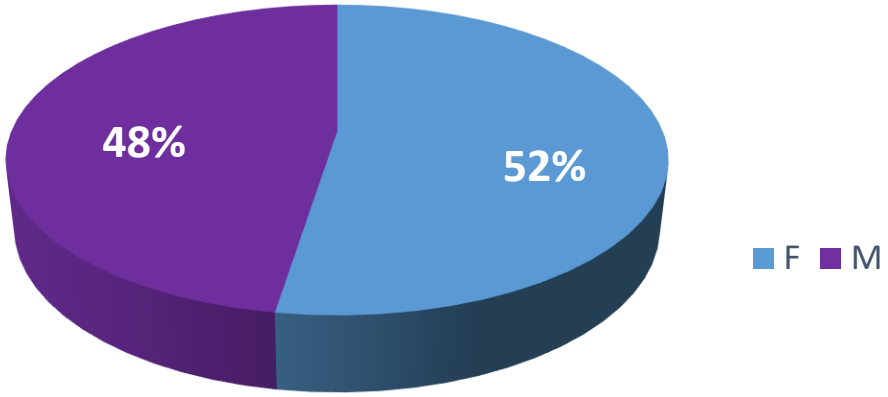
Todo el material obtenido, fue posteriormente teñido con bandas GTW (Tripsina - Wright - Giemsa) y analizado al microscopio

Para reportar los resultados se utilizó el Sistema Internacional de Citogenómica Humana 2020 (ISCN), según el apartado descrito para las neoplasias (capítulo 11).[28]

Los cariotipos de los pacientes se clasificaron de acuerdo con la ploidía (hipodiploide, diploide, hiperdiploide); así como la presencia o ausencia de alteraciones cromosómicas, y en el caso de presentar un cariotipo alterado, estas alteraciones se subdividieron en numéricas y estructurales.

a) Sexo

De los 40 pacientes estudiados en este trabajo, se encontró una proporción casi similar para el sexo femenino (F) y masculino (M), siendo para el primero un total de 21 casos correspondiente a un 52%, y para el sexo masculino 19 casos, con un porcentaje de 48% (gráfica 1).

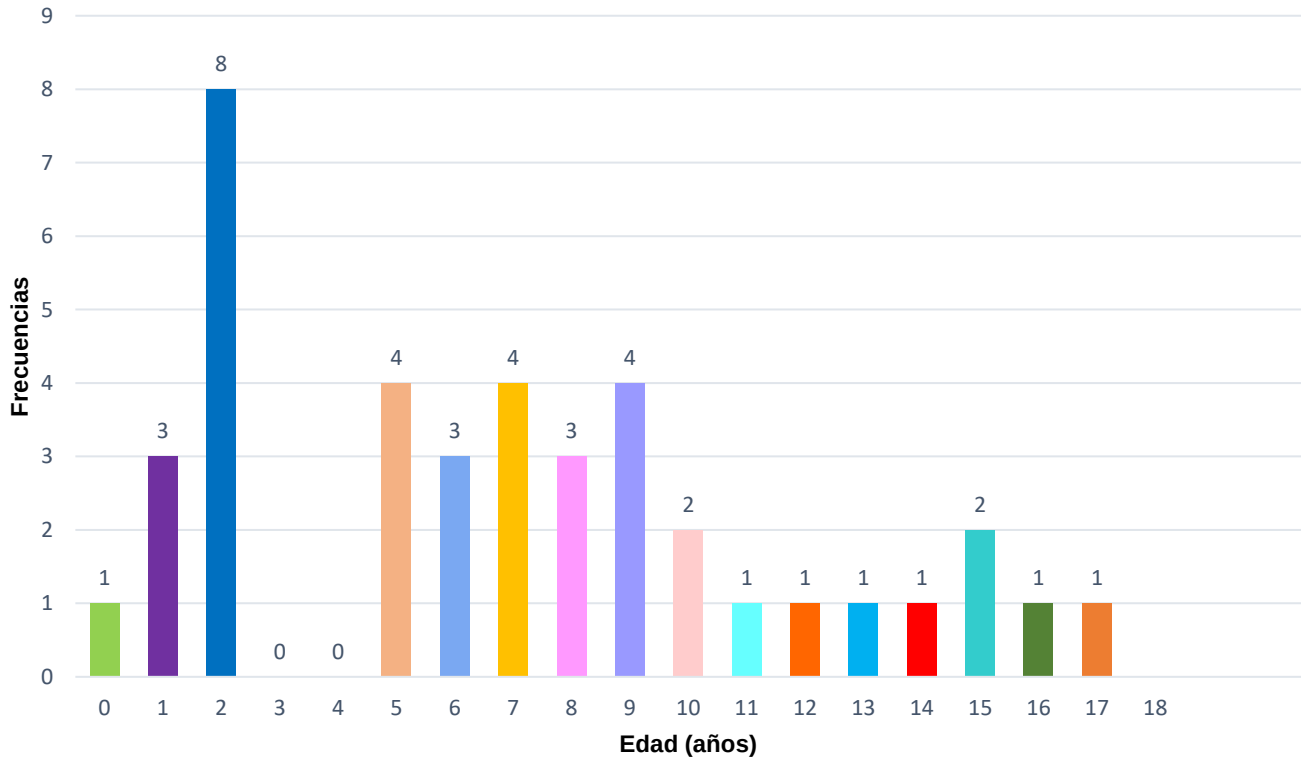


Gráfica 1. Porcentaje de sexos afectados.

b) Edad

Se encontró que la edad más frecuente de los pacientes estudiados en este periodo fue de 2 años, siendo 8 casos incluidos en ese grupo, Los segundos grupos en frecuencia fueron aquellos de 5, 7 y 9 años, con 4 casos en cada grupo (gráfica 2).

El promedio calculado para la edad fue de 6.95 años.



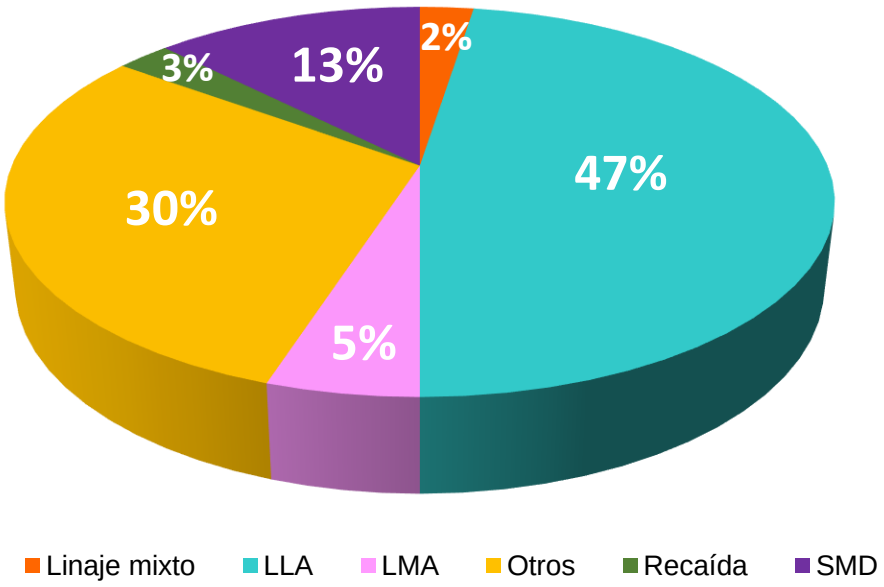
Gráfica 2. Frecuencia de casos por edad medida en años.

c) Indicación de cariotipo en médula ósea

Se refirieron diferentes patologías para la realización de cariotipo en médula ósea, desde aquellos pacientes en los que se contaba con la sospecha de alguna neoplasia hematológica (LLA, LMA, leucemia aguda de linaje mixto), síndromes mielodisplásicos, sospecha de recaída de leucemia previa; hasta entidades no oncológicas que se agruparon el en apartado de “otros”.

Dentro del grupo de las de neoplasias hematológicas, la indicación de envío más frecuente fue la sospecha de leucemia linfoblástica aguda con 19 pacientes.

Por otro lado, en el grupo de “otros” se incluyeron diferentes indicaciones, como síndromes hipereosinofílicos (2 casos), 1 caso con diagnóstico de síndrome de falla medular, 1 caso de anemia aplásica grave, 1 caso de mielofibrosis primaria, 1 caso de linfoma T cutáneo, 1 caso con sospecha de enfermedad de Gaucher y 1 caso con diagnóstico de trombocitopenia inmune crónica (gráfica 3)



Gráfica 3. Indicaciones para la realización de cariotipo en médula ósea.

d) Estudios complementarios

Se incluyó en esta categoría aquellos pacientes en los que se realizó la inmunotipificación por medio de citometría de flujo y el panel de translocaciones disponible en nuestro hospital HEMAVISION®, en el cual se pueden detectar 27 transcritos resultantes de 27 variantes citogenéticas diferentes, relacionadas con diversas neoplasias hematológicas (anexo 9).

De los 40 pacientes recibidos en este periodo, el 62.5% contaba con la realización de inmunofenotipo, en el 32.5% no se tenía solicitado y en el 5% restante, no se pudo llevar a cabo el estudio por tratarse de una muestra coagulada.

Por otro lado, de los 40 pacientes estudiados, en el 30% no se había solicitado panel de translocaciones, en un caso no se pudo acceder a dicha información porque se trataba de un paciente externo y en el 67.5% restante, se realizó y se contaba con resultado de dicho estudio.

De los 27 pacientes en los que se tenía un resultado del panel de translocaciones, 5 pacientes (20.8%), presentaron una alteración citogenética detectable mediante la reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), el resto de los pacientes (22 casos) tuvieron un resultado negativo para este panel.

Las alteraciones encontradas en estos pacientes fueron las siguientes:

1. t(12;21)(p13,q22)
2. t(1;19)(q23;p13)
3. inv(16)(p3;q22)
4. t(9;22)(q34;q11)
5. t(1;19)(q23;p13)

e) Crecimiento

Se obtuvo un crecimiento celular en 38 muestras (95% del total de casos). Sin embargo, en 4 muestras a pesar de contar con crecimiento, no se encontraron metafases adecuadas para llevar a cabo un análisis. En 34 casos, lo que corresponde al 89%, sí se obtuvo un resultado, y dos de estas 34 muestras continúan siendo analizadas.

De ser posible el análisis bajo el microscopio se debe realizar en 25 metafases, sin embargo, no todas las metafases obtenidas tuvieron un buen extendido para realizar un análisis completo de los cromosomas (figura 12), en esos casos, solo se reportaron las células que se pudieron observar adecuadamente en las laminillas de cada paciente.

El nivel de resolución fue de 300 hasta 425 bandas, por ello no se descartan otro tipo de alteraciones estructurales menores a 10 Mb por este método.

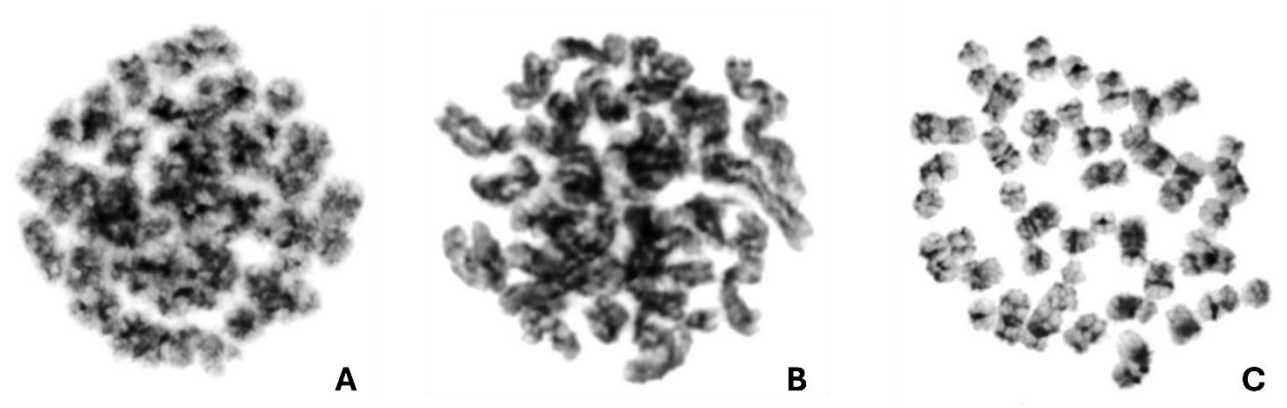


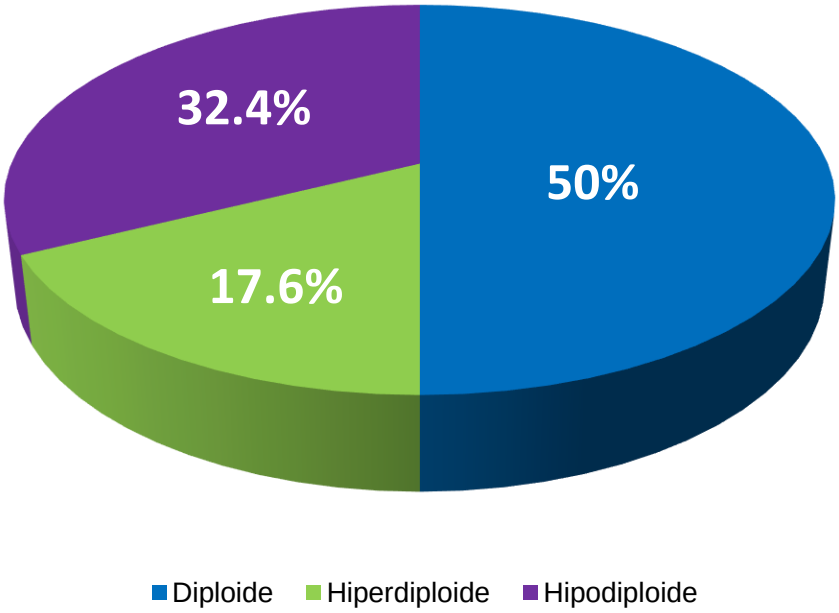
Figura 12. La imagen A y B muestran metafases que no es posible analizar; la imagen C, muestra una metafase analizable.

f) Ploidía

De las 34 muestras en las que se contó con metafases para el análisis, se encontró que 17 muestras contaban con un cariotipo diploide (2n=46 cromosomas), lo que corresponde al 50% de esta muestra. Por otro lado, 11 muestras (34.7%) evidenciaron una hipodiploidía, es decir, se presentaba un numero cromosómico menor al diploide (<46 cromosomas). Sólo en 6 muestras (17.6%) se encontraron células con un complemento cromosómico mayor al diploide normal, lo que de denomina hiperdiploidía (>46 cromosomas) (gráfica 4).

Es importante señalar que el hecho de que se tratara de un cariotipo diploide considerado como "normal", no descarta que ese paciente pudiera presentar alguna alteración estructural, ya que algunas de estas alteraciones no modifican el número diploide.

En la figura 13 y 14, se ejemplifica la clasificación de las ploidías y como se visualizaban las metafases para en el caso de ser hipodiploide, diploide e hiperdiploide.



Gráfica 4: Clasificación de acuerdo con la ploidía, representada en porcentaje

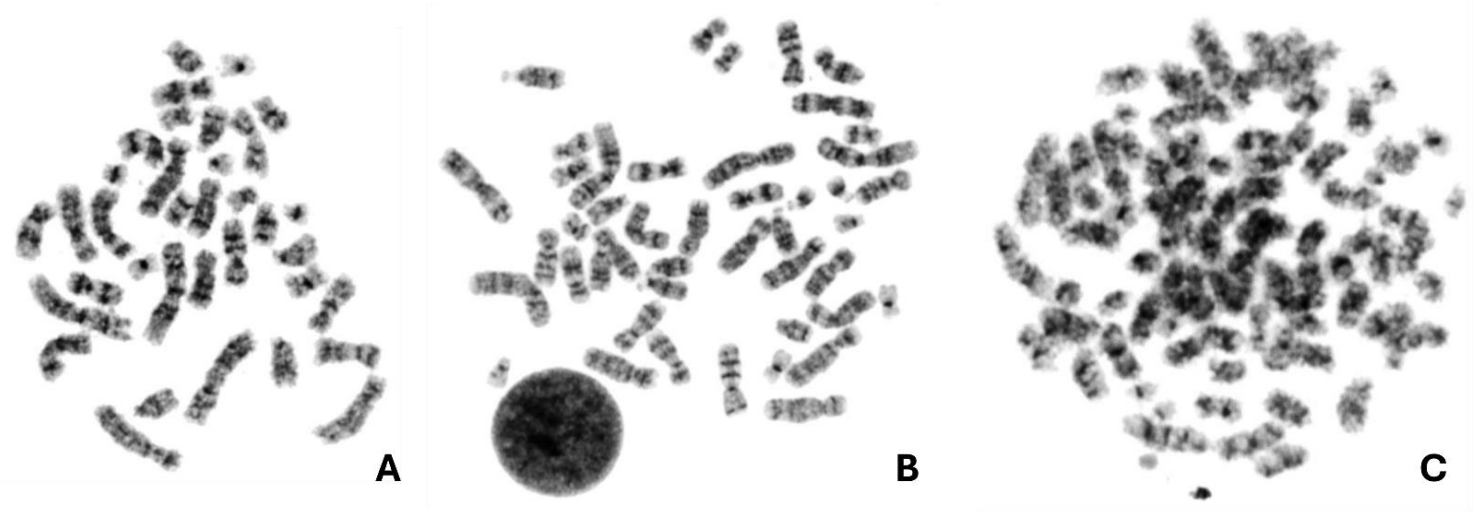


Figura 13. En la imagen A se muestra una metafase con hipodiploidía, en la imagen B una metafase diploide y en la imagen C, una imagen hiperdiploide.

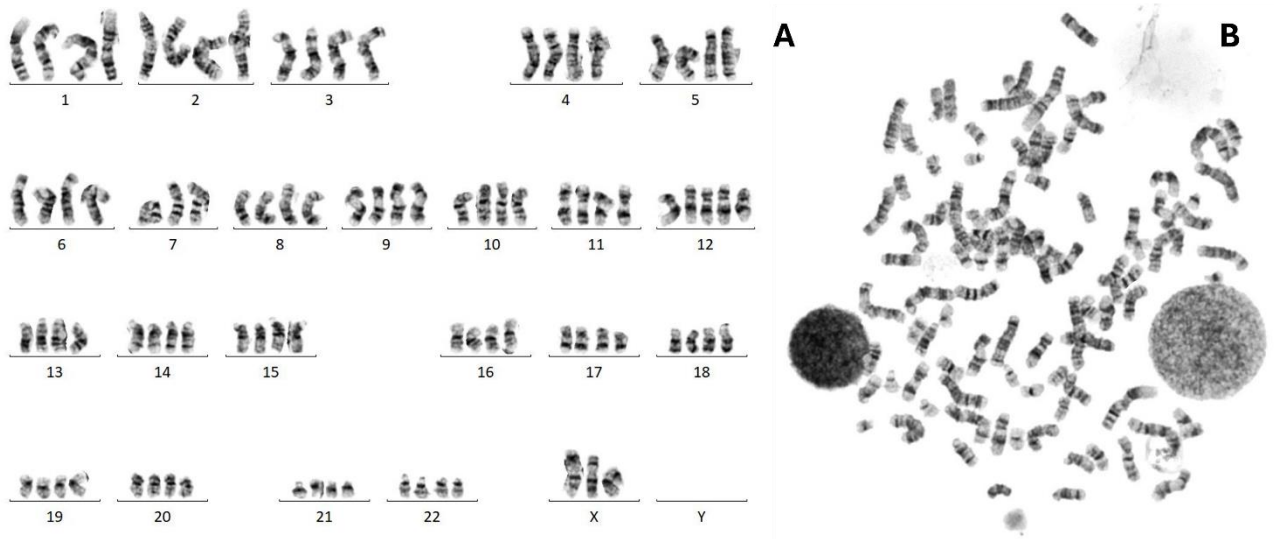
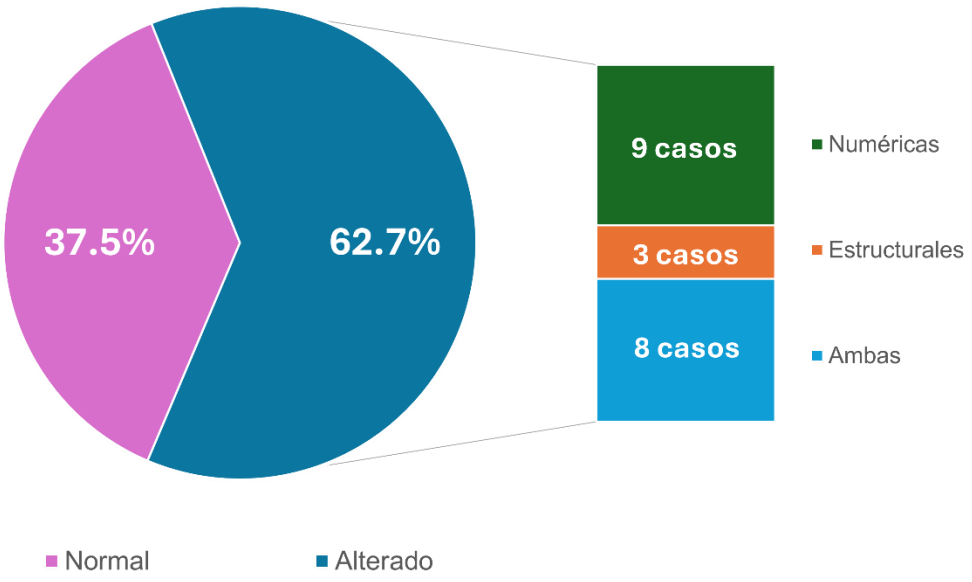


Figura 14. Cariograma de paciente con cariotipo hiperdiploide en el que se observa en la mayoría de los cromosomas 4 copias, por lo cual se clasifica como cercano a la tetraploidía (imagen A), metafase el mismo paciente (imagen B).

g) Cariotipos

De las 34 muestras obtenidas, aún 2 pacientes se encuentran en análisis citogenético, por lo cual aún no se cuenta con un resultado del cariotipo y no se incluyeron en este trabajo.

De los 32 restantes, se reportó como un cariotipo normal en 12 pacientes, lo que corresponde al 37.5% de la muestra. En el 62.7% restante (20 pacientes), se reportó como un cariotipo alterado, ya sea alteraciones estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones o material adicional), numéricas (monosomías o triploidías) o la coexistencia de ambas (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de resultados normales y alterados, así como, tipo de alteraciones cromosómicas encontradas.

De los resultados de los cariotipos alterados se seleccionaron los siguientes casos para una descripción más detallada.

- **Paciente con síndrome de Down y deleción del brazo largo del cromosoma 7**

Se trataba de un paciente femenino de 1 año, previamente referida a esta Institución por Consulta Externa por sospecha de mielofibrosis, sin embargo, a la valoración por parte de Hematología se encuentra con 36% de blastos en sangre periférica y DHL en 440 UI/L. Por lo que se inició abordaje por sospecha de leucemia aguda con riesgo de lisis tumoral.

Esta paciente contaba con diagnóstico extrainstitucional de síndrome de Down, sin referir resultado de variante citogenética, así como hipotiroidismo congénito en tratamiento y control.

Se realizó aspirado de médula ósea con toma de biopsia, y se solicitó la inmunotipificación, el panel de translocaciones HEMAVISION® y cariotipo en medula ósea.

Al extendido en laminilla se observa médula ósea hipocelular +++/ diluida, no se aprecia trauma ni megacariocitos. Bastos: 24%, mieloides 8%, juveniles 4%, bandas: 6%, segmentados: 8%, linfocitos: 48%, monocitos 2%, se describieron los blastos de características mieloides.

El resultado de citometría de flujo reporto 14% de bastos detectados, con un perfil de expresión compatible con marcadores mieloides CD117 66%, CD71 59%,

Se reportó como negativo el resultado obtenido del panel de translocaciones, sin poder identificar ninguna de los 27 transcritos analizados mediante RT-PCR.

Por parte del departamento de Citogenética se realizó el proceso previamente descrito para la obtención de material analizable, y se revisaron 25 metafases con un nivel de resolución de 300 – 400 bandas.

Los resultados fueron los siguientes:

47,XX,del(7)(q22),+21c[20]/47,XX,+21c[5]

En 20 metafases se encontró una deleción del brazo largo del cromosoma 7 en la región 2 banda 2, en las 5 metafases restantes no se evidenció la alteración estructural del cromosoma 7.

En las 25 metafases se encontró una trisomía libre del cromosoma 21, por lo que se denomina una alteración constitutiva (c). Esta alteración numérica se considera concordante con el diagnóstico de síndrome de Down que presenta la paciente, ya que este fenotipo está causado hasta en el 95% de los casos por una trisomía libre del cromosoma 21.

Por otro lado, aunado a la trisomía 21 constitutiva y la deleción de 7q visualizada en 20 células, se encontró que la paciente presentaba más de 2 células con un cariotipo hiperdiploide (>46 cromosomas), por lo cual se consignó dentro de este grupo de acuerdo con su ploidía (figura 15 y 16).

Figura 15: Cariograma en el que se visualiza la copia extra del cromosoma 21(+21) en el recuadro rojo, así como la deleción del brazo largo del cromosoma 7 señalada por la flecha negra (del7q).

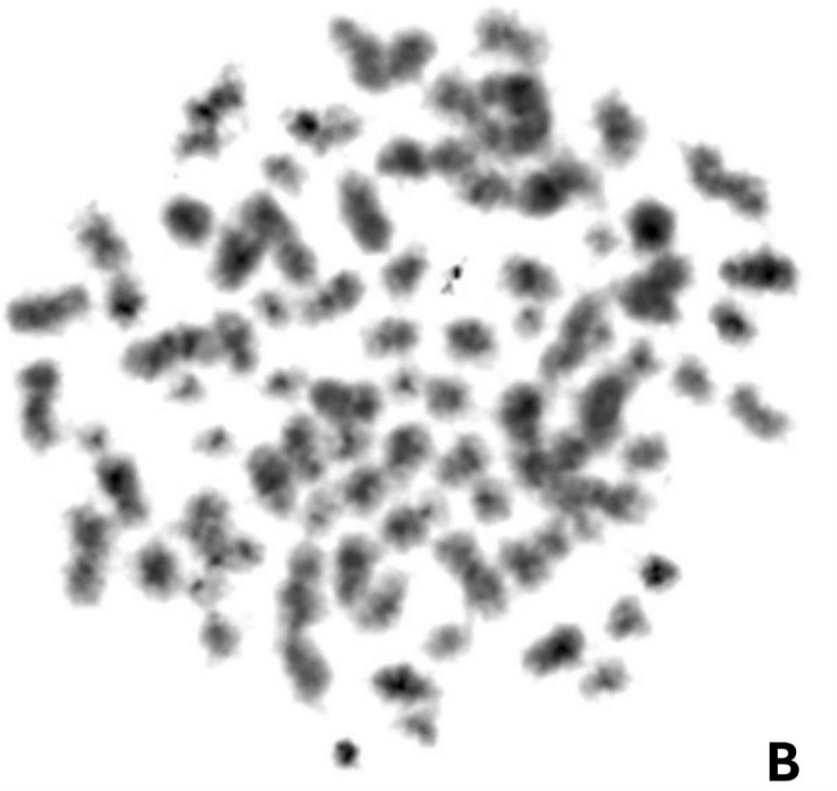


Figura 16: Se visualiza la morfología de algunas células con fenotipo hiperdiploide (>46 cromosomas) encontradas en el cariotipo en médula ósea de la paciente.

- **Paciente con cariotipo complejo e inversión del cromosoma 16**

Se trataba de paciente femenina de 15 años, quién es referida a esta Institución para atención de un centro hospitalario de tercer nivel. En el hospital de origen se inicia abordaje de síndrome infiltrativo por presentar adenopatías retroauriculares, adenopatías cervicales, hepatomegalia, así como un síndrome anémico y hemorrágico, astenia y adinamia.

Dentro de nuestra Institución como abordaje del síndrome infiltrativo, se decidió realizar aspirado de médula ósea con toma de biopsia, se solicitó la inmunotipificación, el panel de translocaciones HEMAVISION® así como el cariotipo en medula ósea.

El resultado de citometría de flujo reporto 45% de bastos detectados, con un perfil de expresión compatible con marcadores mieloides CD13 81% CD117 73%, CD33 69%.

El panel de translocaciones detectó mediante RT-PCR la presencia del transcrito correspondiente a la inversión pericéntrica del cromosoma 16 inv(16)(p3;q22)

Por parte del departamento de Citogenética se realizó el proceso previamente descrito para la obtención de material analizable, y se revisaron 20 metafases con un nivel de resolución de 300 – 400 bandas.

Los resultados fueron los siguientes:

46~48,XX,+8[2],+11[2],?del(11)(q23)[9],?inv(16)(p13q22)[5],+22[3][cp14]/46,XX[5]

Cariotipo compuesto [cp13]:

- 46,XX,?del(11)(q23)[7]
- 46,XX,?inv16(p13q22)[3]
- 47,XX,+11,?del(11)(q23)[1]
- 48,XX,+11,?del(11)(q23),+22[1]
- 48,XX,+8,?inv(16)(p13q22),+22[2]

En 13 de ellas se observó un cariotipo compuesto de 46 a 48 cromosomas que comparten la presencia de los cromosomas 8, 11 y 22 extras en al menos 2 células. Se identificó una probable (?) deleción en los brazos largos del cromosoma 11 en q23 y la presencia de una probable (?) inversión pericéntrica en el cromosoma 16 (figura 17). Solo se incluyeron en la nomenclatura, aquellas alteraciones que se presentaban en al menos dos células y se encuentran descritas en la literatura para la leucemia mieloide aguda.

La detección de la inversión pericéntrica del cromosoma 16 fue concordante mediante la realización de 2 técnicas diferentes, el análisis de metafases por medio del cariotipo en médula ósea (citogenética) y la detección del transcrito mediante del panel HEMAVISION® (molecular).

Por la identificación de la inversión del cromosoma 16, se estadificó a la leucemia mieloide aguda como de bajo riesgo.

Por otro lado, se encontró que la paciente presentaba más de 2 células con un cariotipo hiperdiploide con tendencia hacia los 48 cromosomas, por lo cual se consignó dentro de este grupo de acuerdo con su ploidía.

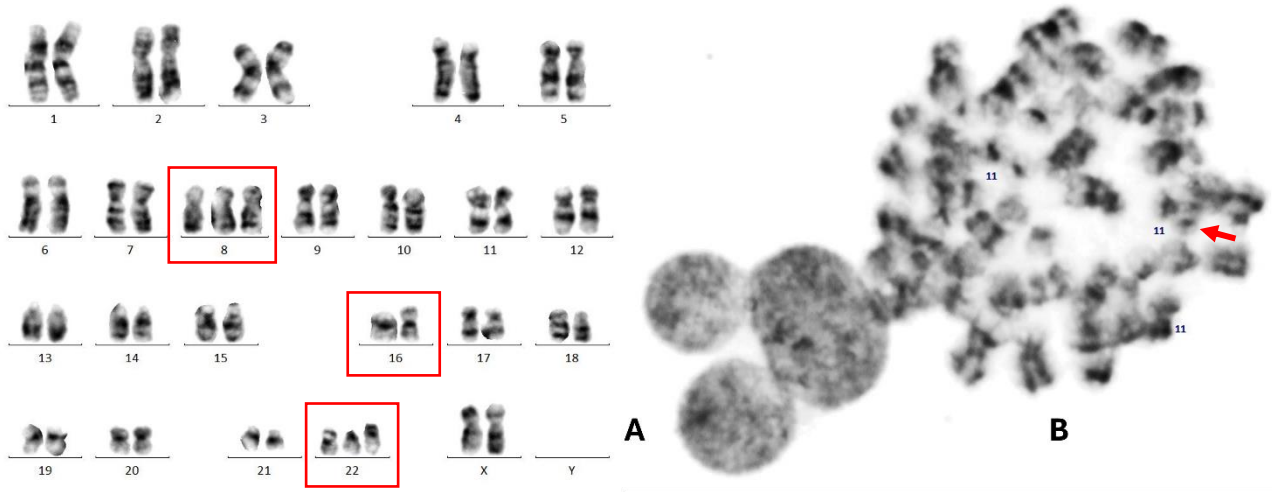


Figura 17. Imagen A, cariograma 48,XX,+8,?inv(16)(p13q22),+22. Imagen B, Metafase 47,XX,+11,?del(11)(q23) la flecha roja señala una probable deleción de brazo largo del cromosoma 11 en q23.

- **Paciente con translocación (9;22)(q34;q11) y monosomía del 9**

Se trataba de un paciente masculino de 7 años, referido a esta Institución por sospecha diagnóstica de leucemia linfoblástica aguda pre-B por inmunofenotipo externo, para abordaje integrar y manejo por unidad médica de tercer nivel.

Presentaba un síndrome anémico y síndrome infiltrativo de 1 mes de evolución, con pérdida de peso inintencionada de más de 10 kilos en el último mes, así como astenia y adinamia, acompañada de nausea, mareos y cefalea.

Como abordaje inicial se solicitó aspirado de médula ósea con toma de biopsia, la inmunotipificación, el panel de translocaciones HEMAVISION® y cariotipo en medula ósea.

El resultado de citometría de flujo reporto 84% de bastos detectados, con un perfil de expresión compatible con marcadores linfoides B CD10 100%, CD19 100%, CD9 100%, CD123 100%, CD22 95%.

El panel de translocaciones detectó mediante RT-PCR la presencia del transcrito correspondiente a la translocación (9;22)(q34;q11)

Por parte del departamento de Citogenética se realizó el proceso previamente descrito para la obtención de material analizable, y se revisaron 15 metafases con un nivel de resolución de 300 – 400 bandas.

Los resultados fueron los siguientes:

45~46,XY,-9[3],der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]/46,XY[11]

Se identificó en 11 células, la presencia de un derivado 22, producto de una translocación entre el brazo largo del cromosoma 9 en la región 3 banda 4 y el brazo largo del cromosoma 22 en la región 1 banda 1 (figura 18).

A su vez, se encontraron 3 metafases con una monosomía del cromosoma 9, lo que resultaba en un cariotipo hipodiploide (figura 19).

La detección de la translocación (9;22) fue concordante mediante la realización de 2 técnicas diferentes, el análisis de metafases por medio del cariotipo en médula ósea (citogenética) y la detección del transcrito mediante del panel HEMAVISION® (molecular).

En estos casos sería ideal la confirmación por medio de la realización de FISH (citogenética molecular), con sonda secuencia específica para esta translocación ya que el impacto en el tratamiento es sumamente importante.

Con base en la identificación de la translocación 9;22 en el paciente, un rearreglo de buen pronóstico de tratarse de una LLM, la leucemia linfoide aguda se clasificó como de alto riesgo, y se inició tratamiento específico con inhibidor de BCR-ABL1.

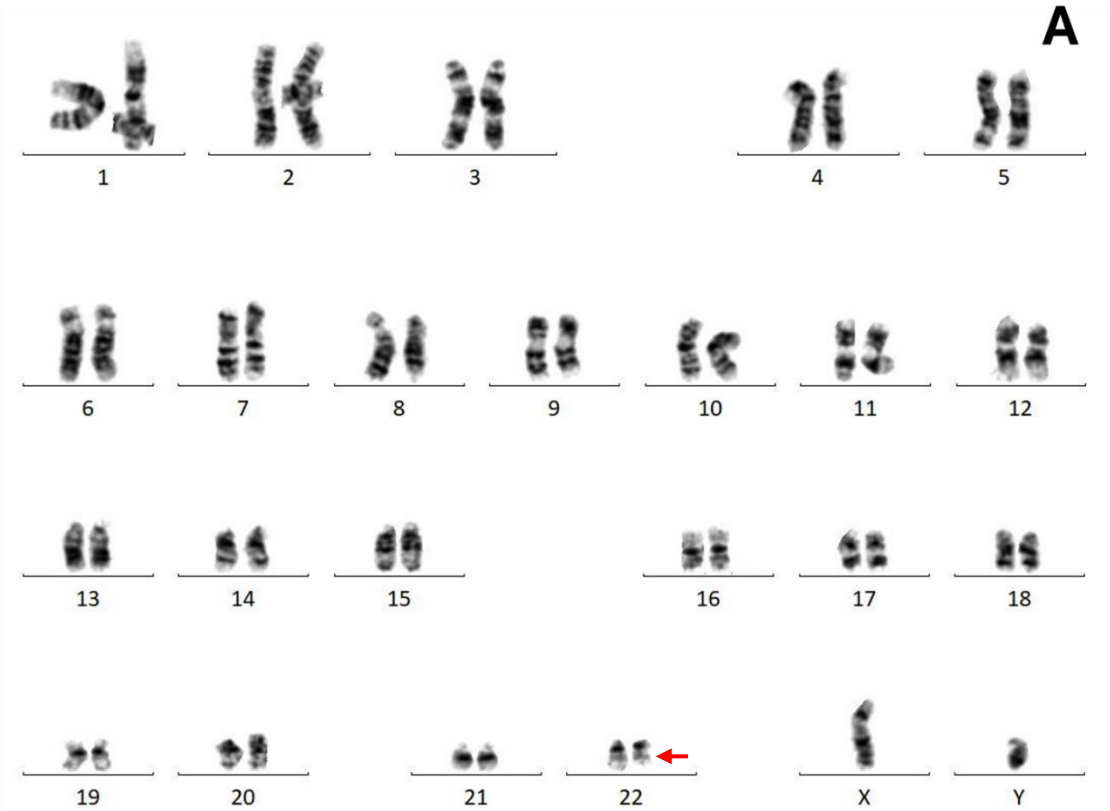


Figura 18. Cariograma del paciente donde se identifica la presencia de un derivativo 22, t(9;22)(q34;q11) flecha roja.

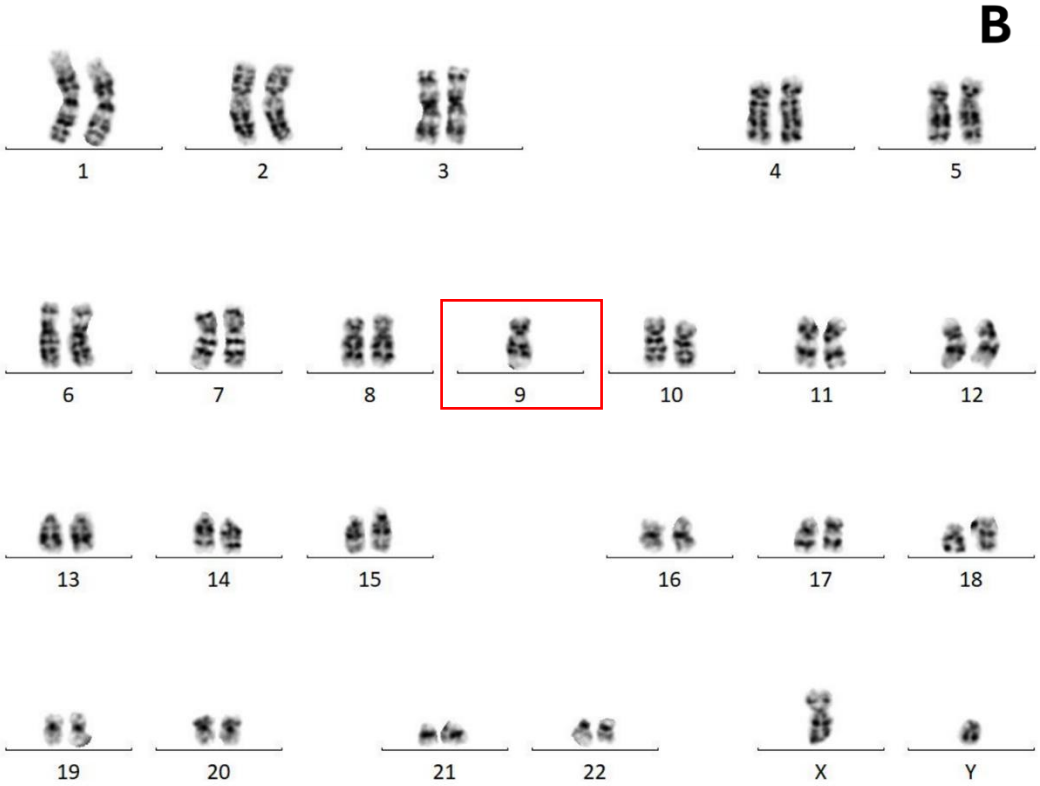


Figura 19. Cariograma del paciente donde se evidencia la monosomía 9, recuadro rojo.

- **Paciente con LMA y deleción del brazo largo del cromosoma 5**

Se trataba de un paciente masculino de 9 años, que era conocido por múltiples servicios en nuestro hospital por presentar los siguientes diagnósticos: diferencia del desarrollo sexual 46,XY, secuelas de labio y paladar fisurado, OP de fisura nasoalveolar y queiloplastia, OP de plastia inguinal bilateral laparoscópica.

Ingresa a la consulta de urgencias por presentar astenia y adinamia de 3 días de evolución, súbita, progresiva. Adenopatías cervicales de 24 horas de evolución, de inicio súbito, progresivas, dolorosas a la palpación, fiebre asociada a piloerección y diaforesis, ictericia y coluria.
Se corroboran las adenopatías cervicales, además de axilares e inguinales, asociadas a hepatomegalia por lo que se inicia abordaje para síndrome infiltrativo versus falla hepática aguda versus síndrome hemofagocítico.

En la citometría de flujo no se detectaron células fenotípicamente compatibles con blastos leucémicos, con una celularidad linfocitos 5.6%, neutrófilos 86%, monocitos 4.7% células rojas binucleadas 3.2%, células progenitoras mieloides 0.44%.

Se reportó como negativo el resultado obtenido del panel de translocaciones, sin poder identificar ninguna de los 27 transcritos analizados mediante RT-PCR.

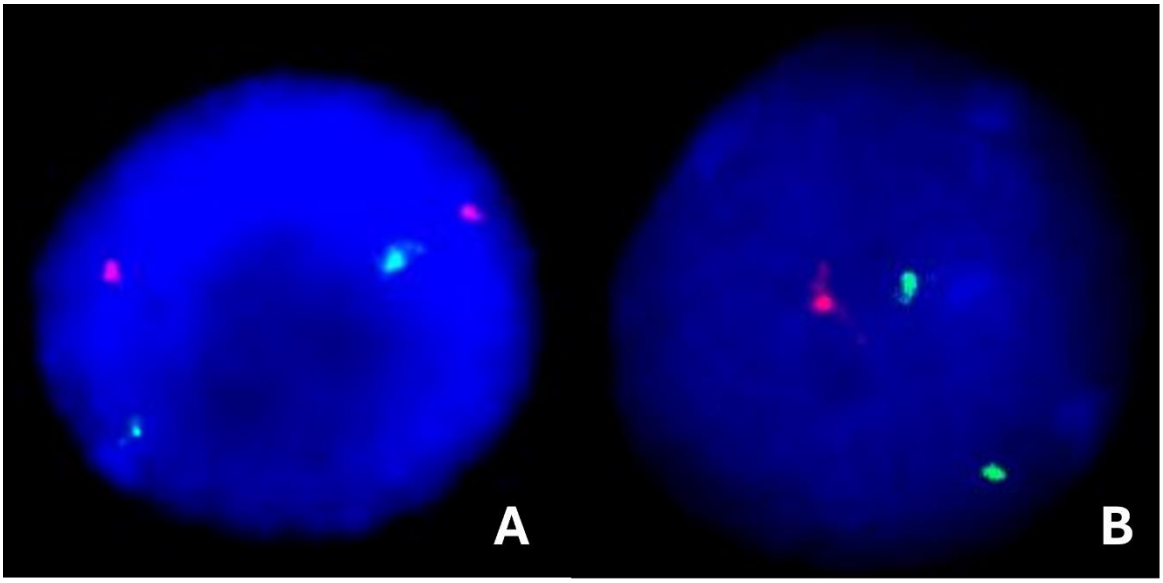
Por parte del Laboratorio de Citogenética, se procesó la muestra de médula ósea, sin obtener metafases para su análisis, sin embargo, se decidió realizar el estudio molecular de Hibridación Fluorescente in situ (FISH), de acuerdo con la frecuencia de las alteraciones citogenéticas reportadas para LMA y la disponibilidad de los reactivos, ya que se utilizaron sondas empleadas para diagnóstico de síndromes de microdeleción (síndrome de Cri-du-Chat y síndrome de Williams).

Se realizó la técnica con las sondas de secuencia única: LSI *EGR1* (5q31) espectro naranja, como sonda control D5S23, D5S721 (5p15.2) espectro verde y LSI D7S486, D7S522 (7q31) espectro verde, como sonda control LSI *ELN* (7q11.23) espectro naranja, ambas de la marca Vysis®, en muestra de sangre periférica, analizándose 250 núcleos interfásicos por cada sonda, encontrando el siguiente resultado de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenómica Humana (2020), para núcleo interfásico:

46,XYc[25].nuc ish(D5S23,D5S721x2,EGR1x1)[3/250],(D7S486,D7S522x2, ELNx2)[250]

El resultado de la hibridación para el cromosoma 5 con la sonda D5S23, D5S721 y *EGR1*, en 247 células analizadas la presencia de ambas señales, mientras que en tres células se observó la ausencia de la sonda *EGR1* (naranja), dado el resultado, se puede observar que en al menos 3 células se observa deleción en el brazo largo del cromosoma 5 en la región q31 (figura 20).

Para el análisis del cromosoma 7 con la sonda D7S486, D7S522 y *ELN* se observó la presencia de ambas señales estudiadas en los brazos largos de ambos cromosomas 7 en 250 células analizadas (figura 21).



,

Figura 20: Núcleos interfásicos con la sonda LSI *EGR1* (5q31) espectro naranja, como sonda control D5S23, D5S721 (5p15.2) espectro verde. Imagen A. Se observa la presencia de las sondas verde (5p15.2) y naranja (5q31) en ambos cromosomas 5. Imagen B. Se observa la ausencia de la sonda naranja *EGR1* (5q31) en uno de los cromosomas 5.

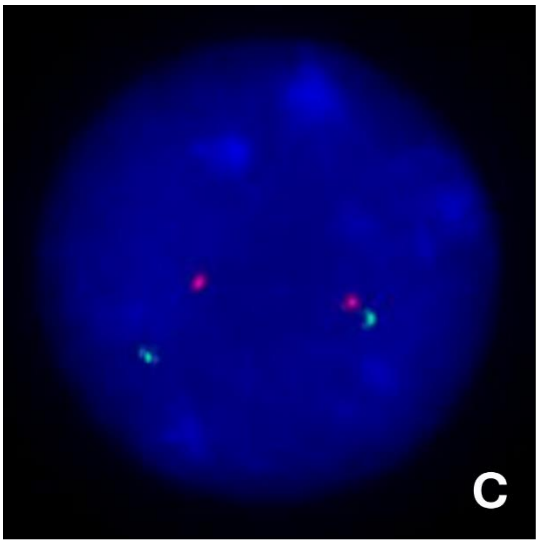


Figura 21: Imagen C. Núcleo interfásico con la sonda LSI D7S486, D7S522 (7q31) espectro verde, como sonda control LSI *ELN* (7q11.23) espectro naranja. Se observó la presencia de dos señales para las sondas naranja (7q11.23) y verde (7q31) de ambos cromosomas 7.

Ante la sospecha de una neoplasia hematológica, por la ausencia de blastos en la citometría de flujo, las manifestaciones atípicas del paciente y los hallazgos en FISH (deleción 5q), no descartamos que pudiera haberse tratado de un síndrome mielodisplásico.

En el anexo 9 se describen todas las variables analizadas de cada una de las muestras de médula ósea.

16. Discusión

Los resultados presentados en este trabajo sobre el proceso y análisis de 40 muestras de médula ósea para la realización de cariotipo en pacientes pediátricos referidos de los servicios de Hematología y Oncología Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez durante el periodo de enero 2023 hasta abril 2024 revelan información significativa sobre la efectividad del proceso y la caracterización citogenética de diversas patologías.

A continuación, se realiza una discusión de los hallazgos principales:

La estandarización del procedimiento de cariotipo en médula ósea fue fundamental para asegurar la calidad del material celular y la obtención de metafases analizables y se basó según las directrices americanas y españolas. [29,30]

Las muestras se estandarizaron mediante el uso de medio MarrowMax® en tiempos de cultivo de 24, 48 y 72 horas para determinar el tiempo óptimo para obtener metafases de calidad. Se estableció un protocolo en el que las muestras se procesaron en dos tubos: uno con proceso directo y otro con cultivo de 48 horas. Este enfoque permitió obtener un crecimiento celular en el 95% de las muestras.

Esta estandarización es crucial para asegurar la reproducibilidad y la calidad del análisis citogenético.[19]

La distribución por sexo de los pacientes fue bastante similar, con 52% de casos femeninos y 48% masculinos. La edad promedio de los pacientes fue de 6.95 años, con una concentración notable de casos en pacientes de 2 años. Este dato es relevante porque la edad puede influir en la presentación y el pronóstico de las neoplasias hematológicas.

Este hallazgo resalta la prevalencia de neoplasias hematológicas en la primera infancia, alineándose con estudios que indican que las leucemias agudas son más comunes en este grupo etario y en términos generales de leucemias sin predilección de sexo.[31]

Las indicaciones para el cariotipo en médula ósea variaron, siendo la sospecha de leucemia linfoblástica aguda (LLA) la más frecuente con 19 casos. Otras indicaciones incluyeron síndromes mielodisplásicos, sospecha de recaídas de leucemias previas y diversas entidades hematológicas no oncológicas.

Sin embargo, es importante considerar que no en todas estas patologías podríamos encontrar alteraciones citogenéticas relevantes para el diagnóstico, por lo cual tener una indicación precisa para la realización de este procedimiento es fundamental para que los resultados obtenidos en este sean de utilidad clínica para el paciente.[32]

Un porcentaje significativo de pacientes (62.5%) contaba con estudios complementarios de inmunofenotipo, mientras que el 67.5% tenía resultados del panel de translocaciones HEMAVISION®. En este panel, 20.8% de los pacientes presentaron alteraciones citogenéticas detectables mediante RT-PCR, incluyendo translocaciones como t(12;21) y t(9;22), comunes en LLA y LMA respectivamente.

Estas herramientas complementarias son esenciales para una caracterización más detallada de las neoplasias hematológicas y pueden influir en el enfoque terapéutico.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que estas técnicas son no son mutuamente excluyentes, ya que existen alteraciones genómicas que pueden ser visibles mediante una u otra técnica y es necesario la realización de alguna otra prueba complementaria (FISH, RT-PCR, NGS o MOG) para confirmar los hallazgos. [33,34]

Se obtuvo crecimiento celular en el 95% de las muestras, aunque solo el 89% de ellas tuvo metafases adecuadas para el análisis. En los casos en los que no se observó material de buena calidad nos subraya la necesidad de continuar optimizando y mejorando las técnicas de cultivo implementando el uso de otros reactivos como el Bromuro de Etidio, que permitan mejorar la resolución, así como usar un tiempo de cultivo diferente a lo empleado en el laboratorio, como la técnica de *overnight* que ha tenido éxito en otros laboratorios. [29,30]

La resolución alcanzada fue de 300 a 425 bandas, limitando la detección de alteraciones estructurales menores a 10 Mb. La calidad de las metafases es un factor crítico, ya que afecta la capacidad de detectar alteraciones cromosómicas presentes. [34]

De las 34 muestras con metafases adecuadas, el 50% presentaba un cariotipo diploide, el 34.7% hipodiploide y el 17.6% hiperdiploide. Estas distribuciones son consistentes con la literatura que asocia ploidías anormales con peor pronóstico en leucemias.

En 32 muestras, 37.5% fueron cariotipos normales y 62.5% alterados, incluyendo tanto alteraciones numéricas como estructurales, siendo lo más frecuente tener cariotipos complejos en los que ambas alteraciones coexistían.

Dado el tamaño limitado de la muestra poblacional analizada y la ausencia de datos sobre la clasificación de riesgo de cada neoplasia, aún no es posible hacer comparaciones con lo documentado en la literatura. Por lo tanto, es crucial seguir utilizando esta técnica en el diagnóstico de los pacientes en nuestro centro médico. Esto nos permitirá generar nuestras propias estadísticas en relación con las anomalías citogenéticas y mejorar así nuestro entendimiento de estas enfermedades en nuestra población específica. La identificación de alteraciones estructurales y numéricas es vital para el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias hematológicas.

En el paciente con Síndrome de Down y deleción del cromosoma 7q, se detectó una deleción del brazo largo de este cromosoma en 20 de 25 metafases, junto con una trisomía 21 en todas las metafases, confirmando el diagnóstico de síndrome de Down. Hallazgo relevante por la trisomía 21 y deleción 7q, que implica un mal pronóstico en leucemias. Este caso resalta la importancia de la citogenética en la detección de alteraciones complejas que pueden influir en el manejo clínico.

El síndrome de Down, causado por la trisomía del cromosoma 21, está asociado con un mayor riesgo de desarrollar leucemias, especialmente leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia megacarioblástica aguda (LMCA), debido a anomalías genéticas y moleculares que afectan la hematopoyesis y la regulación del ciclo celular.[35]

Los niños con síndrome de Down tienen un riesgo 10-20 veces mayor de desarrollar LLA. con una edad de presentación comúnmente entre los 2 y 4 años. Por otro lado, el riesgo para presentar una leucemia mieloide aguda, específicamente M7 o megacarioblástica, es 500 veces mayor en los primeros 5 años de vida y esto se debe a la triple dosis del gen *GATA1* que se localiza en la región

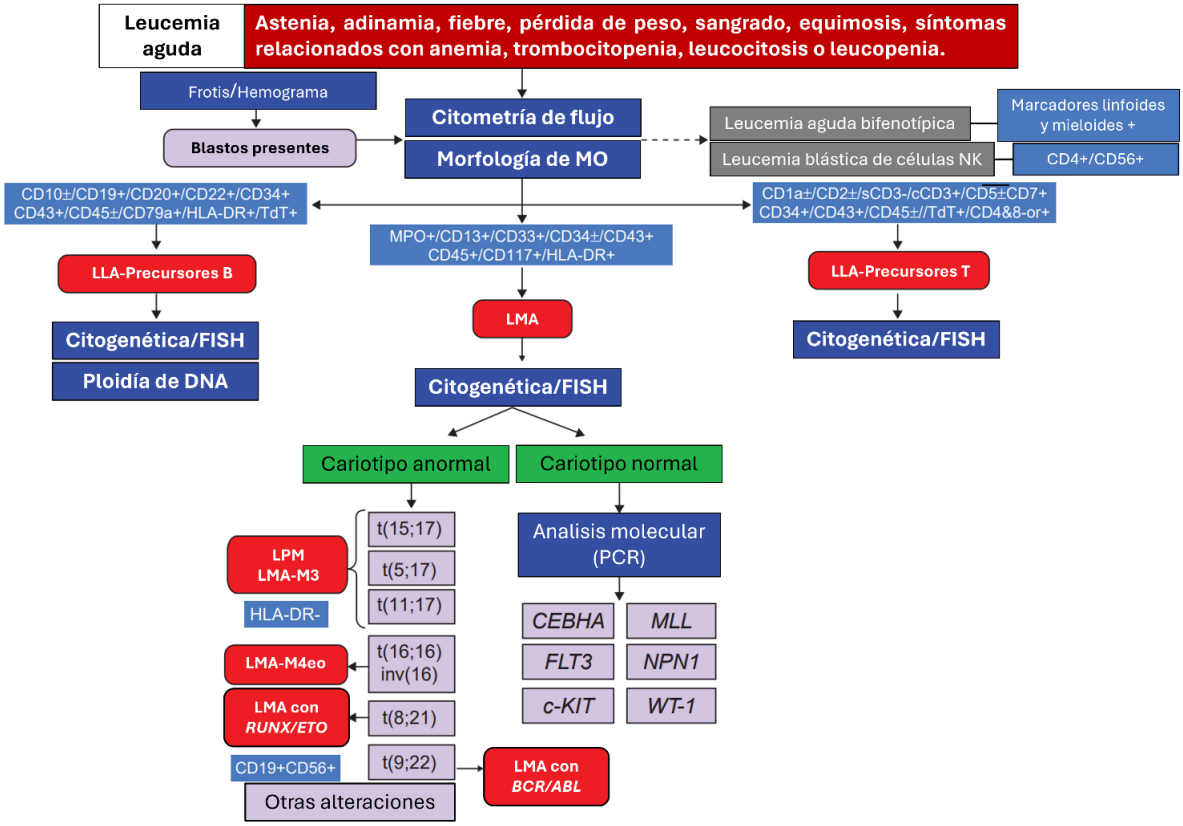
crítica del síndrome de Down, 21q22.3, lo cual conlleva en una Producción anormal de megacarioblastos y la predisposición a leucemia.[35]

Otro caso analizado fue en paciente con Inversión del cromosoma 16 y cariotipo complejo, donde la combinación de técnica citogenética y RT-PCR permitió identificar una inversión pericéntrica del cromosoma 16, junto con otras alteraciones complejas. Este hallazgo individual de la inversión del cromosoma 16 estratifica a la leucemia mieloide aguda dentro de un riesgo bajo, esto se debe a que la inv(16) forma parte de las leucemias con anomalías de los genes del *core-binding factor* (CBF-AML), las cuales responden bien a la quimioterapia convencional. Estudios han demostrado que estos pacientes tienen una tasa de supervivencia libre de enfermedad y una tasa de supervivencia global significativamente mejores en comparación con otros subtipos de LMA.[36]

Sin embargo, en el contexto de este paciente hay que tener en cuenta que además de la inv(16) se presentaba un cariotipo complejo, el cual se define por la presencia de tres o más aberraciones citogenéticas distintas y suele estar asociado con un pronóstico desfavorable en LMA.

Cuando esto ocurre, inv(16) y un cariotipo complejo, el pronóstico se ve influenciado negativamente a pesar de la presencia de inv(16). Estudios han mostrado que la coexistencia de inv(16) con otras aberraciones cromosómicas complejas puede atenuar el pronóstico favorable habitualmente asociado con inv(16) sola. La presencia de múltiples aberraciones genéticas puede indicar una enfermedad más agresiva y menos sensible a la terapia estándar, lo cual puede requerir enfoques terapéuticos más intensivos y personalizados.[37]

Por lo cual, este caso evidencia la importancia de contar con un enfoque integral y algoritmo estandarizado para la complementación diagnóstica con las técnicas necesarias para una correcta clasificación de las leucemias (figura 22).



MO: Médula ósea, LLA: Leucemia linfoide aguda, LMA: Leucemia mieloide aguda, LPM: Leucemia promielocítica aguda.

Figura 22. Algoritmo para el diagnóstico de leucemia aguda[19]

El siguiente caso descrito involucraba a un paciente con un cromosoma derivado (22) resultante de una translocación (9;22) y una monosomía del cromosoma 9. Aunque la identificación de esta alteración es característica de la LMA, la translocación t(9;22)(q34;q11), que forma el cromosoma Filadelfia (Ph), es una alteración genética significativa en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Este rearreglo da lugar a la fusión de los genes BCR (en el cromosoma 22) y ABL1 (en el cromosoma 9), produciendo una proteína quimérica BCR-ABL1 con actividad tirosina cinasa constitutiva, la cual contribuye a la oncogénesis.[38]

La LLA Ph+ está asociada con un pronóstico más desfavorable en comparación con la LLA Ph-. Los pacientes suelen tener una tasa de remisión más baja y una mayor tasa de recaída, así como una mayor resistencia a los regímenes de quimioterapia estándar, lo que hace necesario el uso de tratamientos más agresivos y específicos.[38]

La detección de la translocación (9;22) mediante dos técnicas diferentes confirmó el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de alto riesgo. Este caso ejemplifica la necesidad de técnicas confirmatorias adicionales como FISH para una caracterización precisa.

El último caso por discutir es sobre el paciente con deleción del cromosoma 5q, en el que, a pesar de no obtener metafases, el uso de FISH permitió identificar una deleción en el cromosoma 5. La deleción del brazo largo del cromosoma 5 (del(5q)) es una anomalía citogenética relevante en varias neoplasias hematológicas. En el contexto de un paciente sin blastos, pero con un síndrome infiltrativo, la detección de una del(5q) puede tener implicaciones clínicas y pronósticas significativas.

La deleción de 5q se asocia típicamente con un subtipo específico de síndrome mielodisplásico conocido como síndrome del 5q. Este subtipo se caracteriza por citopenias, especialmente anemia, y megacariocitos hipolobulados en la médula ósea. Generalmente, los pacientes con del(5q) tienen un pronóstico relativamente favorable comparado con otros subtipos de SMD, con una baja tasa de progresión a leucemia mieloide aguda (LMA).

Aunque la del(5q) se asocia con un mejor pronóstico en SMD, la presencia de otras anomalías citogenéticas puede influir negativamente en el pronóstico. Por lo tanto, la detección de del(5q) debe ser evaluada en el contexto del cariotipo completo del paciente, lo cual no fue posible realizar en este caso.[39]

Este caso demuestra la utilidad de métodos moleculares cuando la citogenética convencional no es posible.

El diagnóstico de las neoplasias hematológicas es un proceso multifacético que requiere la integración de múltiples métodos diagnósticos. Este abordaje permite una caracterización precisa de la enfermedad, lo cual es crucial para determinar el pronóstico y la estrategia terapéutica adecuada.
De acuerdo a la metodología empleada se pueden identificar diferentes alteraciones genómicas, y la combinación de estas técnicas proporciona un perfil detallado de las neoplasias hematológicas (tabla 11).

Tabla 11: Comparación de diferentes técnicas citogenómicas [19]

	Bandeo cromosómico	FISH metafase	FISH interfase	Array genómico	NGS*
Nivel de resolución aproximado	>5 Mb	>1-5 Mb	>50 kb	>50 kb	1 nt
Se requiere cultivo celular	+	+	+	-	-
Se requieren sondas preseleccionadas	-	+	+	-	-
Enlace directo al mapa de secuencia	-	+/- ‡	+/- ‡	+	+
Heterogeneidad intercelular detectada	+	+	+	+/-§	+/-§
Tipo de alteración detectada					
Reordenamientos equilibrados	+	+	+	-	+
Aneuploidías	+	+	+	+	+¶
Alteraciones estructurales	+	+	+	+	+
Desbalances alélicos de números de copias neutros	-	-	-	+/- ††	+

* Aplica a secuenciación de genoma completo con cobertura óptima.
‡ Las sondas de copia única basadas en bibliotecas generalmente se definen en mapas físicos del genoma, pero las sondas de pintura y las sondas satelitales no.
§ Requiere preparación unicelular o interpretación bioinformática específica.
¶ Requiere análisis bioinformático/estadístico del número de lecturas.
†† Posible si los SNP están incluidos en la matriz.

En la actualidad, se dispone de técnicas más precisas para llevar a cabo un análisis genómico completo de las neoplasias hematológicas, como el Mapeo Óptico del Genoma (MOG), que se considera que en un futuro próximo podría sustituir eficazmente las técnicas convencionales y simplificar el diagnóstico de la leucemia aguda.[40]

El MOG posibilita una identificación más precisa de las anomalías genéticas, lo que puede llevar a una estratificación más exacta del riesgo de los pacientes al evaluar la carga genética específica asociada con la enfermedad. Al detectar anomalías adicionales y proporcionar una descripción más completa del perfil genético de la leucemia aguda, el MOG puede ayudar a identificar subgrupos de pacientes con un mayor riesgo o un pronóstico desfavorable.[40]

La información detallada obtenida a través del MOG permite una estratificación más refinada de los pacientes en diferentes categorías de riesgo, lo que a su vez puede orientar decisiones terapéuticas más personalizadas y efectivas.[40]

17. Conclusión

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que la implementación del cariotipo en médula ósea en el Hospital Infantil de México Federico Gómez proporciona información valiosa para el diagnóstico y manejo de enfermedades hematológicas. La combinación de citogenética convencional con estudios moleculares e inmunofenotipo permitió una caracterización detallada de las alteraciones genéticas, lo cual es esencial para el tratamiento personalizado de los pacientes. Las mejoras continuas en las técnicas de cultivo y análisis son necesarias para optimizar los resultados y expandir las capacidades diagnósticas del laboratorio.

El diagnóstico de las neoplasias hematológicas requiere una aproximación integral que combine técnicas cito morfológicas, inmunológicas, citogenéticas y moleculares. Cada técnica aporta información única y complementaria que, en conjunto, permite una caracterización precisa de la enfermedad, fundamental para guiar el tratamiento y mejorar los resultados clínicos. La continua evolución de estas tecnologías y su integración en protocolos diagnósticos estandarizados promete mejorar aún más la precisión diagnóstica y las estrategias terapéuticas.

18. Cronograma de actividades

Meses	Actividades						
	Revisión de expedientes	Identificación de pacientes	Abordaje Clínico-genético	Base de datos	Análisis de datos	Redacción de tesis	Preparación de publicación
Julio – Agosto							
Septiembre – Octubre							
Noviembre – Diciembre							
Enero – Febrero							
Marzo – Abril							
Mayo							

19. Referencias bibliográficas

[1] Cox A, Park C, Koduru P, et al. Automated classification of cytogenetic abnormalities in hematolymphoid neoplasms [published correction appears in Bioinformatics. 2022 Dec 29]. *Bioinformatics*. 2022;38(5):1420-1426. doi:10.1093/bioinformatics/btab822

[2] Schaison G. Cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Pediatr Hematol Oncol*. 1993;10(1):1-2. doi:10.3109/08880019309016520

[3] Chai YH, Lü H, Li JQ, et al. Zhonghua Er Ke Za Zhi., Classical and molecular cytogenetic abnormalities in 124 pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia, 2007;45(9):684-686.

[4] Hernández JM, Granada I, Solé F; From conventional cytogenetics to microarrays. Fifty years of Philadelphia chromosome. Med Clin (Barc). 2011 Jul 23;137(5):221-9. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2010.04.016. Epub 2010 Jun 29. PMID: 20591449.

[5] Valencia-González M, Nájera-Castillo MF, Tejocote-Romero I, et al. Factores etiológicos de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Rev Hematol Mex. 2021;22(3)):155-161

[6] https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html

[7] Pérez-Saldívar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Ávalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. BMC Cancer 2011; 11 (1):355. doi: 10.1186/1471-2407-11-355.

[8] Khan M, Altaf C, Malik HS, Naeem MA. Cytogenetic profile of Acute Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia in Northern Pakistan. Pak J Med Sci. 2023 Sep-Oct;39(5):1440-1445. doi: 10.12669/pjms.39.5.6405. PMID: 37680814; PMCID: PMC10480755.

[9] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27069254.

[10] Long, N.A., Golla, U., Sharma, A. *et al.* Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: Origin, Characteristics, and Clinical Implications. *Stem Cell Rev and Rep* 18, 1211–1226 (2022). https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s12015-021-10308-6

[11] Povinelli BJ, Rodriguez-Meira A, Mead AJ. Single cell analysis of normal and leukemic hematopoiesis. Mol Aspects Med. 2018 Feb;59:85-94. doi: 10.1016/j.mam.2017.08.006. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28863981; PMCID: PMC5771467

[12] Hematology: Basic Principles and Practice, de Ronald Hoffman, Edward J. Benz Jr., Leslie E. Silberstein, *et al*

[13] Stelmach P, Trumpp A. Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2023;108(2):353-366. Published 2023 Feb 1. doi:10.3324/haematol.2022.280800

[14] Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):850-858. doi:10.1002/gcc.22805

[15] Justin L, Bipin S. Acute leukemia. From initial gene mutation to survivorship support. © 2019 S. Karger Publishers Ltd. ISBN 978-1-910797-83-9

[16] Orfao A, Matarraz S, Pérez-Andrés M, Almeida J, Teodosio C, Berkowska MA, van Dongen JJM; EuroFlow. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. J Immunol Methods. 2019 Dec;475:112684. doi: 10.1016/j.jim.2019.112684. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31676343)

[17] Lewis JE, Hergott CB. The Immunophenotypic Profile of Healthy Human Bone Marrow. Clin Lab Med. 2023;43(3):323-332. doi:10.1016/j.cll.2023.04.003

[18] Wang X, Liu S, Yu J. Multi-lineage Differentiation from Hematopoietic Stem Cells. Adv Exp Med Biol. 2023;1442:159-175. doi:10.1007/978-981-99-7471-9_10

[19] Heim, S., & Mitelman, F. (2015). Cancer cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. John Wiley & Sons.

[20] Gorczyca, W. (Ed.). (2008). Cytogenetics, FISH and Molecular Testing in Hematologic Malignancies (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.3109/9780203091555

[21] Akkari YMN, Baughn LB, Dubuc AM, Smith AC, Mallo M, Dal Cin P, Diez Campelo M, Gallego MS, Granada Font I, Haase DT, Schlegelberger B, Slavutsky I, Mecucci C, Levine RL, Hasserjian RP, Solé F, Levy B, Xu X. Guiding the global evolution of cytogenetic testing for hematologic malignancies. Blood. 2022 Apr 14;139(15):2273-2284. doi: 10.1182/blood.2021014309. PMID: 35167654; PMCID: PMC9710485.

[22] Byrd JC, et. al.; Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002 Dec 15;100(13):4325-36. doi: 10.1182/blood-2002-03-0772.

[23] Ronaghy A, Yang RK, Khoury JD, Kanagal-Shamanna R. Clinical Applications of Chromosomal Microarray Testing in Myeloid Malignancies. Curr Hematol Malig Rep. 2020 Jun;15(3):194-202. doi: 10.1007/s11899-020-00578-1. PMID: 32382988.

[24] Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Tarantini F, Cumbo C, Tota G, Minervini CF, Minervini A, Conserva MR, Redavid I, Parciante E, Macchia MG, Specchia G, Musto P, Albano F. Feasibility of Optical Genome Mapping in Cytogenetic Diagnostics of Hematological Neoplasms: A New Way to Look at DNA. Diagnostics (Basel). 2023 May 24;13(11):1841. doi: 10.3390/diagnostics13111841. PMID: 37296693; PMCID: PMC10252312.

[25] Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. Curr Opin Pediatr. 2020;32(1):57-66. doi:10.1097/MOP.0000000000000855

[26] Afkhami M, Ally F, Pullarkat V, Pillai RK. Genetics and Diagnostic Approach to Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. Cancer Treat Res. 2021;181:17-43. doi:10.1007/978-3-030-78311-2

[27] Panuciak, K.; Nowicka, E.; Mastalerczyk, A.; Zawitkowska, J.; Niedźwiecki, M.; Lejman, M. Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 8764. https://doi.org/10.3390/ijms24108764

[28] McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S, editors. ISCN 2020 (2020): An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Basel: Karger

[29] The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, Editor(s):Marilyn S. Arsham, Margaret J. Barch M.S., CG(ASCP)CM,, Helen J. Lawce B.S., CG(ASCP)CM, First published:4 March 2017. Print ISBN:9781119061229 |Online ISBN:9781119061199 |DOI:10.1002/9781119061199

[30] Análisis Citogenómicos Aplicados a Neoplasias Hematológicas: recomendaciones preanalíticas analíticas y postanalíticas. Blanca Espinet, María Laura Blanco, Dolores Costa, Esther Cuatrocasas, Neus Ruiz-Xivillé. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica, avalada por la Sociedad Española de Hematología y Hematoterapia. 2021

[31] Groll AH, Pana D, Lanternier F, Mesini A, Ammann RA, Averbuch D, Castagnola E, Cesaro S, Engelhard D, Garcia-Vidal C, Kanerva J, Ritz N, Roilides E, Styczynski J, Warris A, Lehrnbecher T; 8th European Conference on Infections in Leukaemia. 8th European Conference on Infections in Leukaemia: 2020 guidelines for the diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or post-haematopoietic cell transplantation. Lancet Oncol. 2021 Jun;22(6):e254-e269. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30723-3. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33811813.)

[32] Solé F, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. Br J Haematol. 2000 Oct;111(1):182-91. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.02368.x. PMID: 11054019

[33] Gersen, S. L., & Keagle, M. B. (2013). The Principles of Clinical Cytogenetics. *Springer*.

[34] Bacher, U., et al. (2009). Differential diagnosis in myelodysplastic syndromes (MDS): Comparison of flow cytometry, cytomorphology, and cytogenetics. Leukemia Research, 33(6), 857-864.

[35] Taub, J. W., & Ge, Y. (2015). Down syndrome and the GATA1 mutation: insights into leukemogenesis. Human Molecular Genetics, 24(R1), R89-R95.

[36] Kim HG, Kojima K, Swindle CS, Cotta CV, Huo Y, Reddy V, Klug CA. FLT3-ITD cooperates with inv(16) to promote progression to acute myeloid leukemia. Blood. 2008 Feb 1;111(3):1567-74. doi: 10.1182/blood-2006-06-030312. Epub 2007 Oct 29. PMID: 17967943; PMCID: PMC2214774.

[37] Schlenk, R. F., et al. (2018). Impact of secondary genetic lesions on the clinical outcome of adult patients with inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia. Blood, 131(6), 615-617.

[38] Masuda T, Maeda S, Shimada S, Sakuramoto N, Morita K, Koyama A, Suzuki K, Mitsuda Y, Matsuo H, Kubota H, Kato I, Tanaka K, Takita J, Hirata M, Kataoka TR, Nakahata T, Adachi S, Hirai H, Mizuta S, Naka K, Imai Y, Kimura S, Sugiyama H, Kamikubo Y. RUNX1 transactivates BCR-ABL1 expression in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. Cancer Sci. 2022 Feb;113(2):529-539. doi: 10.1111/cas.15239. Epub 2021 Dec 28. PMID: 34902205; PMCID: PMC8819354.

[39] Hosono N, Makishima H, Mahfouz R, Przychodzen B, Yoshida K, Jerez A, LaFramboise T, Polprasert C, Clemente MJ, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Cui E, Verma AK, McDevitt MA, List AF, Sauntharajah Y, Sekeres MA, Boultwood J, Ogawa S, Maciejewski JP. Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. Oncotarget. 2017 Jan 24;8(4):6483-6495. doi: 10.18632/oncotarget.14130. PMID: 28031539; PMCID: PMC5351647.

[40] Soler, G.; Ouedraogo, Z.G.; Goumy, C.; Lebecque, B.; Aspas Requena, G.; Ravinet, A.; Kanold, J.; Véronèse, L.; Tchirkov, A. Optical Genome Mapping in Routine Cytogenetic Diagnosis of Acute Leukemia. *Cancers* 2023, *15*, 2131. https://doi.org/10.3390/cancers15072131

20. Limitaciones del estudio

- Indicación del estudio para cariotipo en médula ósea
- Calidad de la muestra tomada
- Obtención de material para análisis
- Tiempo de análisis
- Falta de insumos para una técnica confirmatoria
- Falta de insumos para un estudio molecular complementario

21. Anexos

Anexo 1: Obtención de médula ósea

1.1. **Aspirado de médula ósea:**

Requerimientos por el Laboratorio de Citogenética

- La muestra debe ser tomada en una jeringa previamente heparinizada con 0.2 ml de heparina sódica (1000 UI/ml) o en vacutainer® con heparina sódica (tapón verde obscuro) adecuadamente rotulada (nombre y registro).
- Cantidad mínima de 2 ml de médula ósea y se homogeneiza con el fin de evitar que se coagule la muestra.
- Después de realizado el expandido celular, se solicita que la muestra aspirada sea para la prueba de cariotipo (2da parte del aspirado).
- De preferencia una vez obtenida la muestra se envía al Laboratorio de Citogenética los días lunes, martes o miércoles dentro de un horario de 7 am a 12 pm; manteniéndose siempre a temperatura ambiente.
- Se acompaña de la solicitud para cariotipo en médula ósea y adecuadamente requisitada.

Anexo 2: Cultivo de médula ósea

1. **Material:**
   - Medio de cultivo suplementado, especial para cariotipo en médula ósea (MarrowMax®)
   - Tubos de ensayo de 15 ml estériles desechables de polipropileno
   - Guantes estériles
   - Gasas
   - Jeringa estéril de 20 ml
   - Aguja amarilla (20x32)
   - Cinta adhesiva
   - Marcador indeleble
2. **Equipo:**
   - Campana de flujo laminar
   - Incubadora
3. **Método**

Todo el proceso se realiza con guantes estériles y en la campana de flujo laminar

- En un vaso de precipitado colocar agua corriente, e introducir los tubos de ensayo previamente alicuotados con 4.5 o 5 ml de medio Marrow Max, ya descongelado agitar suavemente sin crear burbujas, verificar que el medio de cultivo esté homogéneo y no tenga precipitado
- Preparar dos tubos por cada muestra. Rotularlos con las letras A y B, y con el número de registro asignado a la muestra, los datos se marcarán de la siguiente manera:
  - En la etapa de cada tubo se coloca la letra y el número del cultivo
  - En el cuerpo del tubo se coloca un fragmento de cinta adhesiva con el número completo de la muestra, las iniciales del paciente y la letra correspondiente a cada tubo
- Limpiar el frasco con gasa impregnado con solución antiséptica y retirar el sello de seguridad, limpie nuevamente con solución antiséptica.
- Tomar la muestra, agitar suavemente, ya homogénea retire la aguja con todo y capuchón
- Desechar la primera gota en una gasa
- Inocular en cada tubo 1 a 2 ml la muestra
- Tapar inmediatamente y agite suavemente para homogenizar
- Introduzca los tubos en la incubadora
- Incubar los cultivos a 37°C por un periodo de 48 horas

Anexo 3: Procedimiento de Cosecha

1. **Material:**
    - Solución de trabajo de colchicina (0.02%)
    - Solución hipotónica de Cloruro de potasio (KCl) 0.075 M
    - Solución de Carnoy (fijador)
    - Vaso de precipitado
    - Micropipeta
    - Puntas para micropipeta
    - Pipeta de transferencia
2. **Equipo:**
    - Campana de flujo laminar
    - Centrifuga
    - Incubadora
    - Refrigerador
    - Vortex (agitador)
    - Cronómetro
3. **Método:**
    - Sacar los tubos de la incubadora, agregar 15 µl de la solución trabajo de colchicina
    - Incubar nuevamente por 15 minutos
    - Calentar la solución hipotónica a 37°C (en incubadora)
    - Al término del tiempo de exposición centrifugar 8 minutos a 1800 rpm
    - Remover el sobrenadante, con pipeta de transferencia, dejar un poco del líquido sobre el botón celular
    - Resuspender el botón celular en el vortex
    - Adicionar lentamente y con agitación 1-2 ml de solución hipotónica (a 37°C)
    - Fuera del vórtex llevar a volumen de 10 ml
    - Agitar para homogenizar
    - Incubar por 20 minutos
    - Elaborar la solución de Carnoy (fijador) y refrigerar
    - Al término del tiempo de exposición, sacar los tubos de la incubadora
    - Agregar 1 ml de fijador en cada tubo
    - Agitar suavemente hasta obtener un viraje en la suspensión, de color rojo vivo a un marrón oscuro
    - Centrifugar 8 minutos a 1800 rpm
    - Remover el sobrenadante, con pipeta de transferencia
    - Resuspender el botón celular, adicionar con agitación constante 5 ml de solución fijadora
    - Repetir los pasos hasta obtener una de dos condiciones:
        1. Botón celular blanco
        2. Sobrenadante trasparente
    - Realice inmediatamente el sigueinte procedimiento

Anexo 4: Goteo y revisión de laminillas

1. **Material:**
   - Portaobjetos
   - Agua fría
   - Alcohol etílico 90%
   - Pipetas
   - Lápiz punta diamante (carburo de tungsteno)
   - Pinzas punta roma
   - Vaso de precipitados
2. **Equipo**
   - Centrifuga
   - Vortex
   - Microscopio
   - Estufa a 60°C
3. **Método:**
   - Los portaobjetos son previamente lavados con jabón neutro, enjuagados con agua y preservados en alcohol en refrigeración
   - Retirar el sobrenadante de los tubos (a revisión) con pipeta de transferencia dejar un poco de sobrenadante
   - Resuspender el botón celular y agregar solución de Carnoy (fresco y frío) a un volumen de 1 ml (1-2 ml según tamaño del botón celular)
   - Tomar un portaobjetos y quitar el excedente de líquido, gotear de 1 a 2 gotas del cultivo en suspensión
   - Dejar secar las laminillas
   - Rotular con el lápiz diamante el número de la muestra y el tubo de cultivo del cual se obtuvo el extendido celular
   - Observar en el microscopio
   - Evalular la calidad y cantidad de las metafases
   - Anotar en la bitácora de goteo si hubo crecimiento, si es escaso o no lo hay
   - De la revisión del cultivo, se obtienen entre 3 y 4 laminillas por tubo
   - Madurar las laminillas en la estufa a 60°C por unas 24 horas

Anexo 5: Tinción para bandas GTW

1. **Materiales**
   - Solución buffer de fosfatos pH 7.4
   - Solución Buffer de fosfatos pH 6.8
   - Tripsina (solución de trabajo)
   - Colorante Wrigth
   - Colorante Giemsa
   - Cubreobjetos
   - Gasas
   - Guantes
   - Vasos coplin
   - Vasos de precipitado
   - Pipeta graduada
   - Probeta graduada
   - Pipeta de transferencia
   - Pipeta Pasteur
   - Entellan
2. **Equipo**
   - Cronómetro
   - Microscopio
   - Pinzas punta roma
3. **Método**
   - Preparar en tren: 4 vasos coplin y 1 vaso de precipitado cada una de las siguientes soluciones:
     1) 49 ml de la solución buffer pH 7.4 y 1 ml de tripsina
     2) Solución buffer pH 7.4
     3) 48 ml de la solución buffer pH 6.8 y 2 ml de colorante Wrigth
     4) 48 ml de la solución buffer 6.8 y 2 ml de colorante Giemsa
     5) Vaso de precipitado con agua corriente
   - Sumergir de 40-50 segundos una laminilla en el primer vaso coplin (digestión)
   - Sacar la laminilla al término del tiempo y enjuagarla en el segundo coplin (parar actividad)
   - Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Wrigth)
   - Sumergir la laminilla en el sigueinte coplin 2 minutos (tinción con Giemsa)
   - Sumergir y enjuagar la laminilla en el vaso de precipitados
   - Secar
   - Revisar la calidad de las bandas
   - Dejar secar a temperatura ambiente
   - Montar con 3 gotas de entelan y cubreobjetos
   - Realizar revisión en el microscopio de las laminillas ya teñidas

Anexo 6: Preparación de soluciones

1. **Colchicina**
   a) Solución madre:
   Pesar 0.025 g de colchicina disolver en 25 ml de agua inyectable, en agitador mecánico y almacenar en congelación
   b) Solución de trabajo:
   Tomar 2 ml de la solución madre y ajustar a un volumen de 10 ml con agua inyectable (8 ml de agua), proteger de la luz y almacenar en refrigeración
2. **Solución de tripsina**

Pesar 0.312 g de tripsina y disolver con agitación mecánica en 50 ml de agua destilada, alicuotar en tubos eppendorf de 1 ml y mantener en congelación

3. **Solución hipotónica**

Pesar 5.59 g de KCl colocar en matraz aforado agregar agua destilada, disolver y ajustar el volumen a un litro

4. **Solución de Carnoy (fijador)**

Cualquier volumen por preparar es mediante la relación 3:1 (3 partes de metanol absoluto y una parte de ácido acético glacial)

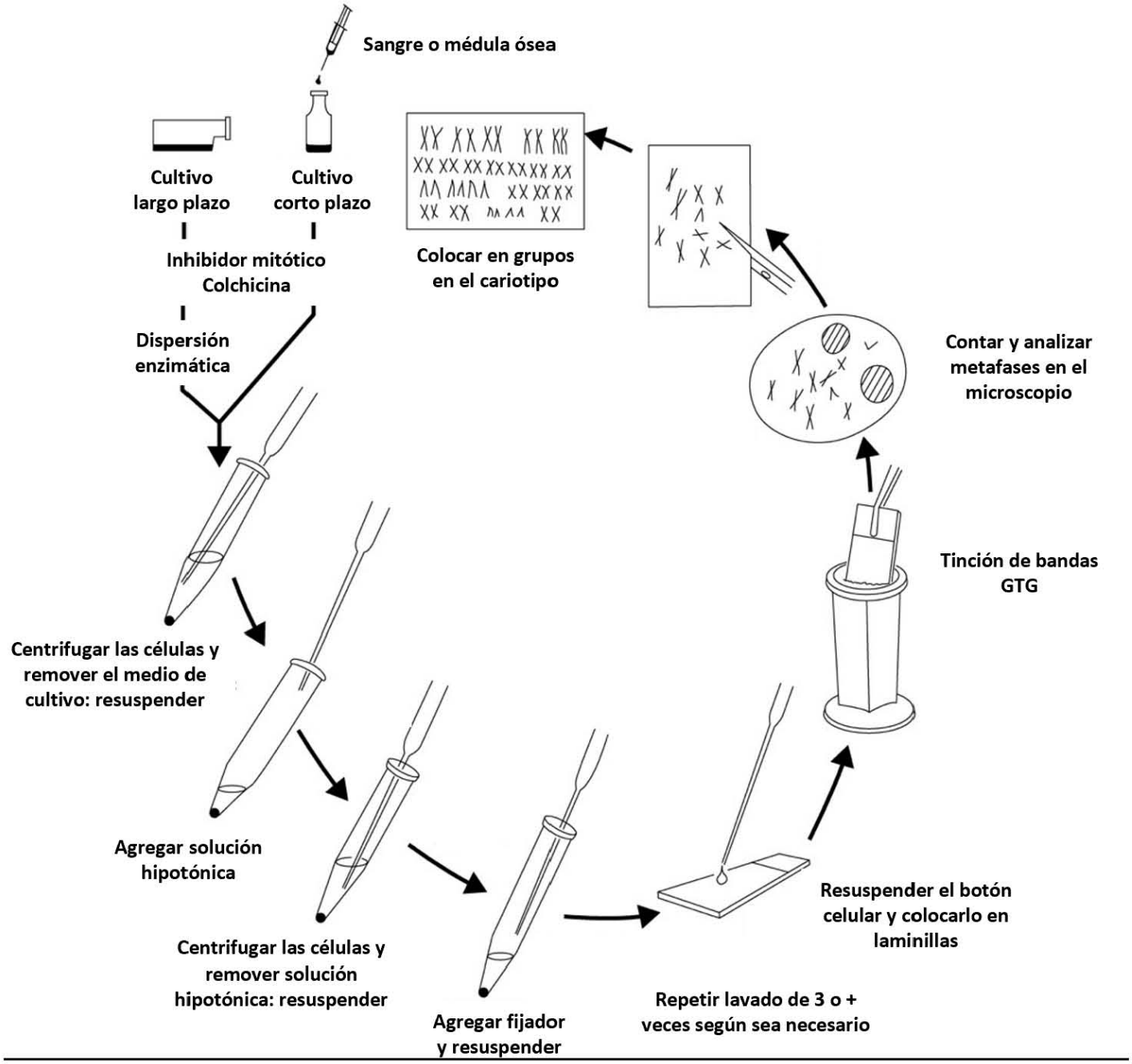
5. **Solución buffer pH 7.4**
   Pesar:
   a) 8 gr de NaCl
   b) 0.2 g de KCl
   c) 0.92 g de Na2HPO4
   d) 0.2 g KH2PO4

   Mezclar todas las sustancias en un matraz aforado de un litro, ya mezcladas las sales agregar agua destilada, disolver y ajustar volumen a 1 litro.

6. **Solución buffer pH 6.8**

Colocar una tableta de buffer pH 6.8 (marca GIBCO) en matraz aforado, agregar agua destilada y disolver, ajustar a un litro.

Anexo 7. Esquema de métodos de preparación cromosómica (modificada de The AGT Cytogenetics Laboratory Manuals, 2017)



Anexo 8. Técnica de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

- Es recomendable trabajar con las sondas en un lugar de poca luz para que el fluorocromo no pierda su brillantez, y las sondas se guardan a bajas temperaturas de 4 a 6 ºC las de uso y las almacenadas en ultracongeladores a -20 ºC
- Se utiliza formamida que está contenida en la sonda Vysis a temperatura de 75° C o bien puede realizarse la cohibridación por medio de un Hybrite.

Técnicas de siembra y cosecha del material a hibridar

- La técnica (ver anexos 2 al 5) utilizada en el Laboratorio para la obtención del material biológico es la misma ya sea para técnica de citogenética clásica y molecular.

Elaboración de laminillas

- Se realiza un concentrado de la muestra obtenida por medio de centrifugación y con fijador Carnoy, a base de ácido acético y metanol 1:3, una cantidad aproximada de 40ml, hasta que se encuentre libre de detritos para evitar ruido de fondo, esto depende de cada muestra en particular y se formará el criterio de cuando la muestra ya no requiere de lavados con el fijador y cual sea la densidad celular requerida para un buen diagnóstico.
- Se deja caer una gota en el portaobjetos previamente desengrasado almacenado en un vaso de precipitado de 500ml con alcohol de 70% y con un paño limpio que no suelte pelusa, se seca, se marca la laminilla con el número correspondiente al caso en cuestión y con un lápiz diamante se delimita la zona que se va a hibridar calculando que se usará un área de 18 por 18 mm. Se dejan secar y se observa al microscopio en contraste de fases.
- El criterio para seguir es un material limpio cuyas células no se encuentren encimadas, pues esto va a dar una errónea observación de la marca, asimismo cuidando que no existan detritos que también interfieren a la observación.

Cohibridación

- Posteriormente se colocan 5 µl con una micropipeta calibradas de 10µl de la sonda en un cubreobjeto de 18X18 mm y se hace coincidir la zona marcada con la sonda, en este paso debe uno de ser muy cuidadoso de ponerlo encima del material a hibridar.
- Más adelante se notifica la forma de hacer la mezcla de la sonda tomando en cuenta que cada marca de sonda tiene su fórmula diferente.
- Se sella con una cantidad aproximada de 2ml de un pegamento llamado Iris, cuyas características son adecuadas para que no se deseque el material y sea fácil de retirarlo, poniendo cuidado de que toda la orilla del cubreobjeto quede perfectamente sellada.
- Se coloca en el Hybrite el cual cuenta con programas adecuados en cuanto a temperaturas y tiempos de hibridación. Los tiempos con los que se trabaja es de 75 ºC +-1 por 5 minutos e inmediatamente se ajusta la temperatura de 37º C. El tiempo de hibridación es de 48 horas

Lavados post hibridación

- Se saca la lámina de la cámara de hibridación y se retira el pegamento con mucha precaución, teniendo en cuenta que el cubreobjetos no debe de moverse, este paso es muy delicado, porque el material puede maltratarse con el simple movimiento del cubreobjetos, posteriormente se sumerge la lámina en un vaso de coplin con 50 ml de la solución 2XSSC a temperatura ambiente. Esto es con el fin de que solo resbale el cubreobjetos.
- Inmediatamente se sumerge la lámina en un coplin de 50 ml que contiene un detergente llamado NP40, con el fin de evitar uniones inespecíficas de la marca.

- Esta solución debe de encontrarse a 70º C + - 1 y su concentración es 0.4XSSC/0.3% NP40) durante 5 minutos, agitando de vez en cuando para aumentar el efecto por la misma acción mecánica.
- Posteriormente se saca y se sumerge en otro vaso de coplin de 50 ml conteniendo el mismo detergente NP4, pero ahora en una concentración de 2XSSC/0.1%, también durante 5 minutos.
- El paso siguiente consiste en sumergir la lámina en un vaso coplin de 50 ml agua destilada y agitar un poco, para quitar el residuo del detergente.
- Se saca del agua y se coloca vertical para que drene y se seque.

Contra tinción

- Este paso tiene por objeto teñir el ADN de un color azul con excepción de las secuencias que se encuentran hibridadas con la sonda y proporcionar un mayor contraste para dar una mejor lectura de la marca.
- Se realiza una mezcla en un tubo eppendorf de 1 ml con una cantidad d 2.5 microlitros de DAPI II y 2.5 microlitros de ANTIFADE en una proporción de 1:1
- Se colocan sobre el cubreobjetos con una micropipeta calibradas de 10µl una cantidad de 5 µl de esta mezcla y se procede a empalmar con el área del material hibridado
- Se deja un tiempo mínimo de 10 minutos para que la contra tinción penetre y la observación pueda realizarse de una manera adecuada.

Observación al microscopio

- Para esta técnica es necesario contar con un equipo de microscopia de campo claro, contraste de fases, Epi-fluorescencia, con filtros de fluorescencia para FISH Básico, Cáncer Hematológico, Aneuvysion TM, CGH, m-FISH y cariotipo en 24 colores, otras sondas con marcaje DAPI, Orange, Green, Aqua, filtro dual Green/Orange V.2.
- Debe de contar con el sistema de análisis de imágenes para cariotipo automatizado y sistema de imágenes en fluorescencia avanzado FISH incluyendo cámara de alta resolución para campo claro y fluorescencia.
- El documento correspondiente a esta interpretación se encuentra en el Sistema Internacional de Nomenclatura 2005. Se debe de mencionar la bibliografía, se encuentran los criterios a los cuales nos normamos para diagnosticar, y reportar los hallazgos.

Reactivos para la técnica de FISH

- Preparación de la sonda
    - Mezclar con Vortex y luego centrifugar la sonda sola, con el fin de colectarla en el fondo del tubo.
    - En un eppendorf 1ml mezclar la sonda con su buffer:
    - Nótese que cada sonda tiene un número de catálogo según la marca que se maneje y el tipo de sonda que sea.
    - Vysis presenta los buffers para cada sonda tanto LSI, CEP, WCP, TEL, contienen sulfato dextran, formamida y SSC (pH 7) que está incluido con la sonda a utilizar.
- <u>Para 1 lámina:</u>
    - 1 µl de sonda
    - 2 µl de agua filtrada
    - 7 µl de buffer de hibridación

- Posteriormente mezclar de nuevo, pero ahora la mezcla en el vortex y centrifugar un pulso en la micro centrifuga alcanzando hasta 4000 rpm.

- B) 20 XSSC, marca Vysis Nº02J10-032 (500 g)
- 20 X SSC 132 g
- Aforar a 500 ml con agua pura, guardar a temperatura ambiente

- C) Solución 2 X SSC
- 20 X SSC 100ml
- Aforar a1000 ml con agua pura, ajustar pH a 7.0 + - 0.2

- D) Solución de lavado.- 2 X SSC/0.1% NP40 Marca Vysis N° 07J05-001
- 20 X SSC 100 ml
- NP 40 1 ml
- Agitar con mosca magnética a lograr homogenización
- Aforar a 1000 ml con agua pura, ajustar pH a 7.0 + - 0.2
- Almacenar a temperatura ambiente

- E) Solución de lavado 0.4 X SSC/0.3% NP40
- 20 XSSC 20ml
- NP40 3ml
- Agitar con mosca magnética a lograr homogenización
- Aforar a 1000 ml con agua pura, ajustar pH a 7.0 a 7.5
- Almacenar a temperatura ambiente.

- F) DAPI II
- Utilizamos de la marca Vysis Nº 06J50-001
- 2 X 500 µl 8125 ng/ml
- Antifade.-
- Utilizamos de la marca Vysis Nº 06J29-001
- 240 µl x 2
- Consta de 1,4, fenildiamina y glicerol en solución acuosa buffer.

Anexo 9. Rearreglos cromosómicos analizados en panel HEMAVISION®

Por medio de la reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se determinan los transcritos correspondientes a las siguientes alteraciones cromosómicas:

1. t(15;17)(q24;21),
2. inv(16)(p3;q22),
3. t(8;21)(q22;q22),
4. t(9;11)(p22;q23),
5. t(11;19)(q23;p13.1),
6. t(16;21)(p11;q22),
7. t(12;22)(p13;q11-12),
8. t(6;9)(p23;q34),
9. t(1;11)(p32;q23),
10. t(6;11)(q27;q23),
11. t(1;19)(q23;p13),
12. t(12;21)(p13,q22),
13. t(4;11)(q21;q23),
14. t(17;19)(q22;p13),
15. del(1)(p32),
16. t(9;22)(q34;q11),
17. t(9;9)(q34;q34),
18. t(11;17)(q23;q21),
19. t(9;12)(q34;p13),
20. t(5;12)(q33;p13),
21. t(10;11)(p12;q23),
22. t(1;11)(q21;q23),
23. t(X;11)(q13;q23),
24. t(3;21)(q26;q22),
25. t(10;11)(p12;q23),
26. t(5;17)(q35;q21),
27. t(3;5)(q25.1;q35).

Anexo 10: Tabla general con todas las variables estudiadas y resultados de cariotipo de los 40 pacientes

ID	Edad	S	Indicación	Infe	Blastos	Panel de translocaciones			Crec	Cariotipo	Alteración	Ploidía
1	8	F	SMD	No	No	No	-	-	Sí	Alterado	40~46,XX,-7[2],-15[2],-20[2][cp2]/46,XX[23]	Hipodiploide
2	6	F	LLA	Sí	96%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	34~40,XX[3]	Hipodiploide
3	10	F	LLA	Sí	No se detectan	Sí	Neg	-	Sí	Normal 46,XX[5]		Diploide
4	10	F	LLA	Sí	4%, normales	Externo			Sí	Normal 46,XX[25]		Diploide
5	2	F	Otros	No	No	Sí	Neg	-	Sí	Normal 46,XX[25]		Diploide
6	2	F	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Normal 46,XX[14]		Diploide
7	5	F	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Normal 46,XX[10]		Diploide
8	5	F	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Alterado	49,XX,+12[1],+19[1],+21c[7]	Hiperdiploide
9	1	M	Otros	No	No	Sí	Neg	-	Sí	Normal 46,XY[25]		Diploide
10	15	M	SMD	No	No	Sí	Neg	-	Sí	Normal 46,XY[25]		Diploide
11	8	M	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Normal 46,XY[25]		Diploide
12	7	F	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Sin metafases para analizar		
13	2	M	LLA	Sí	90%	No	-	-	Sí	Sin metafases para analizar		
14	6	M	Recaída	Sí	95%	Sí	Neg	-	Sí	Sin metafases para analizar		
15	14	M	LMA	Sí	52% mie 13% linfo	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	47,XY,+21c[10]	Hiperdiploide*
16	8	F	LLA	Sí	80%	Sí	Neg	-	Escaso	Sin metafases para analizar		
17	12	F	LLA	Sí	92%	No	-	-	Sí	Alterado	45,X,?add(X)(q28),-4,der(6)t(6;7)(q13;p22),add(7)(p22),del(9)(p?13)[25]	Hipodiploide
18	1	F	LLA	Sí	14%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	47,XX,del(7)(q22),+21c[20]/47,XX,+21c[5]	Hiperdiploide
19	7	M	Linaje mixto	Sí	25%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	46,XY,t(5;17)(?q13;?q12)[25]	Diploide
20	9	M	LLA	Sí	90%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	48,XY,+mar,+mar[5]/46,XY[7]	Hiperdiploide
21	11	M	LLA	Sí	70%	Sí	Pos	t(12;21)	Sí	Normal 46,XY		Diploide*
22	9	F	Otros	No	No	No	-	-	Sí	Normal 46,XX [10]		Diploide

23	16	M	SMD	No	No	No	-	-	Sí	Alterado	42~46,XY,?del(5)(q11.2q13)[3],-18[3][cp3],46,XY[19]	Hipodiploide
24	13	F	LLA	Sí	88%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	41~47,XX,-3,-4,-4,-7,-12[1],+mar[1][cp2]	Hipodiploide
25	9	F	LLA	Sí	94%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	43~47,XX,+16[4],+17[2],-19[2],-21[2],+mar[2][cp10]	Hiperdiploide
26	2	F	LLA	Sí	82%	Sí	Pos	t(1;19)	Sí	Alterado	32~45,XX,-2[2],-3[2],-5[3],-7[2],-10[2],-13[2],-14[2],-15[2],-16[2],-20[2][cp5]/ 46,XX,?del(20)(p13)[3]/±46,XX[2]/46,XX[17]	Hipodiploide
27	1	M	SMD	No	No	No	-	-	Sí	En análisis*		Diploide
28	2	M	SMD	No	No	No	-	-	Sí	En análisis*		Diploide
29	2	M	Otros	No	No	Sí	Neg	-	Sí	Normal 46,XY[25]		Diploide
30	17	M	LLA	Sí	76%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	43~47,XY,-2[2],-3[3],-5[4],-6[4],9[2],-10[3],-11[3],-14[5],-15[3],-17[4],-20[4],21[4],-22[2],?del(22)(q13)[13],+mar[2][cp30]	Hipodiploide
31	15	F	LMA	Sí	45%	Sí	Pos	inv(16)	Sí	Alterado	46~48,XX,+8[2],+11[2],?del(11)(q23)[9],?inv(16)(p13q22)[5],+22[3][cp14]/46,XX[5]	Hiperdiploide
32	7	M	LLA	Coagulada	-	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	.	Hipodiploide
33	7	M	LLA	Sí	84%	Sí	Pos	t(9;22)	Sí	Alterado	45~46,XY,-9[3],der(22)t(9;22)(q34;q11)[4]/46,XY[11]	Hipodiploide
34	5	F	LLA	Sí	25%	Sí	Neg	-	No	Sin material para analizar		
35	2	M	Otros	Sí	No se detectan	Sí	Neg	-	No	Sin material para analizar		
36	0.8	F	Otros	Coagulada	-	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	45~46,<±2n>,X,add(X)(q22)[2][cp10]/46,XX[13]*	Hipodiploide
37	9	M	Otros	Sí	No se detectan	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	46,XYc[25].nuc ish(D5S23,D5S721x2,EGR1x1)[3/250],(D7S486,D7S522x2,ELNx2)[250]	Diploide
38	5	F	LLA	Sí	25%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	25~46,XX,-X[3],-1[4],-2[4],-3[3],-4[5],-5[2],-6[3],-7[2],-8[5],-9[5],-10[5],-11[5],-12[4],-13[3],-14[2],-16[6],-17[5],-18[5],-19[2],-20[3],-21[3][cp10]/ 46,XX[15]	Hipodiploide
39	6	M	LLA	Sí	83%	Sí	Neg	-	Sí	Alterado	46,XY,t(4;9)(p13;q21)[15]	Diploide
40	2	F	LLA	Sí	89%	Sí	Pos	t(1;19)	Sí	Normal 46,XX[20]		Diploide

ID: número de identificación del paciente, S: sexo, F: femenino, M: masculino, LLA: leucemia linfoide aguda, LMA: leucemia mieloide aguda, SMD: síndrome mielodisplásico, Infe: inmunofenotipo, Crec: crecimiento, Neg: negativo, Pos: positivo, inv: inversión t: translocación, add: material adicional de origen desconocido, del: deleción, der: derivativo, mar: cromosoma marcador, 21c: cromosoma 21 constitutivo, cp: cariotipo compuesto, ±: cercano a, ~ rango, nuc ish: FISH en núcleo en interfase, ? alteración dudosa, mieloide, linfoide.

Los casos marcados en amarillo fueron descritos a detalle previamente dentro del apartado “Resultados”.