

**UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL**  
**FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE LABORATORIO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**  
**ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**



**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA Y CITOGÉNÉTICA DE PACIENTES  
CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS**

**Para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica**

**AUTOR: PEREZ VASQUEZ KELLY PATRICIA**

**ASESOR: LIC. T.M. HÉCTOR HERRERA REYNOSO**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme enseñado que la vida es un camino de aprendizaje constante y que necesitas de la fe para avanzar con la confianza de que todos tenemos un propósito en la vida y lo que aportemos quedará siempre como obra del señor. De igual forma a mi familia, en especial a mis padres por el apoyo brindado y sobretodo que creyeron en mí, este logro es en recompensa a su esfuerzo y amor, los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor de tesis, Lic. T.M Héctor Herrera Reynoso, excelente persona y profesional con años de experiencia en el área de citogenética, quien me brindó su apoyo, confianza y tiempo para orientarme en la elaboración de esta investigación.

A la Mg. Yesica Llimpe Mitma, quien durante mi internado en el Área de Genética y Biología Molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) me apoyó para emprender la realización de mi tesis, a quien considero y respeto.

A los profesionales del Área de citometría de flujo y Hematología especial del INEN por las recomendaciones y el conocimiento brindado muchas gracias.

## GLOSARIO

**ADICIÓN:** MATERIAL genético adicional cuyo origen no conocido.

**ANÁLISIS CITOGENÉTICO:** estudio del cariotipo mediante el análisis de los cromosomas humanos y sus alteraciones.

**BASTONES DE AUER:** inclusiones celulares citoplasmáticas en forma de bastón compuesta por gránulos.

**BLASTOS:** células inmadura con capacidad de diferenciación en líneas celulares.

**CARIOTIPO COMPLEJO:** tres o más alteraciones citogenéticas en una misma clona

**CROMOSOMA DERIVADO:** cromosoma con reordenamientos y múltiples anomalías cromosómicas.

**CROMOSOMA MARCADOR:** cromosoma de origen no determinado.

**DELECIÓN:** alteración estructural en donde se produce pérdida de material cromosómico.

**INMUNOFENOTIPO:** identificación de poblaciones celulares mediante expresión de marcadores antigénicos.

**INVERSIÓN:** alteración citogenética estructural, material cromosómico en posición invertida en un cromosoma.

**ISOCROMOSOMA:** alteración citogenética estructural, ambos brazos de los cromosomas son iguales, involucra pérdida y duplicación de material genético.

**LEUCEMIA:** neoplasia hematológica caracterizada por proliferación celular de blastos.

**TRANSLOCACIÓN:** alteración citogenética estructural en donde se produce intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos.

**TRISOMÍA:** alteración citogenética numérica, un cromosoma adicional.

**STEM CELL:** célula madre con capacidad de auto regeneración y diferenciación celular.

## ABREVIATURAS

**Add:** material adicional de origen desconocido

**AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1):** gen de fusión producto de la t(8; 21)(q22;q22)

**BCR-ABL:** gen de fusión producto de la t(9;22)(q34;q11)

**CD:** cluster of differentiation, marcadores de diferenciación celular

**Cp:** cariotipo compuesto, heterogeneidad del cariotipo (subclonas)

**del :** deleción

**der :** cromosoma derivado

**del(9q):** deleción del brazo largo del cromosoma 9

**dup:** duplicación

**FAB:** Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

**inv :** inversión

**i:** isocromosoma

**LMA-M2:** leucemia mieloide aguda subtipo M2

**mar** : cromosoma marcador

**MPO**: mieloperoxidasa

**OMS**: Organización Mundial de la Salud.

**p** : brazo corto de un cromosoma

**q**: brazo largo de un cromosoma

**t** : translocación

**t(8;21)(q22;q22)** : translocación entre los cromosomas 8 y 21

**-Y**: pérdida del cromosoma sexual Y

**+8**: trisomía del cromosoma 8

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>12</b>
1.1 IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	12
1.2 FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS GENERALES Y ESPECÍFICAS .....	12
1.3 OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	13
1.4 JUSTIFICACIÓN .....	13
<b>CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 ANTECEDENTES .....	14
2.2 BASES TEÓRICAS.....	18
2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	31
<b>CAPÍTULO III MÉTODO.....</b>	<b>32</b>
3.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	32
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	32
3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	33
3.4 RECOLECCIÓN DE DATOS E INSTRUMENTO .....	37
3.5 PROCEDIMIENTO MATERIALES Y EQUIPOS .....	37

<b>CAPITULO IV RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITULO V DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La leucemia mieloide aguda subtipo M2 representa el 25 al 30 % de las neoplasias hematológicas más frecuentes en adultos y en el Perú, al año se presentan alrededor de 181 casos nuevos. Según la Organización Mundial de la Salud el diagnóstico se realiza mediante el estudio inmunofenotípico y citogenético. **OBJETIVOS:** Determinar las características inmunofenotípicas y las alteraciones citogenéticas en pacientes con diagnóstico de LMA-M2. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Estudio de tipo descriptivo retrospectivo, transversal de diseño no experimental. Se evaluó la frecuencia de los principales marcadores inmunofenotípicos por citometría de flujo así como las alteraciones cromosómicas presentes en estos pacientes, usando la tecnología de citogenética convencional y además se evidenció la relación de estos marcadores con dichas alteraciones cromosómicas. **RESULTADOS:** Los marcadores más frecuentes fueron CD117 (98.3%), HLA-DR (91.3%), CD34 (87.9%), CD13 (96.5%), CD33 (91.4%), MPO (91.3%), CD71 (80%), CD15 (69%) y menos frecuente el CD64 (30.1%), CD11B (15.6%) y CD14 (2.9%). La expresión de antígenos linfoides fue común siendo el CD19 (43.9%) y CD56 (40.2%) los más frecuentes y entre los menos comunes el CD7 (19.8%) y CD79A (4%). La alteración citogenética más frecuente fue la t(8; 21)(q22; q22) (53.1%) y los pacientes con dicha alteración se relacionaban a mayor expresión de antígenos de origen linfóide CD19 y CD56 y presentan alteraciones secundarias como la pérdida de cromosoma sexual en la mayoría de los casos (38.2%). **CONCLUSIONES:** Los pacientes con LMA-M2 presentaron características inmunofenotípicas y alteraciones citogenéticas frecuentes, relevantes para el diagnóstico, clasificación, selección de estrategias terapéuticas y pronóstico de los pacientes.

**PALABRAS CLAVES:** leucemia mieloide aguda, inmunofenotipo, marcadores antigénicos, alteraciones citogenéticas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Acute myeloid leukemia subtype M2 represents 25 to 30% of the most frequent hematological neoplasms in adults and in Peru, around 181 new cases occur each year. According to the World Health Organization, the diagnosis is made by immunophenotypic and cytogenetic study. **OBJECTIVES:** To determine the immunophenotypic characteristics and the cytogenetic alterations in patients diagnosed with AML-M2. **MATERIALS AND METHODS:** Retrospective descriptive, cross-sectional study of non-experimental design. The frequency of the main immunophenotypic markers was evaluated by flow cytometry as well as the chromosomal alterations present in these patients, using conventional detection technology and the relationship of these markers with chromosomal alterations is evidenced. **RESULTS:** The most frequent markers were CD117 (98.3%), HLA-DR (91.3%), CD34 (87.9%), CD13 (96.5%), CD33 (91.4%), MPO (91.3%), CD71 (80%), CD15 (69%) and less frequent CD64 (30.1%), CD11B (15.6%) and CD14 (2.9%). The expression of lymphoid antigens was common being CD19 (43.9%) and CD56 (40.2%) the most frequent and among the least common CD7 (19.8%) and CD79A (4%). The most frequent cytogenetic alteration was t(8; 21) (q22; q22) (53.1%) and patients with this alteration were related to greater expression of antigens of lymphoid origin CD19 and CD56 and present secondary alterations such as the loss of sexual chromosome in the most cases (38.2%). **CONCLUSIONS:** Patients with AML-M2 presented immunophenotypic characteristics and frequent cytogenetic alterations, relevant for the diagnosis, classification, selection of therapeutic strategies and prognosis of patients.

**KEYWORDS:** Acute myeloid leukemia, immunophenotype, antigenic markers, cytogenetic alterations.

## INTRODUCCIÓN

En el transcurso de los años se ha observado que el cáncer es una de las enfermedades con incremento en índices de mortalidad y morbilidad, y según estadísticas tendría una tendencia a aumentar hasta en 70% de casos nuevos en los próximos años (Ferlay et al., 2013). Una de las neoplasias hematológicas más frecuentes es la leucemia mieloide aguda (LMA), en donde se produce una proliferación clonal de células leucémicas inmaduras o también llamados blastos, en medula ósea, dicha proliferación es descontrolada y es generada por alteraciones a nivel cromosómico y molecular (Merino, 2010). Esta patología según el sistema de clasificación French American British (FAB) se clasifica en 8 subtipos (desde M0 a M7) siendo una de las más frecuentes la LMA subtipo M2 (LMA-M2) (20-25%) (Suela, 2008). Recientemente existe la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que agrupa a LMA-M2 en LMA-NOS (no especificada de otra manera) y un subgrupo con  $t(8;21)(q22;q22)$  ( $t(8;21)$ ) relacionado a pacientes con LMA-M2, siendo esta una alteración cromosómica recurrente considerada por la OMS como una entidad aparte y que se relaciona a altas tasas de remisión (Swerdlow et al., 2008). La LMA-M2 se puede presentar en diferentes grupos etarios sin embargo se registra una mayor frecuencia en pacientes jóvenes menores a 25 años y en adultos mayores a 60 años por lo que el diagnóstico se basa en la integración de la clínica del paciente, análisis morfológico, citoquímico, inmunofenotípico, citogenético y molecular, en el caso de estos últimos estudios brindan información principalmente sobre el pronóstico del paciente mientras que el inmunofenotipo permite determinar el linaje y subtipo mieloide a la hora del diagnóstico. El conjunto de toda esta información brindada es fundamental para la selección del tratamiento y seguimiento de esta enfermedad (Swerdlow et al., 2008; Döhner et al., 2010).

## **CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1 IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el Perú según estadísticas de cáncer del INEN, hay una tendencia en el incremento de incidencia de LMA, ya que entre los años 2004-2005 la tasa era de 2.14 casos por 100 mil habitantes, un aproximado de 181 casos por año, que comparando con el intervalo de los años 2006-2015 aumentó a 203 casos por año (INEN, 2016). La OMS establece que para el diagnóstico de LMA se requiere análisis inmunofenotípico, el cual permite clasificar el tipo leucemia en LMA-M2, mientras que el estudio citogenético es importante para hallar alteraciones cromosómicas que se relacionan con el pronóstico del paciente (Swerdlow et al., 2008). La LMA-M2 es una de las neoplasias hematológicas más frecuentes en adultos en nuestro país y actualmente no se cuentan con estudios nacionales que evalúen las características inmunofenotípicas y citogenéticas halladas en este subtipo de LMA.

### **1.2 FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS GENERALES Y ESPECÍFICAS**

#### **1.2.1. PROBLEMA GENERAL**

- ¿Cuáles son las características inmunofenotípicas y alteraciones citogenéticas en pacientes con diagnóstico de LMA subtipo M2 en el INEN durante el periodo 2003-2014?

#### **1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS**

- ¿Cuáles son los marcadores inmunofenotípicos más frecuentes en pacientes con LMA subtipo M2?
- ¿Cuáles son las alteraciones citogenéticas más frecuentes en pacientes con LMA subtipo M2?

### **1.3. OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar las características inmunofenotípicas y alteraciones citogenéticas en pacientes con diagnóstico de LMA subtipo M2.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la frecuencia de los marcadores inmunofenotípicos en pacientes con LMA subtipo M2.
- Determinar las alteraciones citogenéticas numéricas y/o estructurales en pacientes con LMA subtipo M2.
- Determinar la frecuencia de los marcadores inmunofenotípicos relacionados con la presencia de la t (8; 21) (q22; q22) en pacientes con LMA subtipo M2.

### **1.4 JUSTIFICACIÓN**

A nivel mundial el cáncer es una de las enfermedades con incremento en tasas de incidencia y mortalidad a lo largo de los años, por lo cual constituye un problema de salud pública. Las neoplasias hematológicas como las leucemias son relevantes debido a la incidencia en edades tempranas y en adultos, siendo la leucemia mieloide aguda subtipo M2 la más frecuente en este último grupo etario. En el año 2009 se registraron alrededor de 12810 casos de leucemia mieloide aguda de los cuales 9000 fallecerán a causa de esta. En el Perú el manejo de esta enfermedad se da mediante sistemas de vigilancia epidemiológica enfocada en la prevención y fortalecimiento de registros de base hospitalarios y científicos que permitan un control de esta patología. En el Instituto nacional de enfermedades neoplásicas se realizan el diagnóstico y

tratamiento de esta enfermedad que involucra un conjunto de información ,que junto a la clínica, permiten una mejor evaluación del paciente.La caracterización inmunofenotípica y citogenética en este tipo de leucemia ha tomado relevancia en los últimos años y es que a raíz de la aparición de nuevas tecnologías para el manejo de esta enfermedad en ambas áreas, se han incluido como herramientas diagnósticas y han sido tomadas por la OMS en su última clasificación del 2008 como características fundamentales para el manejo de estos pacientes. Debido a esto es necesario poder evidenciar datos presentes en nuestra población en donde se estudien la frecuencia de marcadores inmunofenotipicos y las alteraciones cromosómicas halladas en pacientes con LMA-M2; ambas características al integrarlas brindan información para el diagnóstico, pronóstico y selección del tratamiento.

Con el presente trabajo describiremos las características inmunofenotipicas y citogenéticas a través de los marcadores inmunofenotipicos y alteraciones citogenéticas más frecuentemente asociadas en los pacientes con diagnóstico de LMA- M2 en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas en el periodo del 2003-2014.

## **CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO**

### **2.1. ANTECEDENTES**

Andrieu et al. (1996) Realizo un estudio de diseño experimental de cohorte transversal para la "Detección molecular de la t (8; 21) / *AML1-ETO* en la LMA M1/M2: correlación con la citogenética, morfología e inmunofenotipo", en donde analizaron 64 casos de LMA subtipo M1 y M2 y se evaluó mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa usando la enzima transcriptasa reversa) la detección del gen de fusión *AML1-ETO* y se relacionó con la morfología y marcadores inmunofenotipicos. Los resultados obtenidos mostraron que usando esta técnica molecular se aumentó la tasa de detección global del 8% a 14%. Se encontró el gen de fusión *AML1-ETO* en el 3% (1/32) de LMA- M1 y el 25% (8/32) de pacientes con LMA-M2. Los pacientes con este gen de fusión eran más jóvenes y algunos casos positivos se relacionaron a la expresión de CD19 y CD34, y la negatividad de CD33, sin embargo estos

marcadores no son específicos para predecir la alteración. Esta investigación concluye que es importante la detección molecular del gen de fusión *AML1-ETO* en los pacientes con LMA en conjunto con análisis morfológico e inmunofenotípicos estandarizados para una mejor estratificación pronóstica.

Khalidi et al. (1998) investigó “El inmunofenotipo de la leucemia mieloide aguda en adultos: alta frecuencia de la expresión del antígeno linfoide y comparación de inmunofenotipo, clasificación FAB, y anomalías cariotípicas”. Estudio de diseño experimental de cohorte transversal. Se analizaron 106 casos de LMA usando el estudio citoquímico y citometría de flujo con un panel de 22 anticuerpos; encontrando que los antígenos CD45, CD33, y CD13 fueron los más frecuentes expresados en un 97,2%, 95,3% y 94,3%, respectivamente, por otro lado la expresión de los antígenos linfoides estuvo presente en el 48.1% de los casos. El antígeno linfoide más frecuente fue el CD20 (17%) mientras que otros antígenos linfoides como el CD7, CD19, CD2, CD3, CD5 y CD10 se expresaron en 16% , 9.8% ,7.5% , 6.7% , 4.8% y 2.9% respectivamente. Se observó que la expresión de CD19 no se relacionó específicamente con la t(8; 21), además se encontró que todos los pacientes con esta alteración cromosómica eran LMA subtipo M2. Esta investigación concluye que el estudio de inmunofenotípico es útil para determinación del linaje mieloide sin embargo no es suficientemente específico en cada subtipo FAB, así como en los subtipos de LMA clasificadas por alteraciones citogenéticas.

Ghosh et al. (2003) realizó una investigación “Perfil hematológico e inmunofenotípico de la leucemia mieloide aguda: experiencia del Tata Memorial Hospital”. Estudio descriptivo retrospectivo transversal de diseño no experimental. Se analizaron 260 casos de LMA de novo y la inmunofenotipificación fue por citometría de flujo y citoquímica. El 76%(198) eran adultos y 24%(72) fueron pacientes pediátricos, en ambos grupos el tipo de leucemia más frecuente fue la LMA-M2 en 32% y 42 % respectivamente. En todos los subtipos de LMA los marcadores más frecuentes fueron CD33 y CD13, y se registró más alta positividad de HLA-DR en LMA-M2. La expresión del CD34 fue del 18.5% al 66.7% en todos los subtipos de LMA y se observó

la expresión de antígenos linfoides en el 15 %, donde el CD7 fue el más frecuente (11%) y de menor frecuencia el CD10 (0.8%).

Zheng et al. (2008) realizó una investigación “Correlación del inmunofenotipo, la citogenética y características clínicas de pacientes con LMA en China”. Estudio experimental de cohorte transversal; se estudiaron 180 pacientes con diagnóstico de LMA. El estudio inmunofenotípico se realizó mediante citometría de flujo y el estudio del cariotipo con tecnología de bandas G. La expresión de los marcadores mieloides como el CD33, CD13 y mieloperoxidasa (MPO) se expresaron en 96,1%, 86,7% y 80,7%, respectivamente, mientras que la expresión de los marcadores de inmadurez fue de HLA-DR (72.8%), CD117 (81.7%) y CD34 (55.0%). De los 180 pacientes 73 casos correspondían a pacientes con LMA-M2 y a 55 de ellos se analizó el estudio de cariotipo, encontrándose que 16(29%) presentaban la t (8; 21), siendo esta únicamente hallada en este subtipo y se relacionó con una alta expresión significativa de CD15, CD19, CD34 y CD56 en comparación con los pacientes sin t (8; 21). La expresión de antígenos linfoides como CD22, CD56 y TdT en todas las subtipos de LMA fueron frecuentes y se relacionaron con cariotipo anormal ( $P < 0.05$ ). En los casos de LMA-M2, el CD19 fue el marcador con más alta expresión y los marcadores CD2 y CD7 se expresaron en alrededor del 10% y ninguno de los casos presentaron la t (8; 21). La conclusión de esta investigación fue de que el estudio inmunofenotípico fue útil para el diagnóstico y clasificación de las LMA y la expresión anormal de antígenos está relacionada a anomalías en el cariotipo y características clínicas.

Tong et al. (2009) investigó “Inmunofenotipos, citogenética y características clínicas de 192 pacientes con LMA”. Estudio experimental de cohorte transversal. El análisis inmunofenotípico se realizó mediante la citometría de flujo y el estudio citogenético usando la tecnología de bandas G. Se estudió a 192 pacientes con LMA y los resultados mostraron que CD33, CD13 y MPO y CD117 fueron los antígenos más comúnmente expresados.

La expresión de marcadores linfoides fue de 47.9 % del total de casos siendo los más comunes el CD56 (26,0%) y CD7 (20,8%) y con menor expresión el CD19 (9,9%) y el CD2 (7,3%). Del total de casos se realizó a 125 pacientes el análisis de cariotipo encontrando que 76 (60.8 %) presentaron cariotipos anormales. La t (8; 21) se encontró sólo en 17 casos de LMA-M2 y se relacionó con la expresión de los marcadores CD15, CD19 y CD56. La investigación concluye el análisis inmunofenotipo es relevante para la clasificación y diagnóstico de LMA y sugiere la integración de los resultados inmunofenotipicos con la morfología y citogenética principalmente para estimar el pronóstico de esta enfermedad.

Osman et al. (2015) en su investigación “Caracterización inmunofenotípica de LMA”. Estudio descriptivo retrospectivo transversal de diseño no experimental. Se analizaron 106 casos de LMA utilizando citometría de flujo de 4 colores, algunos de los marcadores inmunofenotipicos usados fueron CD45, HLA-DR, CD34, CD117, marcadores mieloides como CD13, CD33, CD19, CD7 y marcadores citoplasmáticos como CD3, CD79a, MPO entre otros. Los resultados mostraron que el subtipo de LMA más frecuente fue el LMA-M0 (27,6%). En los pacientes con LMA-M2 la expresión de HLA-DR fue de 84.5% mientras que todos los casos de este subtipo presentaron CD34 y CD117, hallándose una correlación positiva ( $r = 0.763$ ) entre ambos marcadores. Los marcadores mieloides CD13 y CD33 presentaron una positividad media de 51,7% y 50,3%, respectivamente en todos los casos de LMA y los marcadores aberrantes linfoides más frecuentes fueron el CD7 (45.1%) y CD19 (13.6%), principalmente en pacientes con LMA-M2. El estudio concluye que la citometría de flujo es una herramienta útil para el diagnóstico y clasificación de las LMA y resalta la importancia de estos estudios en laboratorios donde no se realizan análisis citogeneticos ni moleculares y se recomienda investigaciones que correlacionen información citogenética y hallazgos inmunofenotipicos.

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

## **2.2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

### **2.2.1.1. Concepto**

La LMA es una neoplasia maligna hematológica en donde el proceso de hematopoyesis es anormal, debido a alteraciones adquiridas a nivel genético de las células madre hematopoyéticas específicamente de estirpe mieloide, estas alteraciones producen un bloqueo en la diferenciación celular lo que resulta en una proliferación clonal de dichas células inmaduras en médula ósea, que pueden infiltrar otros órganos (Hoyos, 2014).

### **2.2.1.2. Etiología**

El origen de la LMA si bien es actualmente investigada, se sabe que esta puede surgir a causa de exposición a agentes genotóxicos (radiación, benceno, agentes alquilantes, etc.) o bien luego de alguna enfermedad hematológica previa; sin embargo la mayoría de pacientes previamente sanos presentan de novo esta patología (De Kouchkovsky y Abdul-Hay, 2016). Independientemente de cual sea el origen, la LMA tiene características genéticas, fenotípicas y epigenética complejas; es así que en un mismo pacientes se pueden encontrar alteraciones únicas coexistentes por lo que se ha enfocado el estudio en estas alteraciones genéticas con el fin de desarrollar tratamiento contra la enfermedad (Löwenberg y Rowe, 2016).

Se han descritos diversos factores de riesgo asociados a LMA como se muestra en la tabla N°1.

**Tabla N°1.** Factores de riesgo asociados a LMA (Deschler y Lübbert, 2006).

<b>Desordenes Genéticos</b>	<b>Exposiciones físicas y químicas</b>	<b>Exposición a la radiación</b>	<b>Quimioterapia</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Down</li> <li>• Síndrome de Klinefelter</li> <li>• Síndrome de Patau</li> <li>• Ataxia telangiectasia</li> <li>• Síndrome de Shwachman</li> <li>• Síndrome de Kostman</li> <li>• Neurofibromatosis</li> <li>• Anemia de Fanconi</li> <li>• Síndrome de Li-Fraumeni</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benceno</li> <li>• Drogas (pipobroman)</li> <li>• Pesticidas</li> <li>• Cigarro</li> <li>• Líquidos de embalsamamiento</li> <li>• Herbicidas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Radiación terapéutica y no terapéutica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agentes alquilantes</li> <li>• Inhibidores de la topoisomerasa II</li> <li>• Antraciclinas</li> <li>• Taxanos</li> </ul>

### **2.2.1.3. Epidemiología**

La leucemia es una neoplasia que se presenta con una incidencia de 2.5 por 100 000 habitantes, presentándose alrededor de 351965 casos en todo el mundo (Ferlay et al., 2013). Según el National Cancer Institute en el caso de las LMA (1.3% de todos casos nuevos de cáncer) en los Estados Unidos entre los años 2010 y 2014 el número de casos nuevos fue de 4.2 por cada 100,000 personas y se estima que para el presente año habrá 21,380 nuevos casos, dándose alrededor de 10,590 defunciones a causa de esta enfermedad (Howlader et al., 2017). Otros países en donde se registra una mayor incidencia son Australia y Europa Occidental. En nuestro país según el INEN entre los años 2006-2015 se registró un aumento de 203 casos de LMA por año (INEN, 2016).

La LMA se puede presentar a cualquier edad y según datos estadísticos es más frecuente en pacientes adultos (80%) y tiene una elevada tasa de incidencia en pacientes menores de 5 años; sin embargo en este grupo de paciente pediátricos se registra una mayor incidencia de leucemia linfática aguda por lo que la LMA se expresa entre el 15 al 20% en pacientes menores de 15 años (Deschler y Lübbert, 2006; Lagunas, 2016).

#### **2.2.1.4. Características Clínicas**

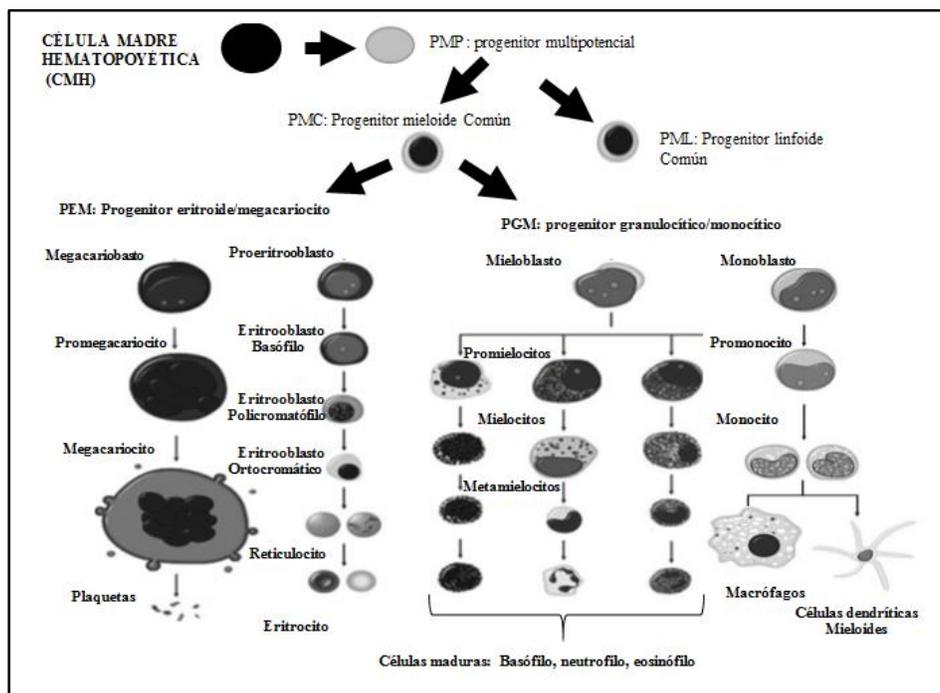
Los pacientes con LMA como consecuencia del bloqueo de la diferenciación celular, las células sanguíneas inmaduras abarcan toda la medula ósea y por consiguiente en el torrente sanguíneo existirá una disminución de las células sanguíneas maduras, presentándose citopenias marcadas (anemia, trombocitopenia y neutropenia) con o sin leucocitosis. Esto se traduce a que los pacientes contraigan infecciones y hemorragias y un conjunto de signos y síntomas como palidez, debilidad, disnea, cansancio, petequias y epistaxis (Kabel et al., 2017). La cuarta parte de los pacientes cursan con dolores óseos y articulares mientras que las infiltraciones a otros órganos como el bazo (esplenomegalia) son frecuentes (Espinola et al., 2011). Se han descrito que entre el 3 y 9% pueden presentar tumores sólidos (cloromas) en diferentes partes del cuerpo (huesos, tejidos blandos, región orbitaria, etc.), estos tumores son originados por células inmaduras mieloides descritas con mayor frecuencia en pacientes con LMA-M2 (Rojas, Álvarez y Suárez, 2016).

#### **2.2.1.5. Fisiopatología**

Para comprender el mecanismo de la leucemogénesis es necesario conocer el proceso de hematopoyesis normal y de los mediadores de su regulación: los factores de transcripción y las citoquinas.

La formación y maduración de las células sanguíneas se da en la medula ósea y surge a partir de una célula madre hematopoyética multipotente con capacidad de auto renovación y de diferenciación hacia células progenitoras hematopoyéticas, las cuales al seguir una ruta de diferenciación de un linaje celular pierden la capacidad de auto renovación y ganan características fenotípicas específicas (Doulatov et al., 2012).

Este mecanismo tiene como finalidad la generación de dos linajes celulares principalmente, el linaje mieloide (serie granulocítica, monocítica, megacariocítica y eritroide) y linfoide (células T, B y Natural Killer) (Martínez, 2015). En la figura N°1 se resume la hematopoyesis normal.



**Figura N°1.** La Hematopoyesis se origina a partir de una CMH con capacidad de auto-regeneración y diferenciación hacia un progenitor multipotente PMP donde pierde la capacidad de autorreplicación y toma una ruta hacia un linaje específico PMC o PML. En el caso de diferenciarse en línea mieloide dará lugar a progenitores PGM y PEM, esto desencadena los procesos de trombopoyesis, eritropoyesis, granulopoyesis y monocitopoyesis, resultando las células sanguíneas en estadios maduros como son las plaquetas, eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos. (Suñer, 2008; Granada, 2011). A medida que se produce la diferenciación y maduración de las células, se da la expresión de antígenos celulares. A continuación se describen en la tabla N°2 los marcadores antigénicos expresados en la granulopoyesis y monopoyesis principalmente (Muñoz, 2005).

**Tabla N°2.** Expresión antigénica en los diferentes estadios de maduración celular (Muñoz, 2005).

<p><b>Granulopoyesis:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estadio I (mieloblasto): coexpresion de CD34,CD38,HLA-DR Y CD33</li> <li>• Estadio II( promielocito): CD34 (-) y HLA-DR (-) , y CD15 (+) y CD13(+)</li> <li>• Estadio III (mielocito): CD11b (+), disminución de CD33 y CD13(-)</li> <li>• Estadio IV(metamielocito): CD13 (+) , disminuye CD33 y CD16 (+)</li> <li>• Estadio V (neutrofilo): CD16 (+), CD13 (+). CD10(+) y CD45(+)</li> </ul>
<p><b>Monopoyesis :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoblasto: coexpresion de CD34,CD38,HLA-DR y CD33</li> <li>• Promonocito: aumento CD11b , CD13(+) y CD33(+),HLA-DR(+)</li> <li>• Monocito: CD14(+) , CD45(+) , débil CD15 y CD16</li> </ul>

En la LMA la transformación leucémica se produce en los progenitores hematopoyéticos producto de alteraciones cromosómicas y mutaciones génicas, esto conlleva al fallo de ciertos mecanismos implicados en la diferenciación celular. Los factores de transcripción al estar alterados van a producir un bloqueo en la diferenciación y además de ello, se da una autosuficiencia de señales de crecimiento provocando la proliferación descontrolada de la célula. La célula leucémica tiene capacidad también de evadir la apoptosis y presentan alteraciones a nivel del control del ciclo celular e inestabilidad genómica (Granada, 2011).

Como consecuencia de los mecanismos alterados en la célula afectada se presentan alteraciones en la expresión de antígenos celulares a los que se denominan fenotipos aberrantes, estas engloban alteraciones de infidelidad de linaje, ausencia de antígenos específicos de linaje, cambios en la expresión de antígenos, asincronismo madurativo, fenotipos ectópicos y alteraciones en el tamaño y complejidad de la célula (Novoa et al., 2013).

**2.2.1.6. Clasificación**

La LMA se caracteriza por una alta heterogeneidad debido a la diversidad de características fenotípicas y genéticas que presenta; por ello se han desarrollado diversas clasificaciones para

identificar subgrupos con características biológicas específicas. Uno de los sistemas de clasificación es la FAB, que clasifica de acuerdo a criterios morfológicos, citoquímicos e inmunológicos, quedando así diferenciada la LMA en 8 subtipos principalmente desde M0 a M7 (Saultz y Garzon, 2016). Dentro de estos subtipos una de las más frecuentes es la LMA-M2 representando entre el 20-25% de todas las LMA (Suela, 2008).

**Tabla N°3.** Clasificación FAB de la LMA (Suela, 2008).

M 0	MÍNIMAMENTE DIFERENCIADA (3%)
M 1	LMA SIN MADURACIÓN (15- 20%)
M 2	LMA CON MADURACIÓN (25-30%)
M 3	LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (5-10%)
M 4	LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA AGUDA (20%)
M4EO	LEUCEMIA MIELOMONOCITICA AGUDA CON EOSINOFILIA (5-10%)
M 5	LEUCEMIA MONOCÍTICA AGUDA (2-10%)
M 6	ERITROLEUCEMIA (3-5%)
M 7	LEUCEMIA MEGACARIOCÍTICA AGUDA (3-12%)

Actualmente existe la clasificación propuesta por la OMS la cual incluye los estudios citogenéticos y moleculares, ambas herramientas útiles por la alta frecuencia de alteraciones cromosómicas y genéticas ya caracterizadas con relevancia pronóstica (Ibáñez, 2013).

La OMS clasifica la LMA-M2 en un subgrupo de LMA-NOS (no especificadas de otra manera) y separa la t(8;21), una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en LMA-M2, en un grupo aparte de alteraciones citogenéticas recurrentes (Swerdlow et al., 2008).

La versión inicial de la clasificación fue en el año 2008, recientemente se encuentra la revisión del año 2016, presentada en la tabla N°4.

**Tabla N°4.** Revisión del 2016 de la clasificación de la OMS de las neoplasias mieloides (Arber et al., 2016).

<b>Leucemia mieloide aguda (LMA) y los tumores relacionados</b>
<b>LMA con anomalías genéticas recurrentes</b>
LMA con t (8; 21) (q22; q22.1); RUNX1-runx1t1
LMA con inv (16) (p13.1q22) o t (16; 16) (p13.1; q22); CBFβ-MYH11
APL 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
AML (megacarioblástica) con t (1; 22) (p13.3; q13.3); RBM15-MKL1
Entidad provisional: LMA con BCR-ABL1
LMA con mutación de NPM1
LMA con mutaciones bialélicas de CEBPA
Entidad provisional: LMA con RUNX1 mutado
LMA con los cambios relacionados con mielodisplasia
neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento
<b>LMA, NOS</b>
LMA con diferenciación mínima
LMA sin maduración
LMA con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
monoblástico aguda / leucemia monocítica
La leucemia eritroide pura
leucemia aguda megacarioblástica
leucemia basófila aguda
panmielosis aguda con mielofibrosis
El sarcoma mieloide
proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
mielopoyesis anormal transitoria (TAM)
leucemia mieloide asociada con el síndrome de Down

### 2.2.1.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la LMA se basa en la integración de los estudios morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos, moleculares y la evaluación clínica del paciente (Döhner et al., 2010). Según la OMS el criterio primordial es el recuento morfológico de  $\geq 20\%$  de blastos en medula ósea y/o sangre periférica en un recuento de 500 y 200 células respectivamente (Swerdlow et al., 2008). Existen algunas excepciones en este criterio y es que se han observado que algunas alteraciones citogenéticas recurrentes como la t (8; 21) presentan niveles bajos de

blastos, pese a ello se deben diagnosticar como LMA (Chauffaille, Borri y Martins ,2004).Para definir el linaje mieloides de la leucemia se utiliza la citoquímica con la positividad de la MPO, y además por la presencia de bastones de Auer en los blastos .Se han desarrollado tecnologías que permiten clasificar la LMA, esto comprende el estudio inmunofenotípico que a través de la expresión de marcadores antigénicos permite tipificar la leucemia y también sus subtipos. Para considerar una leucemia aguda en LMA se deben expresar dos o más marcadores mieloides como por ejemplo MPO, CD13, CD33 y CD117, este criterio es según el grupo europeo para la clasificación inmunológica de leucemias (EGIL) (Legrand et al. ,2000).El estudio genético es el marcador pronóstico más importante. Al identificar las alteraciones citogenéticas y moleculares se establecen estrategias terapéuticas ya identificadas anteriormente mejorando el resultado de los pacientes con LMA (Ofra y Rowe, 2012).

## **2.2.2 ESTUDIO INMUNOFENOTIPO Y CITOGENÉTICO EN LMA**

### **2.2.2.1. Inmunofenotipo**

La identificación de los antígenos presentes en la población leucémica se realiza mediante el estudio inmunofenotipo, la cual en base a las características de tamaño y complejidad de la célula permite diferenciar la clona leucémica de otras subpoblaciones celulares (Ortuño y Orfao, 2002).

El inmunofenotipaje se realiza mediante la metodología de citometría de flujo que combina anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos celulares, lo que permite conocer a que linaje se asocian los marcadores presentes y el estadio de maduración de las células leucémicas (Pino et al., 2014).

En el proceso del inmunofenotipaje es importante utilizar una metodología para la selección de anticuerpos monoclonales. Según el consorcio EUROFLOW se ha establecido combinaciones de anticuerpos monoclonales en paneles estandarizados para la tipificación de LMA. Algunos de los marcadores usados son: CD45, cyMPO, CyCD79a, CD34, CD117, HLA-DR, CD13,

CD15, CD45, CD71, CD11b, CD19, CD56, entre otros (Van Dongen et al., 2012). El protocolo EUROFLOW detalla en el anexo N° 3.

### 2.2.2.2. Citogenética

Múltiples alteraciones citogenéticas y moleculares son encontradas en LMA. La importancia de ambos estudios principalmente al momento del diagnóstico recae en que se han hallado anomalías que se categorizan como entidades clínico patológico definidas, permitiendo estratificar grupos de riesgo para la aplicación de estrategias terapéuticas, además de brindar información predictiva sobre la supervivencia libre de enfermedad, tasas de remisión completas y riesgo de recaída (Prada – Arismendy, Arroyave y Röthlisberger, 2017).

Los grupos de riesgo citogenéticos fueron establecidos según la Medical Research Council, del Reino Unido (MRC) en tres tipos: riesgo favorable, intermedio y desfavorable. Los pacientes con riesgo favorable representan el 10 al 15% donde se encuentran las translocaciones recurrentes principalmente, por otro lado los de riesgo intermedio (50-60%) se encuentran los pacientes con citogenética normal y finalmente los de riesgo desfavorable presentan cariotipo complejo u otras alteraciones infrecuentes (Shipley y Butera, 2009). En la tabla N°5 se resume los grupos de riesgo y las alteraciones cromosómicas encontradas en cada grupo.

**Tabla N°5.** Grupos de riesgo citogenéticos en pacientes con LMA (Shipley y Butera, 2009).

Grupo de riesgo	Riesgo favorable	Riesgo intermedio	Riesgo desfavorable
	t (15; 17) (q22; q12-21)	Cariotipo normal	Cariotipo complejo
	t (8:21) (q22; q22)	t (9; 11) (p22; q23)	inv (3) (q21q26) / t (3; 3) (q21; q26)
	inv (16) (p13q22) /	del (7q)	t (6; 9) (p23; q34)
	t (16; 16) (p13; q22)	del (9q)	t (6; 11) (q27; q23)

Alteraciones cromosómicas		del (11q)	t (11; 19) (q23; p13.1)
		del (20q)	del (5q)
		-Y	-5
		+8	-7
		+11	
		+13	
		+21	

Los pacientes con cariotipo normal constituye uno de los grupos con riesgo intermedio y en este subgrupo es fundamental el uso de pruebas moleculares ya que se han encontrado mutaciones genéticas, expresiones desregulada de genes y alteraciones al nivel de ARN no codificantes (microRNAs) que se relacionan con este grupo de pacientes (Marcucci et al., 2011).

### **2.2.3. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON MADURACIÓN (LMA-M2)**

#### **2.2.3.1. Características morfológicas e inmunofetipicas**

La LMA-M2 es una de los subtipos de LMA más frecuentes (25-30%) y posee características morfológicas, inmunofenotipicas y citogenéticas frecuentemente halladas (Suela, 2008). En el estudio morfológico en medula ósea se evidencian estadios madurativos del linaje neutrófilo  $\geq 10\%$  y  $< 20\%$  de células del linaje monocítico; además se puede encontrar un aumento de basófilos y mastocitos (Swerdlow et al. , 2008). Los blastos presentan cromatina laxa con o sin

nucleolos, su tamaño es variable van desde pequeños a medianos, la relación N/C es elevada y el citoplasma es basófilo granular con presencia de bastones de Auer en algunos casos. El inmunofenotipo se caracteriza por la expresión de MPO y marcadores antigénicos mieloides como el HLA-DR, CD34, CD13, CD33, CD11b, CD117 mientras que los marcadores monocíticos como el CD14 y CD64 son generalmente ausentes. En este subtipo de LMA, es frecuente la expresión de marcadores aberrantes de origen linfoide como el CD7, CD56, CD19, CD4 y CD2 (Merino, 2010).

### **2.2.3.2. Características citogenéticas en la LMA- M2**

En el análisis citogenético en pacientes con LMA-M2, se reportan cariotipos normales y alrededor del 40% de los casos se detecta la t (8; 21), esta alteración es la más frecuente en esta categoría y de todas las LMA (15%). Se puede hallar en otros subtipos FAB (M1 y M4) sin embargo es infrecuente (Rueda et al., 2004).

### **2.2.3.3. LMA - M2 con t (8; 21) (q22; q22)**

Los pacientes con LMA-M2 y la t (8; 21) suelen ser más jóvenes en comparación con la frecuencia de LMA-M2 en adultos y entre el 10-20% son de edad pediátrica (Reikvam et al., 2011). En el estudio morfológico los blastos poseen características como la presencia de gránulos pseudo Chediak-Higashi y algunos bastones de Auer. Las células inmaduras del linaje mieloides pueden presentar displasia, y es frecuente encontrar pseudoPelger-Huet en los neutrófilos, así como incrementos de eosinófilos, basófilos y mastocitos (Swerdlow et al., 2008). Mediante el estudio inmunofenotipo de estos pacientes se han relacionado la expresión

de antígenos como CD34, HLA-DR, MPO, CD13, una expresión débil de CD33 y expresión de antígenos aberrantes de linaje linfoide como el CD7, CD19 y CD56 (Nishii et al., 2003). El marcador CD56 es una glicoproteína con función de adhesión celular neuronal que se presenta normalmente en células NK, células T y es considerado de mal pronóstico; por ello se están investigando si la expresión de algunos marcadores antigénicos cambiarían el pronóstico de dicha alteración (Di Bona et al., 2002).

#### **2.2.3.4. Citogenética de la t (8; 21) (q22; q22)**

En la t (8; 21) se produce la fusión de los genes AML1 (cromosoma 21) y ETO (cromosoma 8), también llamados RUNX1 / RUNX1T1. Como resultado de la fusión se genera una proteína quimérica AML1-ETO, con capacidad de alterar la función de factor de transcripción de AML1, principalmente en la codificación de la subunidad alfa de factor de unión al núcleo (CBF) y genes diana de AML1. Estos mecanismos son importantes para la diferenciación hematopoyética (Licht, 2001; Lin et al., 2008). Otra consecuencia de esta fusión anormal es la proliferación de las células y evasión de la apoptosis, esto debido a que normalmente promueve un incremento de la expresión de la proteína p21, encargada de bloquear el ciclo celular sin embargo esta proteína de fusión genera una baja expresión de p21 (Granada, 2011).

En las distintas investigaciones se hallan anomalías secundarias junto a la t (8; 21) en alrededor de 70% de los casos. Las anomalías secundarias más frecuentes son la pérdida del cromosoma sexual y la delección del brazo largo del cromosoma 9 (del(9q)) (Gritsaev et al., 2014). Otras alteraciones descritas en menor porcentaje son las trisomías de los cromosomas 4, 6, 8 y más de dos alteraciones cromosómicas lo que formaría cariotipos complejos junto con la t(8;21). Estudios en los que se investigó si estas alteraciones cromosómicas adicionales afectarían en el pronóstico del paciente muestran que estarían relacionadas a un mal pronóstico sin embargo otros autores manifiestan que no tendría implicancia pronóstica (Choi et al., 2010; Grimwade et al., 2010).

Diversas mutaciones son necesarias para que se dé la transformación leucémica en las células hematopoyéticas inmaduras, por lo que la t(8;21) implica otras alteraciones para desencadenar la enfermedad. Mutaciones en los genes *FLT3* y *KIT* son frecuentes y se asocian a un mal pronóstico (Iwanaga et al., 2009). Alrededor del 6-31% de LMA se asocia a mutaciones *KIT* mientras que la duplicación interna en tándem del *FLT3* (*FLT3-DIT*) es poco frecuente (5%). También se han reportado mutaciones en el gen *JAK2 V617F* (10%) de igual forma relacionado a pronóstico desfavorable (Illmer et al., 2007). En algunos estudios se encontraron en el 23% de los pacientes con t(8;21) alteraciones a nivel del factor de transcripción ZBTB7A, otro gen con funciones en la regulación del desarrollo hematopoyético (Hartmann et al., 2015).

#### **2.2.3.5 LMA con citogenética normal**

Los pacientes con LMA con cariotipo normal han sido investigados por una alta frecuencia de mutaciones a nivel genético. Entre los genes más comunes se encuentran *CEBPA*, *FLT3* y *NPM1*; caracterizados por la OMS como entidades específicas detectables por técnicas moleculares (Swerdlow et al., 2008). Si bien estas mutaciones han sido identificadas hay todavía un grupo de pacientes que se diagnostican con citogenética normal y que molecularmente no se identifican mutaciones genéticas. Se ha observado alteraciones de algunos genes implicados en la regulación epigenética, esto contribuiría a un pobre pronóstico de los pacientes, ya que estos mecanismos como por ejemplo la metilación del DNA conllevan a silenciamientos de genes tumores supresores (Ibáñez, 2013).

## 2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Citometría de flujo:** tecnología usada para realizar el estudio inmunofenotipo de las células, diferenciadas de acuerdo a su tamaño y complejidad. El estudio se basa en la detección de antígenos celulares a través de anticuerpos monoclonales específicos (López et al., 2004).
- **Citogenética:** comprende el estudio de los cromosomas, utilizada como herramienta de diagnóstico y pronóstico al permitir la detección de alteraciones citogenéticas en algunas neoplasias hematológicas (Sierra, 2015).
- **Translocación:** es un tipo de alteración cromosómica estructural en donde se produce un intercambio de material genético (Klug, Cummings y Spencer ,2006).

## CAPÍTULO III MÉTODO

### 3.1 TIPO Y DISEÑO DE ESTUDIO

La investigación es de tipo cuantitativa descriptiva, retrospectiva de corte transversal y de diseño no experimental.

### 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

#### 3.2.1. Población

Todos los pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda atendidos en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas.

#### 3.2.1 Muestra

Es de tipo no probabilístico. Se revisaron 237 historias clínicas de pacientes atendidos en el INEN con diagnóstico de leucemia mieloide aguda subtipo M2, registradas durante el periodo 2003- 2014. Del total, se seleccionaron 173 pacientes para el análisis inmunofenotípico y 128 para el análisis citogenético. Los pacientes que se seleccionaron para ambos análisis tanto inmunofenotípico y citogenético fueron 110, a los cuales se le realizó el estudio de la frecuencia de los marcadores inmunofenotípicos relacionados con la presencia de la t (8; 21).

### **3.2.1.1. Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de LMA subtipo M2 de novo.
- Con resultado de estudio citogenético en médula ósea al ingreso.
- Con resultado de estudio de inmunofenotipo en médula ósea al ingreso.
- Admitidos en el INEN a partir del 2003 a 2014.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento quimioterapéutico.

### **3.2.1.2 Criterios de exclusión:**

- Pacientes con diagnóstico de LMA subtipo M2 sin resultado de estudio inmunofenotípico y citogenético no informativo.
- Para el análisis de la relación entre los resultados inmunofenotípicos y citogenéticos se excluyó aquellos casos que recibieron tratamientos con corticoides.

## **3.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

### **3.3.1. Marcadores inmunofenotípicos**

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	CATEGORÍA
----------	----------	-----------	-----------

CD45	Antígeno común de leucocitos	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
HLA-DR	Antígeno MCH de clase II	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD34	Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD117	Antígeno de células madre hematopoyéticas y progenitores	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial – negativo
TDT(desoxinucleotidil transferasa terminal)	Antígeno de precursores linfoides	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD13	Antígeno linaje mieloides (precursores mieloides y Línea granulocítica)	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD15	Antígeno en linaje granulocítico	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial – negativo

CD33	Antígeno linaje mieloide	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
MPO (Mieloperoxidasa)	Antígeno en linaje mieloide (línea granulocítica, monocitos)	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD71	Antígeno células proliferantes precursores mieloides	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD11B	Antígeno línea granulocítica, monocitos, células dendríticas mieloides	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD14	Antígeno monocitos maduros, macrófagos (células mielomonocíticas)	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial – negativo
CD64	Antígeno línea granulocítica: neutrófilos y monocitos	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD19	Antígeno linaje linfocito B y células dendríticas foliculares	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD56	Antígeno células natural killer , subconjuntos de células T	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD4		Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo

	Antígeno linfocitos T helper , monocitos y macrófagos		
CD7	Antígeno células precursoras hematopoyéticas ,células natural killer, células T	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo
CD79a	Subunidad del receptor de antígeno de células B	Citometría de flujo en HC	Positivo – parcial - negativo

HC: Historia Clínica.

### 3.3.2. Alteraciones citogenéticas

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	CATEGORÌA
<b>ALTERACIONES ESTRUCTURALES</b>			
Translocación (t)	Movimiento de un segmento cromosómico hacia un cromosoma no homologo u a otra región del mismo cromosoma	Citogenética convencional en HC	Presencia – ausencia
Delección (del)	Pérdida de un fragmento de un cromosoma.		Presencia – ausencia

		Citogenética convencional en HC	
Inversión (inv)	Segmento cromosómico invertido 180 grados	Citogenética convencional en HC	Presencia – ausencia
Duplicación (dup)	Repetición de un segmento de material genético	Citogenética convencional en HC	Presencia – ausencia
<b>ALTERACIONES NUMÉRICAS</b>			
Monosomía	Perdida de un cromosoma de un par homologo	Citogenética convencional en HC	Presencia – ausencia
Trisomía	Adición de un cromosoma da como resultado tres cromosomas homólogos	Citogenética convencional en HC	Presencia – ausencia

### **3.4 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **3.4.1. Métodos**

Los datos se recolectaran a partir de la información obtenida de las historias clínicas de los pacientes de acuerdo a los criterios de selección.

#### **3.4.2. Instrumentos**

- Se utilizaron fichas de recolección de datos establecido por la información requerida para cada análisis tanto inmunofenotípico como citogenético. La ficha se basa en los criterios de selección y datos en referencia a las técnicas utilizadas para ambas metodologías. ANEXO N° 1.
- Para el análisis de la frecuencia de los marcadores inmunofenotípicos y las alteraciones citogenéticas se utilizó el programa Microsoft Excel versión 2010.

### **3.5. PROCEDIMIENTOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

Con la autorización correspondiente se recolectará la información de las historias clínicas en donde se encuentran los datos de los pacientes que cumplen los criterios ya definidos; dichos pacientes fueron sometidos a estudios de inmunofenotipo y citogenético a partir de en medula ósea para el diagnóstico de la enfermedad. El aspirado de medula ósea se realizó en la Unidad de Procedimientos Especiales del INEN, al ser extraída la muestra es enviada a las distintas áreas para ser analizadas: Hematología especial para el análisis morfológico, al laboratorio de Citometría de flujo para el análisis del inmunofenotipo y a la Unidad de Genética y Biología Molecular para el análisis citogenético convencional y/o molecular.

- El estudio citogenético convencional de médula ósea se realizó mediante el protocolo referencial utilizado en la Unidad de Genética y Biología Molecular para el análisis citogenético convencional. ANEXO N° 2.
- El estudio del inmunofenotipo se basa en el protocolo referencial del Área de Citometría de flujo donde se utiliza el panel estandarizado establecido por el consorcio EUROFLOW. ANEXO N°3.
- **ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE LOS MARCADORES INMUNOFENOTÍPICOS**

Se analizó la expresión de antígenos de células blásticas en médula ósea de 173 pacientes con LMA- M2; los marcadores analizados son de acuerdo a lo establecido en el panel estandarizado

de EUROFLOW (año 2012-2014); sin embargo antes de dicha fecha no estaba estandarizado el proceso por lo que se hizo el estudio de inmunofenotipo con los marcadores más relevantes para el diagnóstico.

Se analizó los marcadores individualmente y se calculó la frecuencia de expresión cada marcador.

Cálculo de la frecuencia de los marcadores inmunofenotípicos:

$$\text{CP \%: } \text{CP} \times 100 / \text{CA}$$

$$\text{CPP \%: } \text{CPP} \times 100 / \text{CA}$$

$$\text{CN \%: } \text{CN} \times 100 / \text{CA}$$

- **Total de casos (CT) : 173**
- **Casos no específicos (CNE):** casos en los que no se le realizó el análisis o no se tuvo información sobre el marcador.
- **Casos analizables (100%) (CA): CT - CNE**
- **Casos positivos (CP):** casos en los que se expresó positivamente el marcador.
- **Casos parcialmente positivos (CPP):** casos en los que se expresó parcialmente el marcador (débil positivo, low ,etc).
- **Casos negativos (CN):** casos en los que no se expresó el marcador.

#### • ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE LAS ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

Se analizó la presencia de alteraciones citogenéticas de 128 pacientes con LMA-M2 mediante análisis porcentual.

## CAPITULO IV RESULTADOS

### 4.1. ESTUDIO INMUNOFENOTIPO DE PACIENTES CON LMA-M2

De los 173 pacientes seleccionados para el estudio, 87(50.3%) fueron varones y 86 (49.7%) mujeres, cuyas edades se especifican en la tabla N° 6.

#### **Tabla N° 6 Frecuencia de edades de pacientes con LMA-M2**

<b>Rango de edades</b>	<b># de pacientes</b>	<b>%</b>
Niños (0 - 11 años)	30	17.3%
Adolescentes (12 -17 años)	23	13.3%
Jóvenes (18 - 29 años)	31	17.9%
Adultos (30 – 59 años)	57	33.0%
Adulto Mayor (60-+ años)	32	18.5%
Total	173	100%

*Nota: referencia de rango de edades en base a lo utilizado por el instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).*

-El rango de edad de los pacientes oscilo entre los 2 años y 88 años, siendo la media de edad 35 años. La población con mayor porcentaje fueron adultos comprendidos entre 30 a 59 años (33%).

#### **4.1.2. Resultados de cada marcador**

##### **4.1.2.1. Marcadores de inmadurez**

El CD45 estuvo expresado en todos de los pacientes, seguido del CD117, HLA-DR y CD34 expresándose en un 98.3%, 91.3% y 87.9% respectivamente. En el caso del TDT, siendo un arcador de inmadurez de linaje linfoide solo se pudo evaluar en 36/173 pacientes de los cuales el 27.8% presento la expresión de dicho marcador. Tabla N°7.

**Tabla N°7 Porcentajes de expresión de los marcadores de inmadurez**

<b>CATEGORÍA</b>	<b>MARCADORES DE INMADUREZ</b>				
	<b>HLA-DR</b>	<b>CD45</b>	<b>CD34</b>	<b>CD117</b>	<b>TDT</b>
<b>POSITIVO (CP)</b>	141 (81.5%)	167 (96.5%)	128 (74.0%)	140 (80.93%)	2 (5.6%)
<b>PARCIAL (CPP)</b>	17 (9.8%)	6 (3.5 %)	24 (13.9%)	30 (17.34%)	8 (22.2%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	15 (8.7%)	0 %	21 (12.1%)	3 (1.73%)	26 (72.2%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	0	0	0	0	137

<b>Casos analizables (CA)</b>	173	173	173	173	36
-------------------------------	-----	-----	-----	-----	----

#### 4.1.2.2. Marcadores mieloides

El marcador mieloides más expresado fue el CD 13 en un 96.5%, seguido de los marcadores CD33 (91.4%), MPO (91.3%), CD71 (80%) y CD15 (69%). Tabla N°8.

**Tabla N°8 Porcentajes de expresión de los marcadores mieloides**

CATEGORIA	MARCADORES MIELOIDES				
	CD13	CD15	CD33	MPO	CD71
<b>POSITIVO (CP)</b>	137 (79.2%)	39 (23%)	116 (67.1%)	109 (63%)	63 (42%)
<b>PARCIAL(CPP)</b>	30 (17.3%)	80 (46%)	42 (24.3%)	49 (28.3%)	57 (38%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	6 (3.5%)	54 (31%)	15 (8.7%)	15 (8.7%)	30 (20%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	0	0	0	0	23
<b>Casos analizables (CA)</b>	173	173	173	173	150

#### 4.1.2.3. Marcadores mielomonocíticos

EL CD64 se expresó en el 30.1% de pacientes; el CD11B y el CD14 se expresaron en un menor porcentaje 15.6% y 2.9 % respectivamente. Tabla N°9

**Tabla N°9 Porcentajes de expresión de los marcadores mielomonocíticos**

CATEGORIA	MARCADORES MIELOMONOCITICOS		
	CD11B	CD14	CD64
<b>POSITIVO (CP)</b>	7 (4%)	1 (0.6%)	18 (10.4 %)
<b>PARCIAL(CPP)</b>	20 (11.6%)	4 (2.3 %)	34 (19.7 %)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	146 (84.4%)	168 (97.1%)	121 (69.9%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE )</b>	0	0	0
<b>Casos analizables (CA)</b>	173	173	173

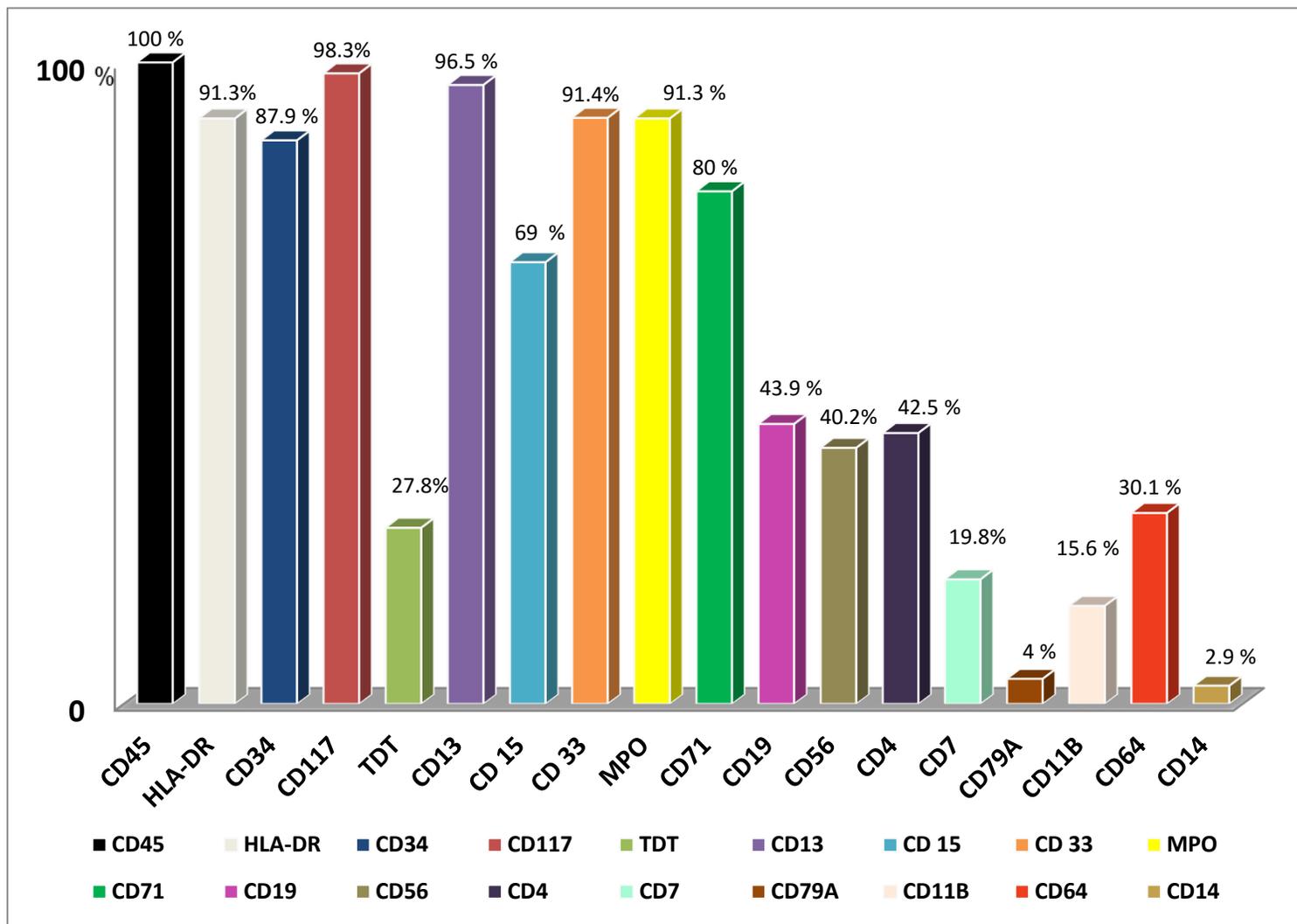
#### **4.1.2.4. Marcadores linfoides (antígenos aberrantes)**

129 (76.3%) pacientes presentaron al menos un marcador linfoide en sus resultados; el marcador linfoide más expresado fue el CD19 en un 43.9%, seguido del CD56 en el 40.2%; siendo estos coexpresados en 24 % pacientes. El CD7 se expresó en el 19.8%, mientras que marcadores como el CD79A se expresó en un 4 %. En el caso del CD4, solo se pudo evaluar en 87/173 de los cuales se expresó en el (37) 42.5%. Tabla N°10.

**Tabla N°10 Porcentajes de expresión de los marcadores linfoides**

CATEGORIA	MARCADORES LINFOIDES				
	CD19	CD56	CD7	CD79A	CD4
<b>POSITIVO (CP)</b>	27 (15.6%)	44 (26.8%)	11 (6.4%)	3 (1.7%)	13 (14.9%)
<b>PARCIAL(CPP)</b>	49 (28.3%)	22 (13.4%)	23 (13.4%)	4 (2.3%)	24 (27.6%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	97 (56.1%)	98 (59.8%)	138 (80.2%)	166 (96%)	50 (57.5%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE )</b>	0	9	1	0	86
<b>Casos analizables (CA)</b>	173	164	172	173	87

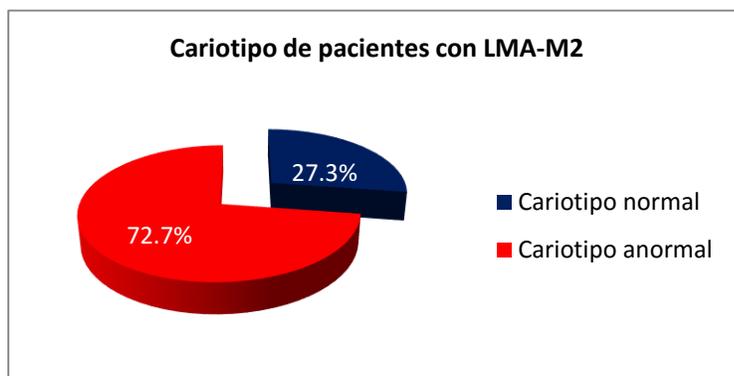
**Gráfico N°1: Porcentajes de expresión total de los marcadores inmunofenotipicos en LMA-M2**



**4.2. ESTUDIO CITOGENÉTICO DE PACIENTES CON LMA-M2**

De los 128 pacientes con estudio citogenético, presentaron cariotipo normal 35 (27.3 %) y anormal 93 (72.7%). Gráfico N°2.

**Gráfico N° 2: Distribución citogenética de pacientes con LMA-M2.**



#### 4.2.1. PACIENTES CON CARIOTIPO ANORMAL LMA-M2

Los hallazgos de los cariotipos anormales se muestran en la tabla N°11.

**Tabla N°11 Distribución de pacientes con cariotipo anormal**

Cariotipo Anormal			
	# pacientes	porcentaje	
con t(8;21) *	68	73.1%	53.13%
otras alteraciones cromosómicas diferente a t(8;21)	25	26.9%	19.53%
Total	93	100 %	128 (100%)

\*incluye variante

##### 4.2.1.1. PACIENTES CON t (8; 21):

Algunos de los casos con t(8;21) presentaron alteraciones cromosómicas secundarias tanto numéricas como estructurales. En la tabla N°12 se resume el porcentaje de alteraciones cromosómicas asociadas a t(8; 21).

**Tabla N° 12 Distribución de pacientes con t(8;21)**

<b>Pacientes con t(8;21)</b>			
		<b># pacientes</b>	<b>porcentaje</b>
<b>t(8;21) como anomalía única</b>		30	44.1%
<b>t(8;21) más alteraciones cromosómicas secundarias</b>	<b>t(8;21 más pérdida del cromosoma sexual</b>	26	38.2 %
	<b>t(8;21 más otras alteraciones secundarias</b>	12	17.7%
<b>Total</b>		68	100 %

La pérdida del cromosoma sexual es la alteración cromosómica secundaria más frecuente encontrada, representando el 26(38.2%) de todos los pacientes con t (8; 21). La proporción de sexos entre varones y mujeres con pérdida del cromosoma sexual fue de 1.6. Incluso algunos de estos pacientes presentaron adicionalmente delección del brazo largo del cromosoma 9, del (9) (q22), alteraciones como la t(1;10)(q25;p13), del (7)(q32) y la presencia de cromosomas marcadores. Tabla N°13.

**Tabla N°13 Pacientes con t(8;21) más pérdida del cromosoma sexual**

# pt.	<b>t(8;21) más pérdida del cromosoma sexual</b>
1	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)
3	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
10	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)
11	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
14	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) + mar
21	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del (9)(q22)
22	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
49	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
50	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)
52	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22) + mar
54	45,X,-X,t(1;10)(q25;p13),t(8;21)(q22;q22)
57	45,X,-X del (7)(q32), t(8;21)(q22;q22) ,9qh+
62	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
76	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
78	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
82	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
87	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
89	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22)
90	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del (9)(q22)
159	45,X,-Y ,t(8;21)(q22;q22)
161	45,X,-X,t(8;21)(q22;q22),del (9)(q22)
165	45,X,-Y ,t(8;21)(q22;q22)
168	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22), 16 qh+
170	45,X,-Y ,t(8;21)(q22;q22)
173	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
187	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22),del (9)(q22)

12 pacientes presentaron otras alteraciones cromosómicas secundarias junto a la t(8;21) tales como la presencia de cromosomas marcadores , alteraciones numéricas y estructurales. La alteración cromosómica secundaria más resaltante es la delección del brazo largo del cromosoma 9, del (9)(q22) ,en 4 pacientes seguido de la add (4)(q) en 2 pacientes y la del(7)(q22) en 1 paciente ; también se encontraron alteraciones complejas como se describe en la tabla N°14.

**Tabla N°14 pacientes con t(8;21) más otras alteraciones**

# pt.	t(8;21) más otras alteraciones cromosómicas
6	46,XY,-6,t(8;21),+19
8	45,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)
9	46,XX, add (4)(q) ,t(8;21)(8;21)(q22;q22)
24	45,XY,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)
27	47,XY, t(8;21)(q22;q22)+ mar
60	46,XYqh+,1qh+,der(21)del(21)(q22) t(8;21)(q22;q22)
65	46,XY qh+,del(7)(q22), t(8;21)(q22;q22)
79	46,XX, t(8;21)(q22;q22),add(4)(q31)
84	47,XX,dup(1)(q22q41),+4,t(8;21)(q22;q22)
157	45,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)
181	47,XY,+ B t(8;21)(q22;q22)
182	45,XX,t(8;21)(q22;q22),del(9)(q22)

**4.2.1.2. PACIENTES CON ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DIFERENTES A LA t (8; 21)**

25 (26.9%) de todos los pacientes con cariotipo anormal presentaron alteraciones cromosómicas numéricas, estructurales y con dos o más alteraciones diferentes a la t (8; 21). En la tabla N° 15 se describe el porcentaje de las alteraciones encontradas.

**Tabla N°15 Otras alteraciones diferente t(8;21)**

Otras alteraciones diferente a t( 8;21)		
	# Pacientes	porcentaje
alteraciones numéricas	8	8.6%
alteraciones estructurales	8	8.6%
dos o más alteraciones	9	9.7%
TOTAL	25	26.9%

El 8.6 % de los pacientes con cariotipo anormal presentaron alteraciones numéricas como trisomías de los cromosomas 6, 8, 11 y la presencia de cromosomas marcadores. Hubo un caso de un paciente que presentó la pérdida del cromosoma Y en su cariotipo, pero que molecularmente presentó el gen de fusión AML-ETO positivo, de igual forma en uno de los pacientes con presencia de un cromosoma marcador como se muestra en la tabla °16.

**Tabla N° 16 ALTERACIONES NUMÉRICAS**

# pt.	ALTERACIONES NUMÉRICAS
18	<b>46,XX, +8</b>
20	<b>46,XY, +6</b>
45	<b>47,XX,+11</b>
63	<b>47,XX, +8</b>
61	<b>47,XX,+ MAR *</b>
70	<b>47,XX, + MAR</b>
74	<b>45,X,-Y*</b>
184	<b>46,XY, +6</b>

\* Pacientes que molecularmente presentan el gen de fusión AML-ETO positivo.

El 8.6 % de los pacientes con cariotipo anormal presentaron alteraciones estructurales como translocaciones, deleciones y adiciones, estas se muestran en la tabla N°17.

**Tabla N° 17 ALTERACIONES ESTRUCTURALES**

# pt.	ALTERACIONES ESTRUCTURALES
12	46,XX, t(7;11)(p15;p15)
64	46,XY,del(22)(q11.2)
66	46,XY,del(7)(q22)
68	* 46,XX,t(7;11)(p21;p15)
75	46,XX,del(9)(q31)
77	46,XX,add(2)(q)
86	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
183	46,XX,t(8;12)(q22;q24)

\*Presento mutación FLT3 ITD

El 9.7% de los pacientes con cariotipo anormal presentaron dos o más alteraciones, en donde se presentaron cariotipos complejos en la mayoría de los pacientes (7/9) como se muestra en la tabla N° 18.

**Tabla N° 18 DOS O MÁS ALTERACIONES**

# pt.	DOS O MÁS ALTERACIONES
19	del(1)(q32)+ mar1 + mar2
51	45,X,del(x)(q22),-4,-5,add(7)(p22),add(7)(q36),-11,-12,-17,+mar,+mar2,+mar3,+mar4
56	46,XX,-20,+mar
67	45,-X,-Y,-10,del(11)(p14)+mar1,+mar2
81	47,XX,der(3)del(3)(q21)add(3)(q21),-6,del(9)(p13)add(17)(p11.2)t(1;19)(p13.3.q31),-20,+mar1,+mar2,mar3 )cp20
167	46 ,X,- Y, add (5)(q35),del(11)(q14),+15
185	44- 48 XY,+8,+11
186	47,XX,+8,i(17)(p10)
188	46, XX, -3,-5, + MAR 1, +MAR 2

#### **4.3. FRECUENCIA DEL ESTUDIO INMUNOFETIPICO Y CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES CON t (8; 21)**

Los pacientes que cumplieron ambos criterios tanto para el estudio citogenético e inmunofenotípico fueron 110. Se evaluaron dos grupos de pacientes, aquellos que presentan la t (8; 21) y sin t (8; 21).

### 4.3.1. PACIENTES CON t (8; 21):

Los 68 pacientes que presentaron la t (8; 21), solo entraron en el estudio 62 pacientes ya que los restantes correspondían a pacientes con un resultado no informativo en el examen de inmunofenotipo.

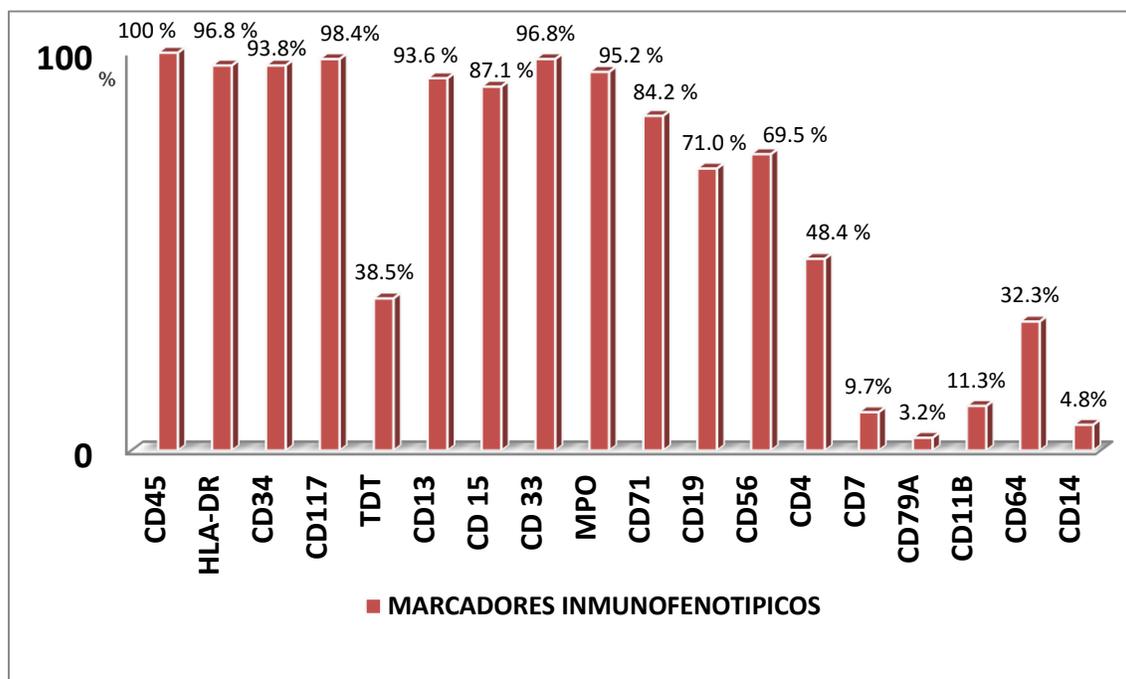
En la tabla N°19 se resumen los porcentajes expresados de los marcadores en los pacientes con t (8; 21).

**Tabla N° 19 Frecuencia de los marcadores inmunofenotipicos en pacientes con t (8; 21)**

	CD 45	HLA -DR	CD 34	CD 117	CD 71	CD 13	CD 15	CD 33	MPO
	CD 64	CD 11B	CD 14	CD 19	CD 56	CD 4	CD 7	TDT	CD 79a
<b>POSITIVO (CP)</b>	60 (96.8%)	59 (95.2%)	54 (84.1%)	54 (87.1%)	31 (54.4%)	51 (82.3%)	22 (35.5%)	44 (71.0%)	47 (75.8%)
<b>POSITIVO (CP)</b>	9 (14.5%)	3 (4.8%)	1 (1.6%)	15 (24.2%)	28 (47.5%)	4 (12.9%)	1 (1.6%)	2 (15.4%)	1 (1.6%)
<b>PARCIAL (CPP)</b>	2 (3.2%)	1 (1.6%)	6 (9.7%)	7 (11.3%)	17 (29.8%)	7 (11.3%)	32 (51.6%)	16 (25.8%)	12 (19.4%)
<b>PARCIAL (CPP)</b>	11 (17.7%)	4 (6.5%)	2 (3.2%)	29 (46.8%)	13 (22.0%)	1 (3.5%)	5 (8.1%)	3 (23.1%)	1 (1.6%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	0	2 (3.2%)	2 (3.2%)	1 (1.6%)	9 (15.8%)	4 (6.5%)	8 (12.9%)	2 (3.2%)	3 (4.8%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	42 (67.7%)	55 (88.7%)	59 (95.2%)	18 (29.0%)	18 (30.5%)	16 (51.6%)	56 (90.3%)	8 (61.5%)	60 (96.8%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	0	0	0	0	5	0	0	0	0
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	62	62	62	62	57	62	62	49	62
<b>Casos analizables (CA)</b>	62	62	62	62	59	31	62	13	62

El marcador CD117 fue el más frecuente, ya que se expresó en un 98.4 % de pacientes con t (8; 21). Entre los marcadores mieloides, el más expresado fue el CD33 en un 96.8%, mientras que los marcadores linfoides CD19 y CD 56 fueron los más frecuentes encontrados en 71.0% y 69.5 % respectivamente. Los porcentajes totales se grafican en la tabla N° 20.

**Tabla N°20 Porcentajes de expresión total de los marcadores en los pacientes con t(8;21)**



**4.3.2. PACIENTES SIN t (8; 21):**

48 pacientes fueron analizados, 28 pacientes con cariotipo normal y 20 con otras alteraciones diferente a la t(8;21). En la tabla N° 21 se describen los porcentajes de los marcadores expresados en los pacientes sin t (8; 21).

**Tabla N° 21 Frecuencia de los marcadores inmunofenotipicos en pacientes sin t (8; 21)**

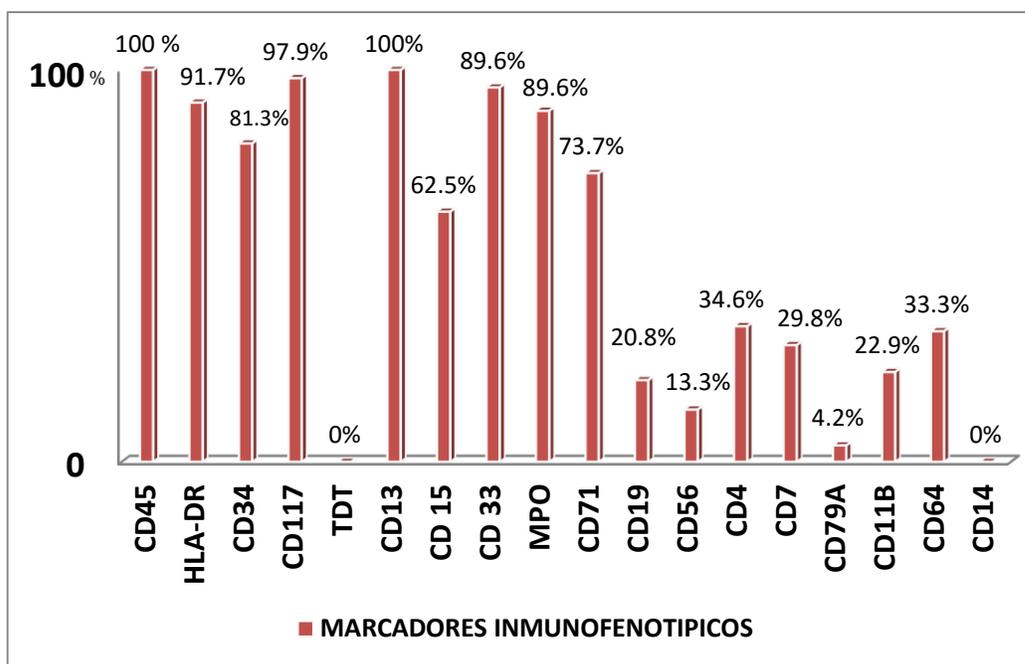
CD	HLA-DR	CD 34	CD 117	CD 71	CD 13	CD 15	CD 33	MPO
----	--------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-----

	<b>45</b>								
<b>POSITIVO (CP)</b>	48 (100%)	39 (81.3%)	31 (64.6%)	41 (85.4%)	12 (31.6%)	39 (81.3%)	11 (22.9%)	34 (70.8%)	27 (56.3%)
<b>PARCIAL (CPP)</b>	0 (0%)	5 (10.4%)	8 (16.7%)	6 (12.5%)	16 (42.1%)	9 (18.8%)	19 (39.6%)	9 (18.8%)	16 (33.3%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	0	4 (8.3%)	9 (18.8%)	1 (2.1%)	10 (26.3%)	0 (0%)	18 (37.5%)	5 (10.4%)	5 (10.4%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	0	0	0	0	10	0	0	0	0
<b>Casos analizables (CA)</b>	48	48	48	48	38	48	48	48	48

	<b>CD 64</b>	<b>CD 11B</b>	<b>CD 14</b>	<b>CD 19</b>	<b>CD 56</b>	<b>CD 4</b>	<b>CD 7</b>	<b>TDT</b>	<b>CD 79a</b>
<b>POSITIVO (CP)</b>	5 (10.4%)	2 (4.2%)	0 (0%)	4 (8.3%)	3 (6.7%)	5 (19.2%)	4 (8.5%)	0 (0%)	1 (2.1%)
<b>PARCIAL (CPP)</b>	11 (22.9%)	9 (18.8%)	0 (0%)	6 (12.5%)	3 (6.7%)	4 (15.4%)	10 (21.3%)	0 (0%)	1 (2.1%)
<b>NEGATIVO (CN)</b>	32 (66.7%)	37 (77.1%)	48 (100%)	38 (79.2%)	39 (86.7%)	17 (65.4%)	33 (70.2%)	11 (100%)	46 (95.8%)
<b>CASOS NO ESPECIFICOS (CNE)</b>	0	0	0	0	3	22	1	37	0
<b>Casos analizables (CA)</b>	48	48	48	48	45	26	47	11	48

El CD117 se mantuvo como marcador de inmadurez más expresado con el 97.9%. En el caso de los marcadores mieloides el CD13 y CD33 se expresaron en el 100% y 89.6% respectivamente, mientras que el CD15 bajo a un 62.5 % su expresión. No hubo pacientes que presentaron TDT ni CD14, por otro lado el CD7 se expresó en 29.8 % siendo uno de los marcadores linfoides más frecuentes. El CD19 y el CD56 presentaron una menor expresión de 20.8 % y 13.3% respectivamente. Los porcentajes totales se grafican en la tabla N° 22.

**Tabla N°22 Porcentajes de expresión total de los marcadores en los pacientes sin t(8;21)**



## **CAPITULO V DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. DISCUSIÓN**

#### **5.1.1. ESTUDIO INMUNOFETIPICO DE PACIENTES CON LMA-M2**

En los pacientes con LMA se requiere un conjunto de herramientas importantes para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes, de allí la importancia de complementar la información morfológica, citogenética e inmunofenotípica. La expresión de antígenos de superficie brinda información para la clasificación de pacientes con LMA. En el presente estudio se evaluaron 173 pacientes con diagnóstico de LMA-M2 de novo cuyos resultados mostraron una alta frecuencia de marcadores de inmadurez siendo el CD117 el más frecuente (98.3%), seguido del HLA-DR (91.3%) y el CD34 (87.9%), estos valores se asemejan a los resultados obtenidos por Ghosh et al. (2003), Tong et al. (2009) y Osman et al. (2015). El CD45 se expresó en el 100% de los pacientes, un estudio resalta la evaluación de este marcador ya que al evidenciar una expresión heterogénea que se distingue de otros linajes celulares permite identificar las células blásticas y así poder dar información sobre el linaje y estadio de maduración de estas células (Marsán et al., 2015).

Los marcadores mieloides comúnmente expresados fueron el CD13 (96.5%), CD33 (91.4%), MPO (91.3%), CD71 (80%) y CD15 (69%) similar a los encontrados por otros estudios (Khalidi et al. ,1998; Zheng et al., 2008). Con respecto al marcador MPO, algunos de los casos negativos por citometría de flujo resultaron ser positivos o débil positivo por citoquímica, esto debido probablemente a interferencias por la calidad de la muestra (bajo porcentajes de células) (Marsán et al., 2015).

CD13 fue el marcador mieloides más expresado (96.5%); lo que difiere con los estudios de Salem y Abd El-Aziz (2012) y Khalidi et al. (1998) donde el CD33 fue el más frecuente en todos los subtipos FAB. Se ha evaluado la correlación del CD13 con el pronóstico en las LMA, siendo aún controversial su valor pronostico, ya que según Reep et al. (2003) la ausencia de expresión de este marcador se relaciona con un buen pronóstico, por otro lado Dubosc-

Marchenay et al. (1992) considera su presencia con buen pronóstico. En el caso del CD33 fue el segundo marcador mielóide más expresado (91.4%), la frecuencia con la que se presenta este marcador en este tipo de LMA ha sido motivo para desarrollar tratamientos diana que mostrarían una alta tasa de inducción de remisión (Sieverst, 2004).

Los marcadores monocíticos como el CD11B según la FAB y OMS se encuentra expresada frecuentemente como positivo o débil positivo en los pacientes con LMA-M2 (Swerdlow et al., 2008; Ortuño y Orfao, 2002). En esta investigación el 15.6% de los pacientes con LMA-M2 expresaron este marcador y su expresión fue parcial en la mayoría de los casos. La expresión de este marcador ha sido estudiado también como marcador pronóstico en las LMA, el estudio de Junca (2014), el CD11B se expresó en los pacientes con grupo de riesgo citogenéticos intermedios y desfavorables lo que llevaría a relacionarlo con un pronóstico pobre, Xu et al. (2015), confirmaría lo anterior escrito ya que en su investigación de meta análisis encontró que la positividad de este marcador podría predecir un mal pronóstico en los pacientes con esta enfermedad.

Los otros marcadores del linaje monocítico como CD64 y CD14 según la OMS generalmente están ausentes (Swerdlow et al., 2008). Sin embargo se encontraron en el 30.1% y 2.9 % respectivamente, con una expresión parcial en la mayoría de los casos. CD64 se ha relacionado su expresión a un buen pronóstico en pacientes con LMA (Reep et al., 2003), mientras que la expresión del CD14 se asoció a tasas supervivencia global significativamente más corta en pacientes con LMA procedentes de SMD (Choi et al., 2013).

La frecuencia de la expresión de fenotipos aberrantes de uno o más marcadores de linaje linfóide fue 76.3%, mayor a los estudios reportados anteriormente en LMA, 47.9 % (Tong et al. 2009), 48.1% (Khalidi et al., 1998), 56,5% (Jiang et al., 2010); pero similar al estudio de 67,5% (Abdulateef, Ismail y Aljedani, 2014). El antígeno linfóide más frecuente fue el CD19 (43.9%), semejante a lo reportado por (Osman, 2015 y Wang et al., 2005), seguido por el CD56 en el 40.2%; siendo ambos marcadores coexpresados en 24%. El marcador CD56 se ha relacionado con pronóstico desfavorable (Guo et al., 2015) y es significativo para el estudio de la supervivencia libre de enfermedad por lo que se ha relacionado como un factor de riesgo independiente (Djunic et al., 2012).

Por otro lado el CD4, CD7, CD79A y TDT se expresaron en 42.5%, 19.8%, 4 % y 27.8% respectivamente, la expresión del CD4 es mayor a lo referido por la OMS (10%), hay que tener en cuenta que este marcador se evaluó solo en 87/173 pacientes, de igual forma el antígeno TDT 36/173 (Swerdlow et al., 2008).

### 5.1.2. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES CON LMA-M2

Entre los pacientes con LMA se detectan alteraciones cromosómicas en un 55- 75% en el momento de diagnóstico y es un factor importante en el pronóstico del paciente (Silva et al., 2006) en este caso se halló 72.7% de los 128 pacientes analizados, siendo mayor a los encontrados en estudios anteriores en los distintos subtipos de LMA (Tong et al., 2009).

La t(8;21) es una de las alteraciones cromosómicas más comúnmente halladas en pacientes con LMA (15%), específicamente subtipo M2, (40%) (Rueda et al., 2004) en esta investigación se halló en 53.1% de los pacientes con LMA-M2 y representa el 73.1% de todos los pacientes con cariotipo anormal en este subtipo de LMA.

Se evidencian la presencia de alteraciones secundarias junto con la t (8;21) en 55.9%, otros estudios muestran una frecuencia de 62,5% (Lai YY et al., 2005). La pérdida del cromosoma sexual es la alteración secundaria más común 38.2% seguida de la del(9), lo que concuerda con estudios como el de Lin et al. (2008), sin embargo este autor muestra la trisomía 8 en un 7%, alteración que no se encontró en nuestro estudio junto a la t (8;21) pero si como anomalía única . Ver Tabla N° 16.

Las alteraciones secundarias en los pacientes con t(8:21) afectarían el pronóstico de estos pacientes; según Schoch et al. (1996) encontró que la del9 fue un factor pronostico desfavorable mientras que la pérdida del cromosoma sexual no afecto en el pronóstico , sin embargo Peniket et al.(2005) encontró en una mayor población estudiada que los pacientes con del(9) junto a la t(8;21) obtuvieron una mayor supervivencia . Estudios más recientes como los de Jia et al. (2015) demostraron que la pérdida del cromosoma sexual se relacionó a un pronóstico favorable en niños con LMA-M2 mientras que Lin et al. (2008) demostró que estas alteraciones no tendrían impacto en la supervivencia de los pacientes. Por otro lado alteraciones en el cromosoma 7 asociados a la t(8;21) han sido estudiados por Brozek et al. (2003) en donde los pacientes con esta alteración mostraron una peor respuesta a la terapia de inducción. Estas diferencias se deben probablemente a diversos factores como las características de propias de cada población analizada por lo que el efecto de dichas alteraciones son todavía cuestionadas.

Las translocaciones variantes se presentan alrededor de 3% a 4% en pacientes con LMA con t (8; 21). En esta investigación encontramos un paciente con la variante t(1;8;21)(q44;q22;q22.3) ,reportado en otros estudios (Taguchi et al.,1986). Según Huang et al.(2006), estas variantes se relacionarían a un pronóstico favorable ,sin embargo Vundinti et al. (2008) en su estudio encontró que si la variante involucraba al cromosoma X estos cursaban con mal pronóstico.

Otro grupo importante de pacientes con LMA –M2 son los que presentan cariotipo normal; estos actualmente son clasificados con riesgo intermedio (Shipley y Butera, 2009). Se han descrito alteraciones a nivel genético no detectadas por citogenética convencional por lo que los estudios moleculares son importantes para identificar y evaluar factores pronósticos independientes .Mutaciones en los genes CEBPA y FTL3-ITD están relacionados a un buen y mal pronóstico respectivamente (Bienz et al., 2005). En nuestros pacientes el 27.3 % presento cariotipo normal lo que sugeriría estudios moleculares necesarios para la correcta estratificación de riesgo y elección del tratamiento.

Se han reportado otras alteraciones cromosómicas diferente a la t(8;21) que en el estudio corresponden a un 26.9%. Si bien las translocaciones son frecuentes en los pacientes con LMA, también se ha reportado varias alteraciones cromosómicas como deleciones en los cromosomas 5 y 7 , trisomías ( cromosoma 8) y la presencia de dos o más alteraciones (cariotipos complejos)( Kumar,2011). Las alteraciones numéricas se encontraron en el 8.6% y la alteraciones más frecuentes fueron las trisomías del cromosoma 8 y 6. Los cromosomas marcadores también estuvieron presentes y uno de los casos se relacionó a la presencia del gen de fusión AML- ETO.

Las alteraciones cromosómicas estructurales se presentaron en el 8.6 %, donde se encontró translocaciones, deleciones de los cromosomas 7,9 y 22 y adición del cromosoma 2. Una de las translocaciones encontradas fue la t (7;11) (p15;p15), que resulta la fusión de los genes *NUP98* y *HOXA9*, descrito en pacientes con LMA-M2 pero también en la leucemia mieloide crónica (crisis blásticas) y en síndrome mielodisplásico. Los pacientes suelen ser jóvenes y de sexo femenino con un pronóstico desfavorable y están asociados con mutaciones *KRAS* , *WT1* y *FLT3 / ITD* (Chou et al. , 2009). En nuestro estudio de manera similar dos pacientes fueron mujeres de 35 y 58 años ,la paciente mayor falleció a los 6 meses del diagnóstico mientras que la otra presentó mutación FLT3 ITD.

Se ha descrito un grupo de pacientes con *BCR-ABL* en LMA, clasificados en la última revisión 2016 de la OMS como una entidad provisional. Lo complicado de este subgrupo de pacientes es poder hacer el diagnóstico diferencial entre LMC en crisis blásticas y LMA de novo (Neuendorff et al. ,2016). En la investigación un paciente presento la t (9; 22)(q34;q11), los estudios de citometría de flujo mostraron la expresión de antígenos linfoides CD 22 , CD19 y

CD79a. El paciente estuvo cuatro días en evaluación, no se obtuvo mayor información sobre su evolución. Otra translocación encontrada fue la t(8;12)(q22;q24), que según el estudio de Saitoh et al. (1997) existe algún tipo de enmascaramiento de la t(8;12;21)(q22.1;q24.1;q22.1), que por el estudio citogenético convencional se observa como t(8;12) y al hacer el estudio de Southern blot e hibridación fluorescente in situ (FISH) se observa toda la alteración.

La presencia de dos o más alteraciones (cariotipo complejo) están descritos en alrededor del 10-12% de las LMA, su incidencia aumenta con la edad y está relacionado a un mal pronóstico (Mrózek, 2008). En el estudio representó el 9.68% y las alteraciones complejas halladas presentaban diferentes aberraciones cromosómicas (cromosomas marcadores, deleciones, monosomía, adiciones, cromosomas derivados, trisomías e isocromosomas) similar a las descritas en la literatura.

### **5.1.3. FRECUENCIA DEL ESTUDIO INMUNOFETÍPICO Y CITOGENÉTICO DE PACIENTES CON LMA- M2**

Estudios han demostrado la correlación de algunos marcadores inmunofenotípicos con anomalías citogenéticas y también el papel que desempeñan en cuanto al pronóstico del paciente. En nuestro estudio se comparó dos poblaciones, aquellos que presentaron la t(8;21) y sin t(8;21).

Los pacientes con t(8;21) presentaron mayor expresión de los marcadores de inmadurez HLA-DR (91.7 vs 96.8%), CD34 (81.3 vs 93.8%), CD117 (97.9 vs 98.4%) y TDT (0 vs 38.5%) en comparación con los pacientes sin t(8;21), esto es similar a los resultados obtenidos por, Andrieu et al. (1996), Nishii et al. (2003) y Khoury et al. (2003). La expresión de los marcadores mieloides en los pacientes con t(8;21) como el CD13, CD15, MPO, CD71 y CD33 fueron los más frecuentes, siendo este último el más comúnmente expresado (96.8%). El CD13 fue el único marcador mielóide que disminuyó su expresión (100% vs 93.6%) en comparación a los pacientes sin t(8;21). La mayoría de los casos de las expresiones de estos marcadores fue positivo, muy poco la expresión parcial lo que difiere con los estudios de Khoury et al. (2003), donde el CD13 y CD33 tenían una expresión débil en estos pacientes de igual forma reportada por la OMS (Swerdlow et al., 2008).

En el caso de la expresión de antígenos mielomonocíticos junto a la t(8;21), se observó que el CD11B disminuyó su expresión (22.9% a 11.3%), mientras que el CD64 mantuvo similar porcentaje (32.3% vs 33.3%) y el CD14 fue mayor en este subgrupo de pacientes (0% vs 4.8%); si bien se relaciona con la alteración los porcentajes de expresión es poco frecuente semejante a lo reportado por Iriyama et al. (2012).

La mayor diferencia se muestra en la expresión de los marcadores aberrantes de origen linfóide. Los pacientes con t(8;21) estudiados expresaron mayor frecuencia de estos marcadores en comparación con los pacientes sin t(8;21), siendo el CD19 y CD56 los marcadores linfoides más frecuentes que se expresaron en 71% y 69.5% respectivamente bajando su expresión en

20.8% y 13.3 %. Los hallazgos se asemejan a lo encontrado por estudios previos (Zheng et al., 2008; Tong et al., 2009).

La expresión de CD7 y CD79a en los pacientes con t(8;1) fueron menores, similar a lo encontrado por Zheng et al. (2008), aunque en su estudio no encontró ningún paciente con CD7 y la presencia de la t(8;21).

## **5.2 CONCLUSIONES**

**Con respecto a las características inmunofenóticas encontradas se puede concluir que :**

1. Los pacientes con LMA-M2 presentan características inmunofenotípicas como la expresión de marcadores de inmadurez CD117 (98.3 %), HLA-DR (91.3%) y CD34 (87.9%). En el caso de los marcadores mieloides, el CD13 fue el más comúnmente expresado 96.5%, seguido de los marcadores CD33 (91.4%), MPO (91.3%), CD71 (80%) y CD15 (69%) mientras que los marcadores mielomonocíticos como el CD64, CD11B y CD14 se expresaron con menor frecuencia y de manera parcial en la mayoría de los casos positivos en el 30.1%, 15.6% y 2.9% respectivamente.
2. En los pacientes con LMA-M2 es frecuente la presencia de marcadores inmunofenotípicos de origen linfóide. La presencia de al menos un marcador de origen linfóide fue de 76.3%, siendo el más expresado el CD19 en un 43.9%, seguido del CD56 en el 40.2%; siendo estos coexpresados en 24%.

**Con respecto a las características citogenéticas encontradas se puede concluir que :**

3. La presencia de alteraciones cromosómicas en pacientes con LMA-M2 fue de 72.7%, siendo la alteración cromosómica más frecuente la t(8; 21), encontrada en 53.1% del total de pacientes analizados.

4. Los pacientes con t(8;21) expresaron en la mayoría de los casos alteraciones cromosómicas secundarias (55.9%). La pérdida del cromosoma sexual (38.2%) es la alteración cromosómica secundaria más frecuente.
  
5. Entre las alteraciones cromosómicas encontradas en LMA-M2 se puede observar la presencia de alteraciones numéricas (trisomías) así como otras alteraciones estructurales (deleciones, translocaciones y adiciones) y cariotipos complejos en alrededor del 26.9%.

**Con respecto a la frecuencia de marcadores inmunofenotípicos con la t(8;21) se puede concluir que :**

6. Los pacientes con t(8;21) presentan mayor expresión de marcadores de inmadurez como HLA-DR, CD34, CD117 en comparación con los pacientes sin t(8;21). Los marcadores mieloides se expresan muy comúnmente, siendo el CD33 el más frecuente (96.8%), mientras que el CD13 se observó una ligera disminución de expresión y el CD15 aumentó su expresión en estos pacientes. Los marcadores mielomonocíticos como CD11B, CD14 y CD64 son poco frecuentes expresándose en alrededor del 22.9 %, 4.8% y 33.3% respectivamente, registrándose una mayor frecuencia de CD14 y CD64.
  
7. Los pacientes con t (8; 21) presentan mayor expresión de antígenos aberrantes de origen linfoide como el CD19 y CD56, que son los marcadores más frecuentes observados en el 71% y 69.5% respectivamente. Su expresión en pacientes sin t (8; 21) fue de 20.8% y 13.3 %. Por otro lado el marcador CD7 fue el marcador linfoide que disminuyó su expresión en este subgrupo de pacientes.
  
8. Marcadores como el CD4, TDT y CD79a son muy poco evaluados en los pacientes con LMA-M2. En la investigación todos los casos con TDT positivos se relacionaron a la

presencia de t(8;21), mientras que los otros marcadores su expresión es similar en ambos grupos.

### 5.3 RECOMENDACIONES

1. La presente investigación reafirma la importancia de realizar el estudio inmunofenotipo y citogenético en los pacientes con LMA-M2, ya que ayudan a precisar el diagnóstico y establecer con mejor criterio el significado pronóstico de estos pacientes.
2. El uso de paneles estandarizados que incluyan los marcadores inmunofenotípicos más característicos relacionados con esta leucemia es clave para una mejor clasificación de este subgrupo de pacientes.
3. Se recomienda incluir en el estudio inmunofenotípico la detección de marcadores de origen linfocítico CD19 y CD56 por su alta relación con la presencia de la t(8;21).
4. Debido a la alta relación de marcadores inmunofenotípicos y hallazgos citogenéticos es recomendable realizar estudios de correlación que permitan predecir mejor la evolución y significado pronóstico de estos pacientes con LMA-M2.
5. En los casos en los que no se pueda realizar el análisis cromosómico se recomienda utilizar técnicas de citogenética molecular (FISH) para la detección de los genes de fusión *RUNX1 / RUNX1T1*.
6. En el subgrupo de pacientes con LMA-M2 con cariotipo normal se deben realizar estudios moleculares para detectar mutaciones de genes asociados con esta leucemia.

## CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdulateef NA, Ismail MM, Aljedani H. (2014). Clinical significance of co-expression of aberrant antigens in acute leukemia: a retrospective cohort study in Makah Al Mukaramah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(1):221-7.
2. Andrieu, V., Radford-Weiss, I., Troussard, X., Chane, C., Valensi, F., Guesnu, M., et al. (1996). Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *British Journal of Haematology*, 92(4) 855–865.
3. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-2405. Consultado en: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544> el 2 de septiembre, 2016.
4. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. (2005). Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*, 11(4):1416-24.

5. Brozek I., Babinska M., Kardas I., Wozniak A., Balcerska A., Hellmann A., Limon J. (2003). Cytogenetic analysis and clinical significance of chromosome 7 aberrations in acute leukaemia. *J. Appl. Genet*, 44:401–412.
6. Chauffaille, María de Lourdes L. F., Borri, Daniela, & Martins, Sergio L. R. (2004). Leucemia mielóide aguda t(8;21): frequência em pacientes brasileiros. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 26(2), 99-103. Consultado en: <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842004000200006> el 4 de septiembre, 2016.
7. Choi, J., Song, J., Kim, S. J., Choi, J. R., Kim, S. J., Min, Y. H., Kim, M. J. (2010). Prognostic significance of trisomy 6 in an adult acute myeloid leukemia with t(8;21). *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 202, 141–143.
8. Choi Y., Lee JH., Kim SD., Lee JH, Seol M, Kang YA et al. (2013). Prognostic implications of CD14 positivity in acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*, 97: pp. 246-255.
9. Chou, WC., Chen, CY., Hou, HA., Lin, LI., Tang, JL., Yao, M. *et al.* (2009) Acute myeloid leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients. *Leukemia*, 23: 1303–1310.

10. Deschler, B. & Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*, 107: 2099–2107.
11. De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.” *Blood Cancer Journal*, 6(7), e441.
12. Di Bona, E., Sartori, R., Zambello, R., Guercini, N., Madeo, D., & Rodeghiero, F. (2002). Prognostic significance of CD56 antigen expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 87(3), 250-6.
13. Djunic, I., Virijevec, M., Djurasinovic, V., Novkovic, A., Colovic, N., Kraguljac-Kurtovic, N., et al. (2012). Prognostic significance of CD56 antigen expression in patients with acute myeloid leukemia. *Medicina. Oncol*, 29, 2077 - 2082.
14. Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453-474.
15. Doulatov S, Notta F, Laurenti E & Dick JE. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2):120–36.

16. Dubosc-Marchenay, N., Lacombe, F., Dumain, P., Marit, G., Montastruc, M., Belloc, F. and Reiffers, J. (1992), Role of blast cell immunophenotyping for the diagnosis and prognosis of acute myeloid leukemia. *Hematol. Oncol.*, 10: 235–249. doi:10.1002/hon.2900100502
17. Espínola Cano, A.F., Rodríguez, M.S., Campos, S., Ferreira Nizza, J.A., Noguera, J., & Figueredo Thiel, S.J. (2011). Leucemia mieloide aguda con t(8;21)(q22; q22). Reporte de casos. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 9(2), 64-71.
18. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M, Forman D., & Bray, F.(2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Consultado en: <http://globocan.iarc.fr> el 2 septiembre del 2016.
19. Ghosh S, Shinde SC, Kumaran GS, Sapre RS, Dhond SR, Badrinath Y, Ansari R, Kumar A, Mahadik S, Chougule AB, Nair CN(2003). Haematologic and immunophenotypic profile of acute myeloid leukemia: an experience of Tata Memorial Hospital. *Ind J Cancer*. 40(2):71–76.
20. Granada Perea, D. (2011). Factores Pronósticos en Leucemia Mieloide Aguda: Utilidad de los estudios inmunofenotipicos y moleculares (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina, Barcelona. Consultado en: <http://hdl.handle.net/10803/51435> el 10 de Septiembre 2016.
21. Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A. H. et al. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of

prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 116(3), 354-365.

22. Gritsaev,S.V. , Martynkevich,E.S. , Ziuzgin,E.S. , Kariagina,E.V. , Martynenko,L.S. , Petrova E.V., et al. (2014).Heterogeneity of acute myeloid leukemia with the translocation t(8;21)(q22;q22). *Ter Arkh*, 86 (7).45-52.
23. Guo R, Shen AL, Wang Y, Liu L, Zhang JF, et al.(2015). Immunophenotypic Analysis of Patients with CD56<sup>+</sup> Acute Myeloid Leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 23(5):1231-4.
24. Hartmann, L., Dutta, S., Opatz, S., Vosberg, S., Reiter,K.,Leubolt,L., et al.(2015). ZBTB7A mutations in acute myeloid leukaemia with t(8;21) translocation. *Nature Communications*, 7(11733).
25. Hoyos M. (2014).Impacto de las alteraciones moleculares en el pronóstico de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) "de Novo" (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona. Departamento de Genética. Consultado en: <http://hdl.handle.net/10803/286363> el 25 de febrero del 2017.
26. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Obispo K, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, Instituto Nacional del Cáncer. Bethesda,

MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/) , basado en el envío de datos de SEER de noviembre de 2016, publicado en el sitio web de SEER, abril de 2017.

27. Huang L1, Abruzzo LV, Valbuena JR, Medeiros LJ, Lin P (2006). Acute myeloid leukemia associated with variant t(8;21) detected by conventional cytogenetic and molecular studies: a report of four cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*,125(2):267-72.
  
28. Ibáñez, M. (2013). Caracterización Molecular de las Leucemias Mieloides Agudas de novo (tesis doctoral).Universidad de Valencia,Facultad de Biología,cValencia.Consultado en: <http://hdl.handle.net/10550/29949> el 8 septiembre del 2016.
  
29. Illmer, Thomas, Schaich, Markus , Ehninger , Gerhard. & Thiede Christian (2007). Tyrosine kinase mutations of JAK2 are rare events in AML but influence prognosis of patients with CBF leukemias. *Haematologica*, 92 (1):137-138.
  
30. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (2016) .Datos epidemiológicos, estadística. Consultado en: [http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/estadistica/datos\\_estadisticos/02062016\\_DATOS\\_EPIDEMIOLOGICOS%20INEN\(2000-2014\).pdf](http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/estadistica/datos_estadisticos/02062016_DATOS_EPIDEMIOLOGICOS%20INEN(2000-2014).pdf) el 1 de septiembre del 2016.

31. Iriyama, N., Hatta, Y., Takeuchi, J., Ogawa, Y., Ohtake, S., Sakura, T., et al. (2012). Expression of CD56 Is an Independent Prognostic Factor to Predict Relapse in Acute Myeloid Leukemia with t(8;21): Results of Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML 97 Protocol. *Blood*, 120(21), 2511. Accessed August 16, 2017. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/120/21/2511>
32. Iwanaga, E., Nanri, T., Matsuno, N., Kawakita, T., Mitsuya, H., & Asou, N. (2009). A JAK2-V617F activating mutation in addition to KIT and FLT3 mutations is associated with clinical outcome in patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 94(3), 433–435.
33. Jia YP.,Zuo, YX.,Lu, AD.,Zhang, LP.Liu , GL.(2015) Prognostic impact of loss of sex chromosomes in children with acute myeloid leukemia subtype M2. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*,17(2):168-171.
34. Jiang NG, Chen XM, Zhu HL, Zhong L, Zeng TT, Jia YQ (2010).Immunophenotype characteristics and prognosis of acute leukemia patients with cross expressing lymphoid and myeloid lineage associated antigens. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*,18(6):1405-9.
35. Kabel, A. M. , Zamzami, F. , Al-Talhi, M. , Al-Dwila, K. , & Hamza, R. (2017). Acute Myeloid Leukemia: A focus on Risk Factors, Clinical Presentation, Diagnosis and Possible Lines of Management. *Journal of Cancer Research and Treatment*, 5(2), 62-67.

36. Khalidi ,H.S., Medeiros ,L.J., Chang ,K.L., Brynes, R.K., Slovak, M.L., & Arber, D.A.(1998). The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-British classification, and karyotypic abnormalities . *American Journal of Clinical Pathology*, 109 (2), 211-220.
37. Khoury H, Dalal BI, Nevill TJ, Horsman DE, Barnett MJ, Shepherd JD, Toze CL, Conneally EA, Sutherland HJ, Hogge DE, Nantel SH (2003).Acute myelogenous leukemia with t(8;21)– identification of a specific immunophenotype. *Leuk Lymphoma*, 44: 1713–1718.
38. Klug, W.S., Cummings, M.R. & Spencer, C.A. (2006). *Conceptos de Genética*. 8ª edición. Pearson Prentice Hall. Madrid: 213-239.
39. Kumar, CC (2011).Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia .*Genes & Cancer*, 2 (2), 95 – 107.
40. Lagunas Rangel , F.A. (2016).Leucemia mieloide aguda: Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(3), 150–157.

41. Lai YY, Qiu JY, Jiang B, et al. (2005). Characteristics and prognostic factors of acute myeloid leukemia with t(8;21) (q22; q22) *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*.13(5):733–740.
42. Legrand, O., Perrot, J., Baudard, M., Cordier, A., Lautier, R., Simonin, G., et al. (2000). The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood*, 96(3), 870-877.
43. Licht, J.D.(2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. Derald H. Rittenberg. Cancer Center and Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine. *Oncogene*, 20(40), 5660-5679.
44. Lin, P., Chen, L., Luthra, R., Konoplev, SN., Wang X., Medeiros LJ (2008). Acute myeloid leukemia harboring t(8;21)(q22;q22): a heterogeneous disease with poor outcome in a subset of patients unrelated to secondary cytogenetic aberrations. *Mod Pathol*.21: 1029–1036.
45. López, R., Raya, J. M., Martínez, B., Cabrera, R., & Rodríguez, J. (2004). Estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer infantil. *Oncología (Barcelona)*, 27(10), 17-26.
46. Löwenberg, B., & Rowe, J. M. (2016). Introduction to the review series on advances in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 127(1), 1.

47. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. (2011). Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* ;29(5):475–486.
48. Marsán Suárez, V., del Valle Pérez, L., Díaz Domínguez, G., & Macías Abraham, C. (2015). Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las *leucemias agudas*. *Revista Cubana De Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(3).
49. Martínez J. (2015). Análisis cromosómico por medio de Técnicas citogenéticas clásicas y Moleculares en un grupo de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda del instituto nacional de Cancerología (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina, Departamento de Morfología. Consultado en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/49961/1/5599284.2015.pdf> el 2 de marzo del 2017.
50. Merino, A. (2010). Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Revista del Laboratorio Clínico*, 3(3), 139-47.
51. Mrózek, Krzysztof (2008) .Cytogenetic, Molecular Genetic, and Clinical Characteristics of Acute Myeloid Leukemia with a Complex Karyotype. *Seminars in Oncology*, 35 (4), 365 – 377.
52. Muñoz, L. (2005). Aportación del análisis inmunofenotípico en la caracterización de la Leucemia Aguda y en la identificación de subgrupos moleculares (tesis doctoral). Universidad

Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina, Barcelona. Consultado en: <http://hdl.handle.net/10803/4478> el 11 de septiembre del 2016.

53. Neuendorff NR, Burmeister T, Dörken B, Westermann J. (2016). BCR-ABL-positive acute myeloid leukemia: a new entity? Analysis of clinical and molecular features. *Ann Hematol*, 95(8):1211-21.
54. Nishii, K., Usui, E., Katayama, N. et al. (2003). Characteristics of t (8; 21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive subtype of t (8; 21) AML Leukemia. *17: 731–737*.
55. Novoa V, Núñez NA, Carballo OG, Lessa CF. (2003). Inmunofenotipos aberrantes en la leucemia aguda en una población hospitalaria de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, 73(1):9-16.
56. Ofran, Y. & Rowe, J. M. (2013). Genetic profiling in acute myeloid leukaemia -where are we and what is its role in patient management. *Br J Haematol*, 160: 303–320. Consultado en: doi: 10.1111 / bjh.12135 el 8 de agosto del 2017.
57. Ortuño Giner, F.J., & Orfao, A. (2002). Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. Universidad de Salamanca. Departamento de Medicina y Centro de Investigación del Cáncer. *Medicina Clínica*, 118(11) ,423-36.

58. Osman, I. M., Humeida, A. A. K. , Eltayeb, O. , Abdelrhman, I. , & Elhadi, T. A. (2015). Flowcytometric Immunophenotypic Characterization of Acute Myeloid Leukemia (AML) in Sudan. *International Journal of Hematological Disorders*, 2(1), 10-17.
59. Peniket, A., Wainscoat, J., Side, L., Daly, S., Kusec, R., Buck, G., et al. (2005), Del (9q) AML: clinical and cytological characteristics and prognostic implications. *British Journal of Haematology*, 129: 210–220.
60. Pino Blanco, D., Macías Abraham, C., Lahera Sánchez, T., Marsán Suárez, V., Sánchez Segura, M., del Valle Pérez, L. et al. (2014). Caracterización inmunofenotípica de pacientes con leucemia mieloide aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(1), 27-35. Consultado en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S086402892014000100005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892014000100005&lng=es&tlng=es) el 16 de septiembre del 2016.
61. Prada-Arismendy J, Arroyave JC. , Röthlisberger S. (2017).Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*,31(1):63-76.
62. Reikvam, H., Hatfield, K. J., Kittang, A. O., Hovland, R., & Bruserud, Ø. (2011). Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 104631. Consultado en: <http://doi.org/10.1155/2011/104631> el 5 de octubre del 2016.

63. Repp, R., Schaekel, U., Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, et al. (2003). Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry*,53B(1): 11-19.
64. Rojas J, Álvarez M, Suárez DV.(2016). Sarcoma Granulocítico (Cloroma) en pediatría. Reporte de caso, In *Pediatría*, 49(1): 36-39.
65. Rueda, Lidiane C., Zocca, Maristela, Oliveira, Gislaine B., & Lima, Carmen S.P(2004).Translocation t(8;21)(q22;q22) in Acute Myeloid Leukaemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 26(1), 66-67.
66. Suela, J.(2008). Estudio Genómico de la Leucemia Mieloide Aguda (tesis doctoral).Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Biología molecular; Madrid. Consultado en: <http://hdl.handle.net/10486/1786> el 7 octubre del 2016.
67. Saultz JN & Garzon R. (2016). Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med*, 5;5(3).
68. Saitoh, K., Miura, I., Ohshima, A., Takahashi, N., Kume, M., Utsumi, S. et al (1997). Translocation (8;12;21)(q22.1;q24.1;q22.1): a new masked type of t(8;21)(q22;q22) in a patient with acute myeloid leukemia.*Cancer Genet Cytogenet* ,96:111–114.

69. Salem, D. A., & Abd El-Aziz, S. M. (2012). Flowcytometric Immunophenotypic Profile of Acute Leukemia: Mansoura Experience. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*, 28(2), 89–96. <http://doi.org/10.1007/s12288-011-0110-2>.
70. Schoch C, Haase D, Haferlach T, Gudat H, Buchner T, Freund M, Link H, Lengfelder E, Wandt H, Sauerland MC, et al.( 1996) Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia*,10 (8):1288–1295.
71. Shipley JL & Butera JN. (2009).Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*, 37(6):649-58.
72. Sierra J. (2015). La genética como guía del manejo de la leucemia mieloide aguda. *Hematología*, 19: 81 – 86.
73. Sieverts E. (2004) Native antibody and antibody-targeted chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Adv Pharmacol* 51: 169–83. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(04\)51007-4](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(04)51007-4)
74. Silva, Grazielle C. da, Pilger, Diogo A., Castro, Simone M. de, & Wagner, Sandrine C.(2006). Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42(2), 77-84.

75. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al.(2008).WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
76. Taguchi H., Kitagawa T., Yamashita Kubonishi M., & I., Miyoshi I. (1986). New variant translocation (1;8;21) in a case of acute myeloblastic leukemia (M2). *Cancer Genet Cytogenet* ; 6: 143–152.
77. Tong, H.,Lu ,C., Zhang J., Liu, Z. & Ma, Y. (2009).Immunophenotypic, cytogenetic and clinical features of 192 AML patients in China. *Clin Exp Med*.Jun; 9(2):149–155. Published online 2009 Feb 10. doi: 10.1007/s10238-009-0030-8.
78. Van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J. et al. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), 1908–1975.
79. Vundinti, BR., Kerketta, L., Madkaikar, M., Jijina , F., Ghosh, K. (2008).Three way translocation in a new variant of t(8;21) acute myeloid leukemia involving Xp22. *Indian J Cancer*,45:30–2.

80. Wang, X., Zheng, JE. , Gu, JX , Yao, JX ,Yang, Jin & Liu, Jun , et al. (2005). Correlation of immunophenotype to cytogenetics and clinical features of adult acute myeloid leukemia. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer.* 24. 667-71.
81. Xu S, Li X, Zhang J & Chen J (2015). Prognostic Value of CD11b Expression Level for Acute Myeloid Leukemia Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10(8):e0135981.
82. Zheng, J., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Liu, J. He, Y., et al.(2008). A correlation study of immunophenotypic, cytogenetic, and clinical features of 180 AML patients in China. *Cytometry*, 74B: 25–29.

## **ANEXO N°1**

### **FICHA DE RECOLECCION DE DATOS**

#### **DATOS DEL PACIENTE**

1. NOMBRE Y APELLIDOS DEL PACIENTE:
2. NÚMERO DE HISTORIA CLINICA:
3. EDAD/SEXO:
4. ANTECEDENTES PATOLOGICOS :
5. TIEMPO DE ENFERMEDAD :
6. TRATAMIENTO PREVIO:
7. MANIFESTACIONES CLINICAS:
8. FECHA DE INGRESO Y FECHA DE ULTIMO MOVIMIENTO :

### DATOS DE ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO

1. RESULTADO MORFOLOGICO EN MÉDULA OSEA:FECHA DE ESTUDIO – CONCLUSIÓN DIAGNÓSTICA
2. RESULTADO DE ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO : FECHA DE ESTUDIO – CONCLUSIÓN DIAGNÓSTICA
3. PORCENTAJE DE CÉLULAS INMADURAS (BLASTOS): .....% CÉLULAS COMPLEMENTARIAS:
4. EXPRESIÓN DE MARCADORES INMUNOFENOTIPICOS: POSITIVO (P)- PARCIAL(PA)- NEGATIVO(N)
5. MARCADOR LEUCOCITARIO: CD 45
6. MARCADOR ES DE INMADUREZ : TDT CD34 CD117 HLA – DR
7. MARCADORES MIELOIDES : CD13 CD33 CD15 MPO CD71
8. MARCADORES MIELOMONOCITICOS : CD64 CD14 CD11B
9. MARCADORES DE ORIGEN LINFOIDE : CD19 CD4 CD7 CD56 CD79a

### DATOS DE ESTUDIO CITOGENÉTICO

1. FECHA DE ESTUDIO:
2. CARACTERISTICAS DEL CULTIVO
  - MUESTRA: MEDULA ÓSEA
  - MEDIO DE CULTIVO
  - TIEMPO DE CULTIVO
  - TIPO DE BANDAS : GTG
  - NUMERO DE METAFASES EVALUADAS
3. RESULTADO DEL CARIOTIPO - CONCLUSIÓN

## ANEXO N°2

### PROTOCOLO REFERENCIAL DEL ESTUDIO CITGENETICO CONVENCIONAL

<p>❖ <b><u>Muestra:</u></b></p> <p>Aspirado de Medula ósea con anticoagulante (heparina)</p> <p>❖ <b><u>Reactivos</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Medio de Cultivo</li><li>▪ solución salina hipotónica</li></ul>	<p>❖ <b><u>Equipos y materiales</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Cabina biológica de seguridad</li><li>▪ Micropipeta 20-100 ul</li><li>▪ Tips estériles para micropipeta</li><li>▪ Rack para tubos de 15 ml</li><li>▪ Tubos de 15 ml para centrifuga descartable</li><li>▪ Centrifuga</li></ul>
---	--

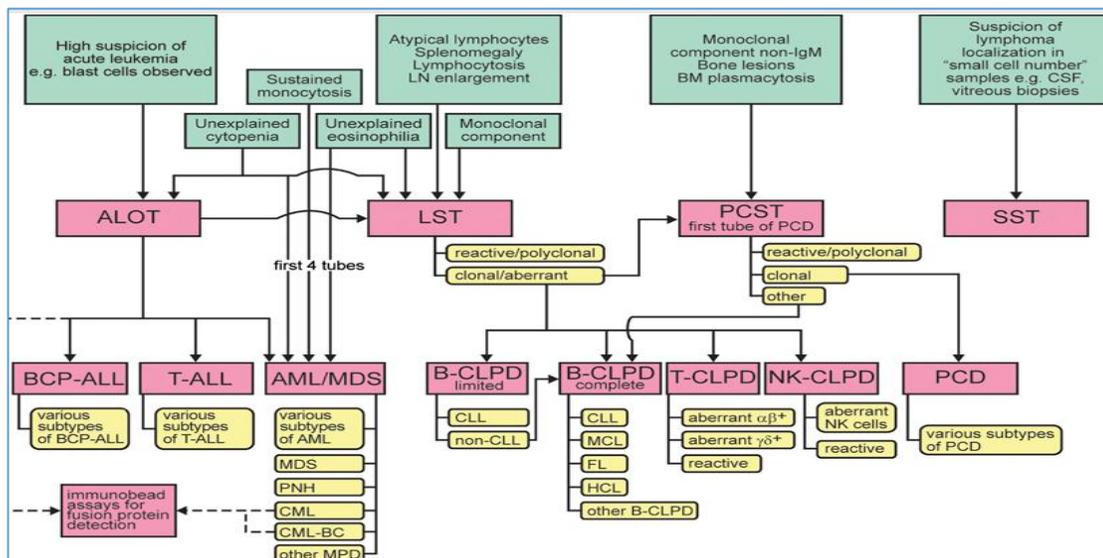
❖ **Procedimiento**

1. **Siembra** (cámara de flujo laminar): 5ml- medio de cultivo más 15- 20 gotas de médula ósea (referencia: conteo leucocitario referencial en sangre periférica). Incubar 24 horas (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).
2. **Cosecha:** Homogenizar, agregar 65 ul de Colcemid e incubar por 20 minutos a 37°C luego centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet. Agregar 10 mL de solución KCl al 0.56 g% a 37°C y resuspender. Incubar por 20 a 25 minutos a 37°C en baño maría térmica. Agregar 1mL de fijador (metanol: ácido acético, 3:1), homogenizar y centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet. Agregar 5-7 ml de fijador, homogenizar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar los tubos por 10 minutos a 1500 rpm. Realizar de 2-3 lavados sucesivos con fijador hasta que el pellet quede limpio.
3. **Preparación de láminas:** Homogenizar la muestra fijada y extender 35 ul sobre cada lámina portaobjeto previamente limpiada con alcohol. Luego colocar por 1 hora y media en una estufa a 90°C.
4. **Técnica de bandeado cromosómico:** (baño maría a 37°C) las láminas envejecidas someterlas a la técnica GTG, de acuerdo al siguiente procedimiento: segundos en NaCl 0.9 g%, 1-30 segundos en tripsina 0.1 g% y luego para detener la reacción en NaCl 0.9g%. Después colorear con la solución de trabajo (Giemsa) por 2 minutos y enjuagar con agua corriente.

**ANEXO N°3**

**PROTOCOLO DEL ESTUDIO INMUNOFENOTIPICO (Van Dongen et al. ,2012)**

**PROTOCOLO EUROFLOW: DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CARACTERIZACION A INMUNOFENOTÍPICA DE NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS.**



**Tubo de orientación para la leucemia aguda (ALOT):** Permite reconocer que tipo de leucemia aguda es (LLA-B, LLA-T y LMA, LA de linaje ambiguo) y que panel es necesario para la caracterización fenotípica complementaria.

V 450	V500	FITC	PE	PerCPCY5	APC	APCCy7
<b>CyCD3</b>	<b>CD45</b>	<b>CyMPO</b>	<b>CyCD79 A</b>	<b>CD34</b>	<b>CD19</b>	<b>CD7</b>

### Panel complementario para la caracterización inmunofenotípica de LMA

Caracterización de las LMA subtipo M2 se utiliza los tubos 1 ,2 y un tercer tubo con combinaciones de marcadores frecuentes en este subtipo de LMA (CD56, CD15, CD33, entre otros).

Tubo	PACB	PACO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	Objetivo
1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	El diagnóstico y la clasificación, la maduración de neutrófilos, la HPN
2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300 e IREM2	CD14	El diagnóstico y la clasificación, la maduración de monocitos, la HPN
3	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	El diagnóstico y la clasificación, la maduración elitroide
4	HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	La expresión aberrante de marcadores linfoides, B anormal maduración linfoide
5	HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38	la expresión del marcador aberrante, las células madre
6	HLADR	CD45	CD42a y CD61	CD203 c	CD34	CD117	CD123	CD4	Diagnóstico y clasificación de la LMA Megacariocítica, basófilos, y los linajes de células dendríticas plasmacitoides
7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Caracterización de la leucemia megacarioblástica, y mastocitosis sistémica