

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PERFILES MOLECULARES Y CITOGENÉTICOS EN EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO
Y SEGUIMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: SITUACIÓN EN COSTA RICA

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de
Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar el grado y título de Especialidad
en Hematología

PRISCILLA ZÚÑIGA CARVAJAL

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia por siempre apoyarme.

AGRADECIMIENTO

A mis compañeros de la especialidad por hacer de estos dos años una experiencia inolvidable.

A Gabriel y a la Dra Argüello por todo el apoyo y esfuerzo que hicieron para que yo asistiera a todas las clases.

Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.



MSc. Melissa Granados Zamora

Profesor o Profesora tutora



Esp. Wendy Villalobos Meléndez

Lector o Lectora



Esp. Yaoska Rojas Castrillo

Lector o Lectora



Priscilla Zúñiga Carvajal

Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	iv
RESUMEN.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL:.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	4
METODOLOGÍA.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	6
2.1.2 ETIOLOGÍA.....	6
2.1.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	8
2.1.4 PATOFISIOLOGÍA.....	9
2.1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	10
2.1.6 CLASIFICACIÓN.....	10
2.1.7 DIAGNÓSTICO.....	21
2.1.8 ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO EN LMA.....	23
2.1.9 MONITOREO DE LA ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL (EMR).....	25
2.1.10 TRATAMIENTO.....	28
CAPÍTULO 3.....	37
3.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS CITOGENÉTICOS.....	37
3.1.1 TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO.....	38

3.1.2 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.....	39
3.1.3 CARIOTIPO	40
3.1.4 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)	42
3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULARES.....	44
3.2.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	44
3.2.2 PCR EN TIEMPO REAL.....	45
3.2.3 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS).....	46
CAPÍTULO 4	52
ABORDAJE CITOGÉNÉTICO, MOLECULAR Y TERAPÉUTICO DE PACIENTES CON LMA EN COSTA RICA	52
4.1.1 ABORDAJE CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES CON LMA	52
4.1.2 ABORDAJE MOLECULAR DE PACIENTES CON LMA.....	53
4.1.2 ABORDAJE TERAPEÚTICO DE PACIENTES CON LMA	55
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS.....	58
ANEXOS	64
ANEXO 1. ENTREVISTA 1	64
ANEXO 2. ENTREVISTA 2	65

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda es una enfermedad producida por una expansión clonal y un arresto en la diferenciación de las células progenitoras mieloides, que se caracteriza por ser genéticamente heterogénea. La incidencia aumenta con la edad, siendo más común en adultos mayores, aunque también puede afectar a niños. La patofisiología implica acumulación de mutaciones que confieren ventaja proliferativa y supervivencia a las células malignas, alterando la diferenciación hematopoyética normal.

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud del 2022, está basada en evidencia y funciona como estándar para el diagnóstico, investigación, registros de cáncer y vigilancia de salud pública en todo el mundo. Enfatiza la separación de LMA con anomalías genéticas definidas de aquellas que no las tienen, eliminando el término LMA NOS y ajustando los criterios en los porcentajes de blastos requeridos para el diagnóstico.

El diagnóstico de la LMA incluye hemograma, frotis de sangre periférica, panel bioquímico, pruebas de coagulación, citometría de flujo, análisis citogenéticos y moleculares. La caracterización genómica se ha vuelto cada vez más importante para el diagnóstico preciso, la evaluación de riesgos y la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con leucemias agudas. La citogenética convencional sigue siendo vital en hematología, aunque requiere de cultivo celular y técnicas especializadas para su aplicación clínica, sigue aportando información valiosa en el diagnóstico y manejo de enfermedades hematológicas como la LMA. Cada técnica tiene ventajas y limitaciones específicas en términos de costo, tiempo de procesamiento, capacidad para detectar diferentes tipos de variantes genéticas y aplicaciones clínicas. La elección de la técnica adecuada depende de los objetivos y los recursos disponibles. En Costa Rica el procesamiento de las muestras para análisis moleculares y citogenéticos de los pacientes diagnosticados con LMA están a cargo del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños, los análisis disponibles a la fecha son: cariotipo, FISH, PCR en tiempo real, PCR punto final y en casos excepcionales NGS.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.	11
Tabla 2. Anormalidades citogenéticas y moleculares que definen la LMA relacionada con mielodisplasia según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud	13
Tabla 3. Marcadores de diferenciación y criterios para los tipos de LMA definidos por diferenciación según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud	13
Tabla 4. Clasificación de LMA con porcentaje de blastos requerido para el diagnóstico según la ICC, 2022	20
Tabla 5. Clasificación de riesgo mediante genética al momento del diagnóstico según ELN, 2022	25
Tabla 6. Métodos para detección de EMR en LMA. Modificado de (Döhner et al., 2022).	26
Tabla 7. Ventajas, limitaciones, y utilidad clínica de las tecnologías genómicas disponibles para malignidades hematológicas	50
Tabla 8. Médulas óseas de pacientes diagnosticados con LMA procesadas en el laboratorio de citogenética y el laboratorio de diagnóstico molecular del HNN en los años 2019, 2020, 2021, 2022 y 2023	54
Tabla 9. Fármacos aprobados como tratamiento para pacientes diagnosticados con LMA según la Lista Oficial de Medicamentos y Normativa, 2024. ¡Error! Marcador no definido.	

LSTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de cooperación entre las mutaciones asociadas con la aparición de la LMA	9
Figura 2. Procedimiento de preparación de muestra para análisis de cariotipo en pacientes con leucemia. Modificado de Wan, 2014.....	42
Figura 3. Esquema del protocolo del FISH Modificado de Wan, 2014.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

alo-HCT: Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas

AMC: Análisis de microarrays cromosómicos

ATO: Trióxido de arsénico

ATRA: Ácido transretinoico

CBF: Factores de unión central

CCSS: Caja Costarricense de Seguro Social

CFM-EMR: Enfermedad medible residual mediante citometría de flujo multicolor

CID: Coagulación intravascular diseminada

CNV: Variantes en número de copias

ddNTPs: Dideoxidonucleótidos

ELN: European LeukemiaNet

EMR: Enfermedad medible residual

FDA: Food and Drug Administration

FISH: Hibridación fluorescente in situ

ICC: Clasificación de consenso internacional

IDH1: Isocitrato deshidrogenasa 1

IDH2: Isocitrato deshidrogenasa 2

ISCN: Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMA-NOS: Leucemia mieloide aguda sin otra especificación

LMA-RM: Leucemia mieloide aguda relacionada con mielodisplasia

LMC: Leucemia mieloide crónica

LOM: Lista Oficial de Medicamentos y Normativa de la CCSS

LPA: Leucemia promielocítica aguda

MLFS: Estado libre de leucemia morfológica

MPO: Mieloperoxidasa

NGS: Secuenciación de nueva generación

NMD: Neoplasias mielodisplásicas

NMP: Neoplasias mieloproliferativas

NPM1: Nucleofosmina

NSE: Esterasa no específica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RC: Remisión completa

RCh: Remisión completa con recuperación hematológica parcial

RCi: Remisión completa con recuperación hematológica incompleta

RP: Remisión parcial

RT-qPCR: PCR en tiempo real cuantitativa

t-LMA: Leucemia mieloide aguda relacionada con terapia

SBB: Negro Sudán

SCT: Trasplante de células madre

SNV: Variantes de nucleótido único

SPF: Síndrome plaquetario familiar

SRF: Factor de respuesta al suero

SV: Variante estructural

WES: Secuenciación de exoma completo

WGS: Secuenciación de genoma comp

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas son trastornos clonales malignos de los órganos hematopoyéticos que afectan a una o más líneas celulares. Se caracterizan por un reemplazo difuso de la celularidad normal de la médula ósea por una población de células malignas inmaduras e indiferenciadas. Estos trastornos se clasifican según el origen de las células hematopoyéticas involucradas como linfoides, mieloides o de linaje ambiguo (1). Se presentan en pacientes de todas las edades, siendo más común en pediatría la Leucemia Linfocítica Aguda y en adultos la Leucemia Mieloide Aguda (2). Como consecuencia de la infiltración de los blastos en médula ósea los pacientes pueden presentar fatiga, cansancio, sangrados, infecciones recurrentes, dolores óseos, hepatoesplenomegalia entre otros cuadros (3).

La primera clasificación del grupo Franco-Americano-Británico (FAB), fue introducida en el año 1976 con una posterior revisión en el año 1985, esta facilitó el primer marco real para clasificar los blastos leucémicos principalmente de acuerdo a las características morfológicas y citoquímicas. Según la clasificación FAB se requería que el 30% de los elementos nucleados fueran blastos. A medida que se apreciaban más las anomalías citogenéticas desde el reconocimiento del cromosoma Filadelfia, como la primera translocación asociada a una leucemia, y se comprendían mejor las implicaciones pronósticas de los perfiles citogenéticos en las malignidades hematológicas, se introdujeron y utilizaron esquemas de clasificación pronósticos basados únicamente en los hallazgos citogenéticos, dividiendo así en pronóstico "favorable", "intermedio" y "adverso" (2).

Para el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS), redefinió de dos maneras la clasificación de la FAB, la primera estableciendo el diagnóstico de Leucemia Aguda con un 20% de blastos en médula ósea y la segunda enfatizando la importancia de las anomalías citogenéticas asociadas (2). A partir de ese momento se han realizado revisiones a la clasificación de la OMS, la más reciente se publicó en el año 2022, se basa en la integración de datos morfológicos, inmunofenotípicos, moleculares y citogenéticos, incluyendo a la lista un mayor número de subtipos definidos molecularmente (4).

La caracterización genómica se ha vuelto cada vez más importante para el diagnóstico preciso, la evaluación de riesgos y la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con leucemias agudas. La citogenética convencional, un método integral e imparcial para evaluar anomalías cromosómicas, ha sido el pilar de las pruebas genómicas durante las últimas décadas y sigue siendo relevante en la actualidad. Sin embargo, los avances más recientes en la tecnología de secuenciación han aumentado la capacidad de detectar más mutaciones asociadas con esta patología (5).

JUSTIFICACIÓN

El uso de técnicas citogenéticas y moleculares en la investigación de la Leucemia Mieloide Aguda, amplió el panorama de clasificación del riesgo y con ello aparecieron nuevos retos. El reconocimiento de alteraciones genéticas recurrentes hizo posible una estimación más precisa del pronóstico, y permitieron separar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, dando como principal resultado la creación de protocolos de tratamiento según las necesidades de cada persona (6) (2). Además, la implementación de terapias novedosas dirigidas a ciertas dianas moleculares, como por ejemplo el uso del ácido transretinoico y el trióxido de arsénico, para la t(15;17) *PML;RARa*, en la Leucemia Promielocítica Aguda o el uso de inhibidores de tirosin quinasa para la t(9;22) *BCR::ABL1*, en la Leucemia Mieloide Crónica, ha demostrado tener resultados sumamente favorables en la supervivencia de los pacientes y muy superiores a la quimioterapia tradicional, por lo tanto se espera poder generar terapias dirigidas para las diferentes entidades (7).

Esta propuesta de investigación pretende documentar y conocer la marcha analítica que se lleva a cabo en los laboratorios de citogenética y biología molecular para realizar los análisis de los pacientes diagnosticados con Leucemia Mieloide aguda. Además, busca visibilizar la importancia de invertir en estas pruebas de laboratorio y personal capacitado, que, aunque sean costosas, tienen un gran impacto en el pronóstico de los pacientes de los servicios de hematología de los diferentes centros de salud del país.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el impacto de la implementación de la biología molecular y la citogenética como complemento para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la Leucemia Mieloide Aguda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre los aspectos generales, epidemiología, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda.
2. Explicar las principales técnicas moleculares y citogenéticas utilizadas para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la Leucemia Mieloide Aguda.
3. Llevar a cabo entrevistas, en el Laboratorio de Biología Molecular y el Laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños para conocer que análisis están disponibles en Costa Rica para pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.

METODOLOGÍA

Se realizará una revisión bibliográfica utilizando bases de datos electrónicas como PubMed (NCBI), Elsevier, SciELO y páginas web de revistas como *Blood*, *Leukemia & Lymphoma*, *Annals of Hematology*, entre otras, utilizando como palabras clave como “*Leucemia Aguda*”, “*Diagnóstico molecular de Leucemia Aguda*”, “*Diagnóstico citogenético de Leucemia Aguda*”, tanto en inglés como en español, con el fin de recopilar información sobre los aspectos generales de la Leucemia Mieloide Aguda, así como de los fundamentos y aspectos metodológicos de las principales técnicas moleculares y citogenéticas utilizadas para el diagnóstico y seguimiento de las Leucemias Agudas. Para conocer que análisis están disponibles en Costa Rica para pacientes con Leucemia mieloide aguda, se realizaron dos entrevistas a los colaboradores del Laboratorio de Citogenética y del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños (Ver anexo 1 y anexo 2).

CAPÍTULO 2

2.1 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad producida por una expansión clonal y un arresto en la diferenciación de las células progenitoras mieloides, que se caracteriza por ser genéticamente heterogénea. Las anomalías incluyen reordenamientos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas que alteran el proceso normal de maduración y le confieren al clon maligno ventaja proliferativa y de supervivencia sobre las células madre normales (6).

2.1.2 ETIOLOGÍA

En la mayoría de los casos los pacientes que desarrollan LMA carecen de una etiología claramente definida, por lo tanto, se clasifica como neoplasia maligna de novo. El daño genético que lleva a la expansión clonal de los mieloblastos inmaduros es la raíz de la fisiopatología que conduce al fallo medular en la LMA (8). Las mutaciones somáticas se han reportado en el 97,3% de los casos (9).

Por el contrario, en la LMA secundaria es posible demostrar una condición previa que predispone a la enfermedad, como trastornos hematológicos malignos, tratamiento con quimioterapéuticos citotóxicos o radiación y exposición a agentes ambientales (10). Entre los trastornos hematológicos malignos que preceden a la LMA se pueden mencionar neoplasias mielodisplásicas (NMD) y neoplasias mieloproliferativas (NMP), que le confieren al paciente un 10% de riesgo de desarrollar LMA en 10 años. Los síndromes de inestabilidad cromosómica como la anemia de Fanconi, disqueratosis congénita, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia de Diamond-Blackfan, síndrome de trombocitopenia amegacariocítica congénita y trombocitopenia con ausencia de radio se asocian en diferentes porcentajes con mayor incidencia de LMA (2).

LMA relacionada con terapia (t-LMA): En las décadas de 1960-1970 se observó en pacientes con linfoma de Hodgkin y cáncer de ovario una propensión a desarrollar LMA años después del tratamiento con agentes alquilantes (como tiotepa, mostazas nitrogenadas o derivados de mostazas como el clorambucilo) y/o radioterapia. Por otro lado,

los inhibidores de la topoisomerasa tipo II (como las antraciclinas, la mitoxantrona y el etopósido), están relacionados con t-LMA específicamente con la leucemia mielomonocítica aguda y la leucemia monocítica aguda, con un patrón de desarrollo de la t-LMA de 2 a 3 años posterior a la exposición (8).

Las mutaciones somáticas también han sido encontradas en un 70% de los pacientes con t-LMA, porcentaje similar a las LMA de novo. Siendo la más común en la t-LMA la mutación en el gen *TP53*, con una frecuencia del 35%, además las mutaciones en *IDH1*, *IDH2*, *NRAS*, *FLT3*, *DNMT3A* y *KRAS* han sido identificadas en diferentes porcentajes (8).

Predisposición de línea germinal: Existe una minoría de casos donde se han reportado mutaciones en línea germinal, aberraciones cromosómicas y síndromes de predisposición. La frecuencia exacta de la LMA que surge de una predisposición genética hereditaria es en gran parte desconocida, un estudio multicéntrico finlandés de secuenciación de exomas en 80 pacientes con LMA, detectó 34 variantes en 16 genes que se consideraron variantes germinales probablemente patogénicas, con una frecuencia de 9%. Las predisposiciones de línea germinal con mayor riesgo establecido de desarrollo de LMA son el síndrome plaquetario familiar (SPF) y la haploinsuficiencia de *GATA2*. El SPF se caracteriza por una mutación en el *RUNX1*, un factor de transcripción ubicado en 21q22.12, el cual es crítico para la hematopoyesis normal. Las mutaciones en *GATA2*, ubicado en 3q21.3, confiere un 6%, 54% y 63% de riesgo de desarrollo de NMD o LMA a los 10, 20 y 30 años de edad respectivamente. Y el riesgo de por vida de desarrollar LMA es de al menos 33% (8).

Varios síndromes hereditarios de insuficiencia medular también son factores predisponentes de línea germinal para desarrollar LMA. El 90% de los pacientes con síndrome de Shwachman-Diamond tienen mutaciones bialélicas en *SBDS* (ubicado en 7q11.21), este gen está relacionado con la estabilidad y la regulación cromosómica, las anomalías en el cromosoma 7 son a menudo observadas en este síndrome. La disqueratosis congénita tiene mutaciones que afecta al complejo de telomerasa (*DKC1*, *TERT* y *TERC*, entre otros), que disminuyen la longitud de los telómeros con cada división celular causando eventualmente inestabilidad cromosómica y apoptosis del progenitor mielóide. La anemia de Fanconi es el resultado de mutaciones bialélicas de línea germinal

en cualquiera del grupo de genes responsables de la reparación del entrecruzamiento entre cadenas (*FANCA*, *FANCC* y *FANCG*), estos pacientes tienen un riesgo de 8% de sufrir LMA antes de los 20 años de edad. El síndrome de Kostmann, por su parte confiere un riesgo de LMA de por vida de un 11-22%, entre las mutaciones encontradas en este síndrome tenemos las de los genes *ELANE*, *HAX1*, *G6PC3* o *WASP* (4).

Exposiciones y LMA secundaria: La sustancia química leucemogénica identificada más consistentemente es el benceno, un hidrocarburo aromático natural que se encuentra en petróleo crudo y gasolina y se emplea como disolvente a nivel industrial. La exposición al benceno se ha relacionado con la monosomía 5, 6, 7 y 10 y la trisomía 8, 9, 17, 21 y 22, así como mutaciones en *RUNX1*, *RUNX3*, *MSH3* y *TP53* (8).

La exposición recurrente al formaldehído aumenta la probabilidad de anomalías cromosómicas relacionadas con la LMA, sin embargo, no se ha establecido una relación directa entre la exposición al formaldehído y la LMA. Respecto a los pesticidas se ha informado un mayor riesgo de desarrollar cualquier tipo de leucemia entre los trabajadores constantemente expuestos, no ha sido asociado un pesticida específico a un mayor riesgo de LMA (8).

2.1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La LMA es uno de los tipos de leucemia más frecuentes en adultos, la edad promedio de diagnóstico es de 68 años y la incidencia aumenta con la edad, a pesar de esto los niños no están exentos de padecer de LMA (11). En el Reino Unido, Canadá, Australia y Suecia, la edad promedio reportada en pacientes con LMA, oscila entre 63-71 años. En países como India, Brasil y Argelia, la edad promedio en el momento del diagnóstico de LMA fue 40, 42 y 45 años respectivamente. Los hombres tienen entre 1,2 y 1,6 más probabilidades de desarrollar LMA durante su vida según estudios basados en la población de los Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Dinamarca, Australia y Argelia (8). Relacionado a la etnia se ha reportado que la LMA es más común en caucásicos que en otros grupos étnicos; los afroamericanos y los hispanos tienen el 12% y 6% mayor riesgo de muerte respectivamente, estos grupos étnicos presentan una tasa más alta de translocaciones $t(8;21)$ y $t(15;17)$ ambas asociadas con un mejor pronóstico (2)

Según datos de la American Cancer Society, en el 2024 se diagnosticarán en los Estados Unidos, aproximadamente 62.770 nuevos casos de todos los tipos de leucemia, de los cuales 20.800 casos serán de LMA y se estima que ocurran 23.670 muertes a causa de todos los tipos de leucemia siendo 11.220 muertes a causa de la LMA específicamente, en su mayoría se espera que los pacientes adultos sean mayormente afectados (11).

2.1.4 PATOFISIOLOGÍA

La LMA resulta de la transformación clonal de precursores hematopoyéticos mediante la adquisición de reordenamientos cromosómicos y múltiples mutaciones que confieren ventaja proliferativa y de supervivencia, causando un deterioro en la diferenciación hematopoyética. Estos eventos oncogénicos son a menudo clasificados según el modelo de dos hits propuesto por Gilliland en 2001. Como se muestra en la Figura 1, este modelo plantea la hipótesis de que la LMA es la consecuencia de una colaboración entre al menos dos clases de amplias mutaciones, mutaciones de clase I que confieren ventaja proliferativa y de supervivencia y de clase II que afectan los procesos de diferenciación celular y apoptosis. Estudios recientes que utilizaron secuenciación masiva en paralelo han identificado otro grupo de mutaciones que no se ajustan a ninguna de las dos clases descritas previamente, este grupo identificado promueven principalmente modificaciones epigenéticas (7).

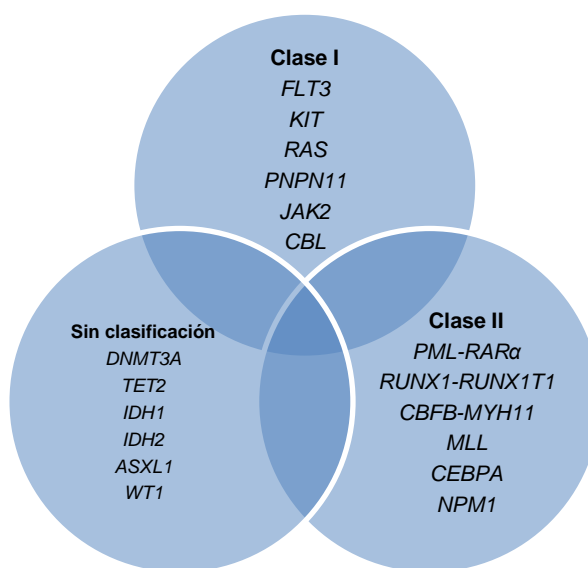


Figura 1. Modelo de cooperación entre las mutaciones asociadas con la aparición de la LMA (7)

2.1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los signos y síntomas de los pacientes con LMA son un reflejo de las citopenias. En la mayoría de los pacientes existe un periodo corto (de 1-8 semanas) de historia de fiebre, síntomas constitucionales (fatiga, falta de energía, malestar general, sudoración), o manifestaciones de sangrado (hematomas en la piel, epistaxis, menorragia). Los dolores de huesos son poco frecuentes incluso en presentaciones con excesiva leucocitosis, si están presentes sobre todo en niños se debe sospechar de una LLA. Los signos en el examen físico suelen ser inespecíficos, no es posible hacer distinción entre una LMA y una LLA solo con el examen clínico. Los pacientes pueden presentar palidez, equimosis, petequias, agrandamiento de los ganglios linfáticos y raramente hepatoesplenomegalia. Los defectos nerviosos y otras anomalías neurológicas son raros con excepción de la LMA monocítica o en cualquier LMA con leucocitosis $>100.000/\mu\text{L}$. La anemia y la trombocitopenia son universales, en cuanto al recuento de glóbulos blancos puede variar de bajo a alto ($\leq 5000/\mu\text{L}$ a $\geq 100.000/\mu\text{L}$) (2).

La evaluación inicial de laboratorio debe incluir (2):

- Hemograma con evaluación del frotis de sangre periférica.
- Panel bioquímico que incluya: electrolitos, nitrógeno ureico, creatinina, bilirrubina total, transaminasas, ácido úrico, lactato deshidrogenasa.
- Estudios de coagulación que incluya: tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial y niveles de fibrinógeno.

2.1.6 CLASIFICACIÓN

La clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS), está basada en evidencia y funciona como estándar para el diagnóstico, investigación, registros de cáncer y vigilancia de salud pública en todo el mundo. La revisión de la clasificación de la LMA en 2022 se realizó con el objetivo de enfatizar los avances de los últimos años sobre el manejo y el entendimiento de la enfermedad (4).

Uno de los puntos más relevantes de la nueva clasificación de la OMS es la separación de la LMA con anormalidades genéticas definidas, de la LMA definida por

diferenciación. Lo anterior permite la eliminación del término LMA NOS (no otherwise specified), que fue objeto de confusión en las clasificaciones anteriores. Además, otro de los cambios más relevantes es la eliminación del requisito del 20% de blastos en el caso de las LMA con anomalías genéticas definidas (con excepción de la LMA con fusión *BCR::ABL1* o con mutación de *CEBPA*). La eliminación del corte requiere una correlación entre los hallazgos morfológicos y genéticos para garantizar que la anomalía definitoria está impulsando la patología. Los desafíos prácticos más relevantes que justifican la reevaluación incluyen (4):

- Cualquier límite basado en blastos es arbitrario y no pueden reflejar la continuidad biológica naturalmente inherente a los mecanismos patógenos mieloides.
- La enumeración de blastos está sujeta a variaciones o errores de muestreo y a evaluación subjetiva.
- No existe un estándar de oro para el recuento de blastos, y las plataformas de prueba pueden y a menudo producen resultados discordantes.

Adoptar un límite de blastos del 10%, para ser llamado NMD/LMA fue considerado por el panel de expertos, como redundar en las limitaciones y desafíos anteriormente mencionados y simplemente sería reemplazar un límite por otro sin ofrecer un panorama más claro. También esto podría significar un riesgo de sobretratamiento para los pacientes. En consecuencia, se adoptó un enfoque equilibrado al eliminar los límites de blastos en los tipos de LMA con características genéticas definitorias, pero conservando un 20% para separar las NMD de la LMA. En cuanto a la LMA con anomalías en *RUNX1* se llegó a la conclusión que carecía de especificidad como para ser considerada una entidad aparte (4).

Tabla 1. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (4).

Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas definidas

Leucemia promielocítica aguda con fusión *PML::RARA*

Leucemia mieloide aguda con fusión *RUNX1::RUNX1T1*

Leucemia mieloide aguda con fusión *CBFB::MYH11*

Leucemia mieloide aguda con fusión *DEK::NUP214*
 Leucemia mieloide aguda con fusión *RBM15::MRTFA*
 Leucemia mieloide aguda con fusión *BCR::ABL1*
 Leucemia mieloide aguda con rearreglo *KMT2A*
 Leucemia mieloide aguda con rearreglo *MECOM*
 Leucemia mieloide aguda con rearreglo *NUP98*
 Leucemia mieloide aguda con mutación *NPM1*
 Leucemia mieloide aguda con mutación *CEBPA*
 Leucemia mieloide aguda relacionada a mielodisplasia
 Leucemia mieloide aguda con otras alteraciones genéticas definidas

Leucemia mieloide aguda definida por diferenciación

Leucemia mieloide aguda con mínima diferenciación
 Leucemia mieloide aguda sin maduración
 Leucemia mieloide aguda con maduración
 Leucemia basofílica aguda
 Leucemia mielomonocítica aguda
 Leucemia monocítica aguda
 Leucemia eritroide aguda
 Leucemia megacarioblástica aguda

La entidad anteriormente llamada LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, ahora es llamada LMA relacionada con mielodisplasia (LMA-RM) y fue sometida a varios cambios, entre los que se pueden mencionar la definición de una neoplasia con un 20% de blastos que expresan inmunofenotipo mieloide y que albergue anomalías citogenéticas y moleculares específicas asociadas con NMD, que surgen de novo o después de una historia conocida de NMD o NMD/NMP. Los cambios clave incluyen la eliminación de la morfología sola como herramienta diagnóstica para definir la LMA-RM; la actualización de la definición de criterios citogenéticos; y la introducción de una definición basada en mutaciones de un conjunto de 8 genes que han sido encontrados en >95% de las LMA que surgen posterior a una NMD o NMD/NMP. Para hacer el diagnóstico de LMA-RM se requiere una o más anomalías citogenéticas y/o moleculares de las que se mencionan en la Tabla 2, o antecedentes de NMD o NMD/NMP (4).

Tabla 2. Anormalidades citogenéticas y moleculares que definen la LMA relacionada con mielodisplasia según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (4).

Anormalidades citogenéticas definitorias
Cariotipo complejo (≥ 3 anormalidades)
Deleción 5q o pérdida del 5q debido a translocación no balanceada
Monosomía 7, deleción 7q, o pérdida del 7q debido a translocación no balanceada
Deleción 11q
Deleción 12p o pérdida del 12p debido a translocación no balanceada
Monosomía 13 o deleción 13q
Deleción 17p o pérdida del 17p debido a translocación no balanceada
Isocromosoma 17q
idic(X)(q13)
Mutaciones somáticas definitorias
<i>ASXL1</i>
<i>BCOR</i>
<i>EZH2</i>
<i>SF3B1</i>
<i>SRSF2</i>
<i>STAG2</i>
<i>U2AF1</i>
<i>ZRSR2</i>

A continuación, se resumen en una tabla los criterios de clasificación por diferenciación que se mencionan en la clasificación de la OMS 2022.

Tabla 3. Marcadores de diferenciación y criterios para los tipos de LMA definidos por diferenciación según la quinta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (4).

Tipo	Criterios de diagnóstico
LMA con mínima diferenciación	<p>Los blastos son negativos (<3%) para MPO y SBB por citoquímica</p> <p>Expresión de dos o más antígenos mieloides asociados, como CD13, CD33 y CD117</p>
LMA sin maduración	<p>≥3% de los blastos son positivos para MPO (por inmunofenotipo o citoquímica) o SBB y negativos para NSE mediante citoquímica</p> <p>Células maduras de linaje granulocítico constituyen <10% de las células nucleadas en médula ósea</p> <p>Expresión de dos o más antígenos mieloides asociados, como MPO, CD13, CD33 y CD117</p>
LMA con maduración	<p>≥3% de los blastos son positivos para MPO (por inmunofenotipo o citoquímica) o SBB mediante citoquímica</p> <p>Células maduras de linaje granulocítico constituyen ≥10% de las células nucleadas en médula ósea</p> <p>Células de linaje monocítico constituyen <20% de las células en médula ósea</p> <p>Expresión de dos o más antígenos mieloides asociados, como MPO, CD13, CD33 y CD117</p>
Leucemia basofílica aguda	<p>Blastos y basófilos inmaduros/maduros con metacromasia en la tinción azul de toluidina</p> <p>Blastos son negativos para MPO, SBB y NSE por citoquímica</p> <p>No expresión fuerte de CD117 equivalente (para excluir leucemia de mastocitos)</p>
Leucemia mielomonocítica aguda	<p>≥20% monocitos y sus precursores</p> <p>≥20% granulocitos maduros</p> <p>≥3% de blastos positivos por mieloperoxidasa (por inmunofenotipo o citoquímica)</p>
Leucemia monocítica aguda	<p>≥80% monocitos y/o sus precursores (monoblastos y/o promonocitos)</p> <p><20% granulocitos maduros</p>

	Blastos y promonocitos expresan al menos dos tipos de marcadores monocitoides incluyendo CD11c, CD14, CD36 y CD64, o NSE positiva por citoquímica
Leucemia eritroide aguda	≥30% células eritroides inmaduras (proeritroblastos) Predominio eritroide en médula ósea, usualmente ≥80% de la celularidad
Leucemia megacarioblástica aguda	Blastos expresan al menos una o más glicoproteínas plaquetarias: CD41 (GPIIb), CD61 (GPIIIa), o CD42b (GPIb)

MPO: Mieloperoxidasa; SBB: Negro Sudán; NSE: Esterasa no específica

El estudio de diferentes mutaciones identificadas en pacientes con LMA, ha contribuido a la comprensión, aunque no del todo, de estos genes críticos en la hematopoyesis. A continuación, se hablará con más detalle de algunas de las anormalidades genéticas definidas de la clasificación de la OMS 2022.

Fusión *PML::RARA*: La t(15;17)(q24;q21) es característica de la leucemia promielocítica aguda, se trata de la fusión del gen *PML*, un factor de transcripción y supresor de tumores que regula la progresión del ciclo celular e induce la muerte celular y el *RARA*, un receptor nuclear de ácido retinoico α que une elementos de respuesta al ácido retinoico en promotores de muchos genes, dando como resultado el gen de fusión *PML::RARA*. Normalmente *RARA* se une al receptor de retinoide X para formar un heterodímero, el cual actúa como un represor transcripcional que recluta el complejo correpressor nuclear histona desacetilasa, por lo tanto, facilita el ensamblaje de nucleosomas y silencia varios promotores. La unión de su ligando, el ácido retinoico, causa un cambio conformacional que resulta en la activación transcripcional de genes necesarios para la diferenciación de promielocitos *PML::RARA* reprime promotores blanco de la cadena de señalización de la misma manera que *RARA* cuando no está unido a su ligando. Sin embargo, a diferencia de la variante salvaje, requiere mayor concentración de ligando para eliminar la represión porque mantiene una interacción más estable con el complejo correpressor y algunas metilasas como *DNMT1* y *DNMT3A*. Esta fusión también tiene efectos importantes sobre la apoptosis porque interfiere de manera negativa con la función del *PML* salvaje y su regulación de p53. Los defectos en la apoptosis permiten la activación de oncogenes y la persistencia de la inestabilidad genómica (7).

Fusión *RUNX1::RUNX1T1*: Esta fusión es el producto de la t(8;21)(q22;q22), y las proteínas resultantes están involucradas en la familia de factores de unión central (CBF), que se requieren en la ontogenia hematopoyética y son reguladores clave en diferentes pasos de la hematopoyesis. La familia CBF consta de tres subunidades CBFA de unión al ADN (*RUNX1*, *RUNX2*, *RUNX3*) y una subunidad común que no interactúa con el ADN, pero aumenta la afinidad de las otras subunidades por este. Los mecanismos por los cuales este gen de fusión contribuye a la patogénesis de la leucemia no se comprenden completamente, tienen una actividad inhibitoria dominante sobre los genes diana del complejo CBF salvaje mediante el reclutamiento del complejo nuclear correpressor (7).

Fusión *CBFB::MYH11*: La inv(16)(p13q22) es la responsable de la fusión *CBFB::MYH11* y al igual que la fusión *RUNX1::RUNX1T1*, las proteínas que genera están involucradas en la familia CBF (7). El gen *MYH11* codifica por la cadena pesada de miosina de músculo liso. El resultado de este transcrito de fusión pertenece a la categoría de riesgo favorable, sin embargo, aunque la mayoría de los pacientes logran la remisión morfológica completa después de la inducción, aproximadamente el 30% de los casos finalmente tienen recaídas. El gen quimérico *CBFB::MYH11* está presente en el 8% de los adultos con LMA de novo (12).

Fusión *DEK::NUP214*: La t(6;9)(p23;q34), con el gen de fusión *DEK::NUP214*, está relacionada con leucemias con o sin características monocíticas y a menudo se asocia con basofilia y displasia multilineaje. *DEK::NUP214*, codifica por una proteína nucleoporina que actúa como factor de transcripción aberrante y altera el transporte nuclear para unirse con factores solubles (7).

Fusión *RBM15::MRTFA*: El factor de transcripción relacionado con la miocardina A (*MRTFA*), está expresado en la mayoría de las células. Fue identificado por primera vez como un miembro del producto de la fusión resultante de la translocación cromosómica recurrente t(1;22)(p13;q13), encontrada únicamente en leucemia megacarioblástica aguda pediátrica. Su función principal se basa en su capacidad para coactivar el factor de transcripción del factor de respuesta al suero (SRF) y así inducir la transcripción de genes que afectan la migración celular, adhesión y estructura. Por medio de la adhesión a SRF, *MRTFA* sirve como regulador clave no solo de la diferenciación hematopoyética sino

también de la maduración muscular y de miofibroblastos. El gen *RBM15* codifica por una proteína nuclear con tres sitios de reconocimiento de ARN (RRM) y un dominio C-terminal parálogo y ortólogo de Spen. La actividad de METTL3, la enzima responsable de metilar adeninas para la modificación del ARN de adenina N6-metilada, requiere la presencia de *RBM15*. La función principal de *RBM15* es servir como un enlace entre los ARN que están unidos a sus dominios RRM y este complejo de metilación del ARN de adenina N6-metilada (13).

Fusión *BCR::ABL1*: El gen de fusión *BCR::ABL1*, también llamado cromosoma Filadelfia, es el resultado de la $t(9;22)(q34;q11)$, codifica una tirosin quinasa constitutivamente activa con propiedades oncogénicas. Es patognomónico para la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), también se encuentra ocasionalmente en la LLA B, principalmente en adultos y raramente en la LMA de novo. Menos del 1% de adultos recién diagnosticados con LMA tienen el cromosoma Filadelfia positivo, y cuando se encuentra una proliferación de blastos *BCR::ABL1* positivos en la presentación, la distinción entre la crisis blástica de LMC o LMA puede no ser tan clara (14).

Rearreglo *KMT2A*: El gen *KMT2A* está ubicado el cromosoma 11q23, codifica por una proteína grande y multidominio que contiene 3696 aminoácidos. Desempeña funciones cruciales durante el desarrollo embrionario temprano y la hematopoyesis al regular la expresión de genes del cluster Hox. Los rearreglos cromosómicos están asociados con aproximadamente el 75% de las leucemias agudas en lactantes y del 5 al 10% en niños y adultos. La presencia de estos rearreglos representa un factor pronóstico desfavorable, donde muy pocos reordenamientos confieren un resultado bueno o intermedio (15) . El término LMA con rearreglo *KMT2A* es el nuevo término que reemplaza a “LMA con $t(9;11)(p22;q23)$; *KMT2A-MLLT3*”. Se han descrito más de 80 parejas de fusión de *KMT2A* siendo las más comunes *MLLT3*, *AFDN*, *ELL* y *MLLT10*. Si bien no es necesaria, la identificación de la pareja de fusión es deseable ya que podría proporcionar información pronóstica y afectar el seguimiento de la enfermedad (4).

Rearreglo *MECOM*: El gen *MECOM* se ubica en el cromosoma 3 y se asocia con regulación en la proliferación y la diferenciación celular. La LMA con $inv(3)(q21q26)$ o $t(3;3)(q21;q26)$ es uno de los subgrupos con una respuesta muy pobre a la terapia y un curso muy agresivo. Las translocaciones e inversiones recurrentes en la LMA generan con

mayor frecuencia genes de fusión oncogénicos, pero en el caso de la *inv(3)* o *t(3;3)*, ambos reordenamientos causan la translocación de un potenciador del gen *GATA2*, ubicado en 3q21, al locus *MECOM* en el cromosoma 3q26. *MECOM* codifica para isoformas de transcritos MDS1-EVI1 y EVI1, que pueden transcribirse desde dos promotores distintos. En la LMA con *inv(3)* o *t(3;3)*, el potenciador oncogénico *GATA2* translocado provoca la sobreexpresión de EVI1, pero no de MDS1-EVI1 y simultáneamente se anula la expresión de *GATA2* del alelo reordenado. *GATA2* codifica por un factor de transcripción esencial para el desarrollo hematopoyético normal, esto sugiere que la pérdida de un alelo de *GATA2* aumenta la capacidad transformadora de EVI1 en LMA con reordenamientos del cromosoma 3q26 (16).

Rearreglo *NUP98*: El gen *NUP98* codifica para la proteína componente principal del complejo de poro nuclear que regula en transporte citoplasmático de proteínas y ARNm. Las proteínas de fusión de *NUP98* tienen propiedades oncogénicas, mientras que *NUP98* es un supresor tumoral potencial y regula la expresión postranscripcional de ciertos genes objetivo de TP53 (17). Las translocaciones que involucran la *NUP98* y más de 30 genes de fusión compañeros están bien caracterizadas por su relación en enfermedades hematológicas como la LMA y las NMD. Los compañeros de fusión se dividen en genes homeobox de clase I o clase II HOX, o no homeobox. Las fusiones de clase I HOX involucran aproximadamente 10 genes, entre ellos el *HOXA9*, mientras que los clase II HOX son menos frecuentes e incluyen el *HHEX*. Los genes compañeros no homeobox se asocian con la regulación epigenética e incluyen *NSD1*, *KDM5A* y *KMT2A* (18). Es importante tomar en cuenta que este rearreglo puede ser críptico en cariotipo convencionales (4).

Mutación *NPM1*: El gen de la nucleofosmina (*NPM1*) está ubicado en el cromosoma 5 y codifica para una proteína de 294 aminoácidos, la cual se traslada entre el núcleo, nucleolo y el citoplasma. La *NPM1* una chaperona con funciones como, el ensamblaje de proteínas ribosomales, la prevención y la agregación de proteínas nucleolares, control de la duplicación del centrosoma durante el ciclo celular y la regulación de los supresores de tumores. Se han identificado múltiples mutaciones de la *NPM1* en pacientes con LMA que consisten en deleciones cortas/inserciones de 4 a 10 pb, en las posiciones 956 a 971 del exón 12 del gen. Estas mutaciones conducen a un cambio en el marco de lectura, produciendo proteínas que varían en la porción C terminal. La mutación A es la más

frecuente y consiste en una duplicación TCTG en la posición 956 a 959 (2) (19). La LMA con mutación *NPM1* se puede diagnosticar independientemente del recuento de blastos (requiere una correcta correlación clínico-patológica) (4).

Mutación *CEBPA*: El gen *CEBPA* codifica para un factor de transcripción alfa de unión al enhancer CCAAT, que pertenece a la familia de los cierres de leucina. Tiene un papel importante en la diferenciación de los granulocitos, y juega un papel crítico en la regulación del metabolismo de la glucosa. Este gen se ubica en el cromosoma 19 y contiene dos dominios de transactivación en el extremo N terminal y una región de cierre de leucina básico en el extremo C terminal. Las mutaciones de *CEBPA* son una de las más frecuentes en pacientes con LMA. Las mutaciones pueden ocurrir en todo el gen, sin embargo, se agrupan principalmente en dos hotspots, inserciones/deleciones por desplazamiento de marco N-terminal y/o inserciones/deleciones por desplazamiento de marco en el extremo C-terminal (20) La definición de LMA con mutación *CEBPA* ha cambiado para incluir mutaciones bialélicas (*biCEBPA*), así como mutaciones únicas ubicadas en la región de los cierres de leucina (bZIP) del gen (*smbZIP-CEBPA*). El pronóstico favorable asociado con *smbZIP-CEBPA* se ha demostrado en cohortes de niños y adultos de hasta 70 años. Es importante destacar que el umbral de blastos requerido para el diagnóstico de LMA sigue siendo 20% debido a la insuficiente evidencia que justifique reducir este umbral mínimo de blastos (4).

En el año 2022, además de la publicación de la clasificación de la OMS, casi simultáneamente se publicó la Clasificación de Consenso Internacional (ICC), de neoplasias mieloides y leucemias agudas. Esta colaboración se basó principalmente en los aportes de comités de asesores clínicos, compuestos por patólogos, hematólogos, oncólogos, genetistas y bioinformáticos de todo el mundo. Se utilizó un enfoque multiparamétrico, el objetivo principal del proceso de consenso fue la definición de entidades de la enfermedad, incluida la introducción de nuevas entidades y criterios refinados para las categorías de diagnóstico (21).

Algunos de los cambios observados en la clasificación del ICC, es el reconocimiento como entidad separada a la LMA con *TP53* mutado, la cual se asocia con cariotipos complejos y con respuesta pobre, independientemente si es de novo, posterior a NMD o secundaria a tratamiento. También se amplían las entidades con <20% de blastos como se

muestra en la Tabla 4. A diferencia de la clasificación de la OMS, la ICC mantiene la categoría de LMA NOS, esta categoría carece de importancia pronóstica reconocida (21).

Tabla 4. Clasificación de LMA con porcentaje de blastos requerido para el diagnóstico según la ICC, 2022 (21).

Leucemia promielocítica aguda (LPA) con t(15;17)(q24.1;q21.2) / <i>PML::RARA</i> ≥10%
Leucemia promielocítica aguda con otros rearrreglos de <i>RARA</i> ≥10%
LMA con t(8;21)(q22;q22.1) / <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ≥10%
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB::MYH11</i> ≥10%
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3) / <i>MLLT3::KMT2A</i> ≥10%
LMA con otros rearrreglos de <i>KMT2A</i> ≥10%
LMA con t(6;9)(p22.3;q34.1) / <i>DEK::NUP214</i> ≥10%
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) / <i>GATA2;MECOM (EVI1)</i> ≥10%
LMA con otros rearrreglos de <i>MECOM</i> ≥10%
LMA con otras translocaciones recurrentes raras ≥10%
LMA con t(9;22)(q34.1;q11.2) / <i>BCR::ABL1</i> ≥20%
LMA con mutación <i>NPM1</i> ≥10%
LMA con mutaciones in frame <i>bZIP CEBPA</i> ≥10%
LMA y LMA/NMD con <i>TP53</i> mutado 10-19% (NMD/LMA) y ≥20% (LMA)
LMA y NMD/LMA con mutaciones relacionadas a mielodisplasia 10-19% (NMD/LMA) y ≥20% (LMA)
Definida por mutaciones en <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> o <i>ZRSR2</i>
LMA con anomalías citogenéticas relacionadas a mielodisplasia 10-19% (NMD/LMA) y ≥20% (LMA)
Definida por la detección de cariotipos complejos (≥3 anomalías cromosomales clonales no relacionadas en ausencia de otra clase de anomalías genéticas recurrentes definidas) del(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) o del(17p), del(20q), y/o idic(X)(q13) anomalías clonales
LMA sin otra especificación (NOS) 10-19% (NMD/LMA) y ≥20% (LMA)
Sarcoma mielóide

2.1.7 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico y la evaluación de la LMA se basa en la evaluación morfológica, inmunofenotipo por citometría de flujo, evaluación de cariotipo y estudios moleculares (2).

Citomorfolología: Los primeros esfuerzos por crear una clasificación de la LMA se basaron únicamente en características citomorfológicas y citoquímicas. Años después y con los avances tecnológicos en diagnóstico de leucemias agudas la citomorfolología sigue siendo un punto de partida indispensable en el diagnóstico. Las anormalidades en la morfología celular pueden ser identificadas por personal de hematología capacitado y de esta manera hacer la distinción entre células normales de las aberrantes. Además, el porcentaje y la distribución relativa de la eritropoyesis, granulopoyesis y monocitopoyesis, identifican una variedad de trastornos hematológicos. Una biopsia de médula ósea proporciona información complementaria sobre las células en el contexto del tejido (sobre celularidad e histología, así como la proporción y maduración de las células hematopoyéticas). En casos de LMA con médula grasa o con fibrosis, el recuento de blastos sólo puede evaluarse de forma fiable mediante la biopsia de médula ósea (22).

El porcentaje de blastos se determina mejor con un diferencial de 500 células en el aspirado de médula ósea. Existe una gran variedad morfológica de los blastos en la LMA, y en algunos de ellos es posible observar los cuerpos de Auer. Los cuerpos de Auer son filamentos similares a varillas de gránulos primarios, son encontrados en un 30-50% de los pacientes recién diagnosticados con LMA y si están presentes son una de las características morfológicas distintivas para establecer un diagnóstico de LMA (2).

Inmunohistoquímica: El uso de la inmunohistoquímica para asignar linaje ha sido reemplazado en gran medida por la evaluación del inmunofenotipo por citometría de flujo. Sin embargo, cuando está disponible la reacción de mieloperoxidasa puede hacer rápidamente la distinción entre LMA y LLA. La reacción detecta la enzima mieloperoxidasa en los gránulos primarios de mieloblastos y es específico del linaje mielóide (2).

Inmunofenotipado: El inmunofenotipo celular se define en función de la presencia y la fuerza de expresión de los antígenos, es indicativo de la identidad del linaje celular y del grado de maduración. La citometría de flujo es una herramienta crucial para la detección,

caracterización y cuantificación de las poblaciones de células sanas y malignas, y juega un papel muy importante en la clasificación y diagnóstico diferencial de las neoplasias hematológicas, además de servir como método de evaluación en la enfermedad medible residual (EMR). Los citómetros de flujo modernos permiten la inspección paralela de 8 a 10 marcadores. En términos generales se pueden clasificar de la siguiente manera (22):

1. Expresión de antígenos de linaje cruzado (expresión de marcadores linfoides en células de LMA como CD19+);
2. Expresión asincrónica de marcadores de maduración (expresión concomitante de CD34 y CD11b en LMA);
3. Ausencia o disminución de la expresión antigénica de marcadores típicos (por ejemplo, LMA HLA-DR negativo);
4. Sobreexpresión de antígenos (por ejemplo, CD33++, CD34++ LMA).

Citogenética: El análisis citogenético abarca las técnicas de análisis de cromosomas e hibridación fluorescente in situ (FISH). El análisis cromosómico se realiza mediante el análisis de bandas cromosómicas en metafase. Las células no malignas en general tienen un complemento normal (46, XX o 46, XY), mientras que el cariotipo de pacientes con leucemia podría mostrar alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales adquiridas. El FISH se basa en el uso de sondas fluorescentes que están dirigidas contra loci cromosómicos específicos. La técnica permite realizar el análisis con cromosomas tanto en interfase como en metafase. Las sondas se pueden utilizar para detectar aberraciones citogenéticas conocidas y/o sospechadas o, si se dirige contra centrómeros, para detectar alteraciones numéricas. El análisis de cromosomas permite una evaluación integral de todo el genoma y el FISH proporciona un enfoque rápido y específico. La relevancia de estos análisis según la clasificación de la OMS es crucial para establecer una estratificación pronóstica y como seguimiento de la cinética de la enfermedad, evaluación de la respuesta y caracterización de la evaluación clonal (22).

Biología molecular: La biología molecular se ha convertido en una herramienta indispensable y ha significado un importante avance en la comprensión del panorama molecular de cáncer. Ha contribuido en la clasificación, pronóstico y seguimiento de la LMA, además ha ayudado a la creación de terapias dirigidas y se utiliza cada vez más como herramienta para la toma de decisiones terapéuticas. La reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) permite la amplificación de secuencias diana conocidas, donde la principal ventaja es que la sensibilidad es muy alta (hasta 10^{-6}) (22). Además, un grupo importante de pacientes (aproximadamente un 45%) diagnosticado con LMA tiene un cariotipo normal. Con el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva, nuevas mutaciones asociadas con la leucemia mieloide aguda han sido identificadas. Algunos de los genes identificados incluyen *KIT*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *RAS*, *WT1*, *BAALC*, *ERG*, *MN1*, *DNMT*, *TET2*, *IDH*, *ASXL1*, *PTPN11* y *CBL*. De los genes mencionados se sabe que las mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPA* están asociados con la respuesta al tratamiento (7).

En el capítulo 2 será abordado el fundamento teórico y el uso de las técnicas citogenéticas y moleculares que se usan en el diagnóstico, estratificación de riesgo y seguimiento de la LMA.

2.1.8 ESTRATIFICACIÓN DE RIESGO EN LMA

En el año 2010 y 2017 se publicaron ediciones de European LeukemiaNet (ELN), para el diagnóstico y tratamiento de la LMA en adultos. Una de las mayores limitaciones con el modelo de pronóstico de ELN 2017, es que consideraba solo una mutación en la mayoría de los pacientes y dos mutaciones en una minoría de los demás. Este enfoque simplista no reconoce la interacción y acumulación de mutaciones en pacientes con LMA, que tienen en promedio tres mutaciones adquiridas (rango de 0-9) en el momento del diagnóstico (23). Con los avances en la comprensión de la LMA, entre ellos el conocimiento de la patogénesis molecular, se ha logrado a una actualización en la clasificación, el diagnóstico genómico, la evaluación de EMR y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, como los inhibidores de *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* y *BCL2*. Estos avances han motivado una actualización que incluye una clasificación de riesgo genético, criterios de respuesta revisados y recomendaciones de tratamiento. Los cambios más importantes realizados en la clasificación de riesgo se describen en la Tabla 5. La clasificación de riesgo definitiva en cada paciente tomo en cuenta múltiples factores como la edad, recuento de leucocitos al momento del diagnóstico, alteraciones genéticas identificadas, respuesta al tratamiento, invasión a sistema nervioso central, entre otros (24)

Los pacientes con LMA de riesgo favorable pueden ser reclasificados como de riesgo intermedio y viceversa, según la presencia o ausencia de EMR, respectivamente.

Por ejemplo, en pacientes con LMA con mutación *NPM1*. La relación alélica *FLT3-ITD* ya no se considera en la clasificación de riesgo, por ende, la LMA con *FLT3-ITD* (sin lesiones genéticas de riesgo adverso) ahora se clasifica en el grupo de riesgo intermedio, independientemente de la proporción alélica o la presencia concurrente de la mutación *NPM1*. El cambio se originó debido a cuestiones metodológicas con la estandarización del ensayo para medir la proporción alélica *FLT3-ITD*, además del impacto de la terapia basada en midostaurina en *FLT3-ITD* sin mutación *NPM1* y el papel cada vez mayor de la EMR en las decisiones de tratamiento (24).

Las mutaciones genéticas relacionadas con mielodisplasia ahora se clasifican en el grupo de riesgo adverso. Estas mutaciones, típicamente asociadas con la LMA después de una enfermedad hematológica previa, también son prevalentes en la LMA de novo e indican un riesgo adverso incluso en ausencia de anomalías citogenéticas relacionadas con la mielodisplasia. Las mutaciones relacionadas con mielodisplasia ahora incluyen variantes patológicas en al menos uno de los genes *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, y/o *ZRSR2* (24).

La presencia de anomalías citogenéticas de riesgo adverso en presencia de la mutación de *NPM1* ahora se considera de riesgo adverso. Estudios han demostrado que las mutaciones que afectan la región básica de la cremallera de la leucina de *CEBPA* confieren un resultado favorable, independientemente de su aparición como mutaciones bialélicas o monoalélicas y, por lo tanto, ahora se clasifican en el grupo de riesgo favorable.

Los cariotipos hiperploides con múltiples trisomías (o polisomías) ya no se consideran cariotipos complejos ni de riesgo adverso. A pesar del estudio de mutaciones en otros genes como *IDH1/IDH2* o *DNMT3A*, la evidencia actual aún no justifica su asignación a un grupo pronóstico distinto en la clasificación de ELN (24)

El sistema de clasificación de riesgo definidos por ELN, no pueden transferirse completamente a los pacientes pediátricos, debido a que las asociaciones de riesgo citogenético son diferentes según la edad (25).

Tabla 5. Clasificación de riesgo mediante genética al momento del diagnóstico según ELN, 2022 (24).

Categoría de riesgo	Anormalidad genética
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1) / <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22) / <i>CBFB::MYH11</i> Mutación <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i> Mutación in frame bZIP <i>CEBPA</i>
Intermedio	Mutación <i>NPM1</i> con <i>FLT3-ITD</i> Wild-type <i>NPM1</i> con <i>FLT3-ITD</i> (sin lesiones genéticas de riesgo adverso) t(9;11)(p21.3;q23.3) / <i>MLLT3::KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas o moleculares no clasificadas como favorables o adversas
Adverso	t(6;9)(p23.3;q34.1) / <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3) / rearrreglo <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2) / <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3) / <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2) / <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i> t(3q26.2;v) / rearrreglo <i>MECOM (EVI1)</i> -5 o del(5q); -7; -17 / abn(17p) Cariotipo complejo, cariotipo monosomal Mutaciones en <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> , y/o <i>ZRSR2</i> Mutación <i>TP53</i>

2.1.9 MONITOREO DE LA ENFERMEDAD MEDIBLE RESIDUAL (EMR)

La evaluación de la EMR en la LMA se utiliza para: 1) proporcionar una metodología cuantitativa para establecer un estado de remisión más profundo; 2) refinar la evaluación del riesgo de recaída postremisión; 3) identificar una recaída inminente para permitir una intervención temprana; y 4) como un punto final sustituto para acelerar las pruebas y la aprobación de medicamentos (24)

La medición de la EMR en remisión completa (RC) ahora forma parte del estándar de atención en LMA. La detección de una EMR positiva en el momento de la RC morfológica se asocia con una tasa de recaída más alta y con una peor supervivencia. La EMR ha sido comúnmente investigada utilizando dos metodologías: mediciones de EMR mediante citometría de flujo multicolor (CFM-EMR) y cuantificación molecular de EMR mediante PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR). La combinación de estudios de CFM y PCR en tiempo real puede mejorar la capacidad de predecir recaídas (26). A continuación, se describirá en la Tabla 6 características relevantes de estas dos metodologías para evaluar la EMR.

Tabla 6. Métodos para detección de EMR en LMA. Modificado de (Döhner et al., 2022) (24).

Método	Diana	Sensibilidad	Tiempo de respuesta (días)	Limitaciones
CFM	Inmunofenotipo asociado a la leucemia o diferente a lo normal	$10^{-3} - 10^{-4}$	2	Menos sensible, análisis más subjetivo
RT-qPCR	Datos robustos: <i>NMP1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Menos validados: <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1</i>	$10^{-4} - 10^{-5}$	3-5	Aplicabilidad limitada

En el año 2021 se publicó una actualización del grupo de trabajo de EMR del ELN. En esta actualización se evaluó la estandarización y armonización de la EMR. En esta publicación se dan las pautas para el análisis de EMR mediante CFM y RT-qPCR, proporcionando umbrales y detallando cómo se debe informar y combinar los resultados si se usan varias técnicas. Los resultados de EMR dependen directamente del umbral de la

técnica y un resultado negativo no necesariamente indica erradicación de la enfermedad, sino una enfermedad por debajo del umbral detectable de la técnica utilizada (27).

Se recomienda utilizar el fenotipo diagnóstico asociado a la leucemia y el inmunofenotipo diferente a lo normal para dar seguimiento a posibles clones de nuevas poblaciones emergentes. Para ello se deben incorporar los siguientes marcadores básicos: CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7 y HLA-DR. Para determinar la negatividad de CFM-EMR se debe hacer una adquisición de >500.000 células CD45 y ≥ 100 células en el compartimiento de blastos. La positividad de CFM-EMR se define como $\geq 0,1$ células que expresen CD45 con el inmunofenotipo diana. La positividad mediante RT-qPCR se define con un CT <40 y es negativa si el CT >40 en dos de tres repeticiones (27).

Además, Döhner y colaboradores, detallan los criterios de respuesta al tratamiento en la LMA mediante las siguientes categorías (24):

- Remisión completa (RC): Médula ósea con $<5\%$ de blastos; ausencia de blastos en circulación; ausencia de enfermedad extramedular; recuento absoluto de neutrófilos $\geq 1000/\mu\text{L}$; recuento plaquetario $\geq 100.000/\mu\text{L}$.
- Remisión completa con recuperación hematológica parcial (RCh): Se introdujo el término para pacientes con eliminación morfológica de blastos en la médula ósea y recuperación parcial tanto de neutrófilos $\geq 500/\mu\text{L}$, como de plaquetas $\geq 50.000/\mu\text{L}$. Hasta ahora este concepto se ha utilizado en el contexto de ensayos que utilizan terapias menos intensivas. Se recomienda que estudios futuros validen el papel de la RCh como medida sustituta de la supervivencia después de terapias intensivas y menos intensivas.
- Remisión completa con recuperación hematológica incompleta (RCi): Todos los criterios de RC, excepto por la presencia de neutropenia residual $<1000/\mu\text{L}$ o trombocitopenia $<100.000/\mu\text{L}$.
- Estado libre de leucemia morfológica (MLFS): Blastos en médula $<5\%$; ausencia de blastos en circulación; ausencia de enfermedad extramedular; no se requiere recuperación hematológica.
- Remisión parcial (RP): Todos los criterios de RC; disminución del porcentaje de blastos en médula ósea de 5% a 25% ; y disminución del porcentaje de blastos en médula ósea pretratamiento de al menos un 50% .

- No respuesta: Pacientes a los que se les evalúa la respuesta, pero no cumplen los criterios de RC, RCh, RCi, MLFS, RP, se les clasifica como que no tienen respuesta antes del punto de referencia. Los pacientes que no logran una respuesta en el punto de referencia asignado se clasifican como que tienen enfermedad refractaria.
- No evaluable para respuesta: Incluye a los pacientes que carecen de una adecuada evaluación previa de la respuesta de la médula ósea. Esta categoría incluye a pacientes con muerte prematura, retiro previo a la evaluación de respuesta, o médulas ósea técnicamente subóptimas que impida la evaluación.

2.1.10 TRATAMIENTO

La LMA ya no es considerada como una entidad única, sino como un conjunto de subentidades heterogéneas con características fisiopatológicas, clínicas diversas y con perfiles moleculares y citogenéticos que se pueden beneficiar de terapias selectivas (7). La evaluación inicial en pacientes recién diagnosticados debe priorizar la determinación de la aptitud del paciente para la quimioterapia de inducción y consolidación estándar. Las comorbilidades asociadas al paciente como enfermedades del corazón, riñón, pulmón o hígado, enfermedades mentales, un puntaje de desempeño del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (EGOG) de 3 y una edad mayor o igual a 75 años son los predictores más fuertes para la mortalidad relacionada con la inducción y deben ser considerados para determinar la elegibilidad de pacientes mayores de 60 años con LMA (28)

El objetivo del tratamiento es el control y, siempre que sea posible, la erradicación de la enfermedad. Este resultado se logra idealmente induciendo una remisión completa con la terapia inicial, seguida de esfuerzos de consolidación y/o mantenimiento para profundizar la remisión y maximizar la duración de la respuesta. Los resultados de los análisis genéticos deben estar disponibles tan rápido como sea posible, preferiblemente dentro de 3 a 5 días, para identificar blancos terapéuticamente accionables. Se recomienda un breve retraso en el inicio del tratamiento para estabilizar a los pacientes e identificar la mejor opción de tratamiento para optimizar el resultado clínico. Si hay hiperleucocitosis presente, se aconseja una citorreducción inmediata. Si un paciente no puede tolerar una opción de tratamiento intensiva o no intensiva activa, el propósito de la terapia es optimizar la calidad de vida y disminuir la incidencia de complicaciones relacionadas con la citopenia

mediante transfusiones y otras medidas de apoyo, así como la participación temprana de los servicios de cuidados paliativos según corresponda (24).

La clasificación de riesgo favorable, intermedio y adverso de la ELN, descrita previamente es esencial para guiar las decisiones clínicas y predecir el pronóstico (24). A los pacientes de riesgo favorable, se les predice un riesgo de recaída bajo, aunque sean tratados solo con quimioterapia de inducción y consolidación. Además, es importante considerar que todo los pacientes que no logran alcanzar la RC después de dos ciclos de inducción también deben considerarse como pacientes de alto riesgo, independientemente del resultado molecular y citogenético obtenido al momento del diagnóstico (28).

La estratificación de riesgo también desempeña un papel crítico en la selección del enfoque postremisión óptimo y de las indicaciones para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-HCT) en la primera RC (29). La presencia o ausencia de mutaciones específicas como *FLT3*, *IDH1*, *IDH2* son consideraciones importantes para determinar la elección adecuada del régimen. Los pacientes considerados aptos para terapia intensiva son tratados con regímenes de inducción comparativamente más agresivos que incluyen antraciclinas y citarabina. En contra parte, los pacientes que son considerados como no aptos para terapia intensiva son tratados con regímenes de menor intensidad que incorporan agentes hipometilantes con venetoclax o citarabina a dosis bajas (30).

Pacientes considerados aptos para terapia intensiva

El descubrimiento de la actividad anti-LMA de la citarabina y las antraciclinas en la década de 1970 llevó a una serie de ensayos aleatorizados que evaluaron diferentes dosis y esquemas de citarabina (5 versus 7 versus 10 días; 100 mg/m² versus 200 mg/m²) en combinación con antraciclinas, y la adición de otros agentes (etopósido, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, entre otros) a la terapia de inducción y mantenimiento. El régimen 3+7 se refiere a 3 días de antraciclinas (daunorrubicina 30-60 mg/m² intravenosa diariamente durante 3 días; idarrubicina 12 mg/m² intravenosa diariamente durante 3 días) y citarabina (100-200 mg/m² intravenosa como infusión continua diaria durante 7 días). Las estrategias de consolidación han investigado múltiples cursos de quimioterapia con citarabina y antraciclinas, así como citarabina de alta dosis. Un estudio aleatorizado realizado por Meyer

y el estudio CALGB reportó una supervivencia significativamente superior utilizando terapia de consolidación con citarabina de alta dosis (3 g/m² intravenosa durante 2-3 horas cada 12 horas los días 1, 3 y 5) durante cuatro cursos, en comparación con esquemas de dosis más bajas de citarabina (26).

Algunas de las mejoras a los regímenes de inducción-consolidación 3+7 en terapia de primera línea incluyen (26):

1. El uso de combinaciones de citarabina de alta dosis durante la inducción.
2. Optimización de la dosis de daunorrubicina (60 mg/m² diarios x 3, versus 45 mg/m² o 90 mg/m² diarios x 3) y el uso de otras antraciclinas (idarrubicina, mitoxantrona).
3. La adición de análogos de nucleósido de adenosina (fludarabina, clofarabina, cladribina) a los regímenes de citarabina-antraciclinas.
4. La adición de anticuerpo monoclonal dirigido contra CD33 (Gemtuzumab ozogamycin).
5. La adición de terapias dirigidas como inhibidores de *FLT3* e *IDH* en pacientes apropiados.
6. La adición del inhibidor de BCL-2, venetoclax, a la terapia de inducción en ensayos clínicos.
7. El uso de terapia de mantenimiento con azacitidina oral.

Después de alcanzar la RC (o RCh/RCi), idealmente se consolida a los pacientes con regímenes que incluyen citarabina a dosis intermedia. La administración consecutiva en los días 1 al 3, en lugar de días alternos (día 1,3 y 5), puede acelerar la recuperación del recuento sanguíneo. Aunque la citarabina a alta dosis (3000 mg/m²) todavía se utiliza en algunos centros, su mayor toxicidad y falta de mejora en la supervivencia son aspectos que se argumentan en contra de su uso continuado. Además, se debe tomar en cuenta los factores de riesgo al momento del diagnóstico y la evaluación de la EMR en la RC (o RCh/RCi) para pacientes con riesgo no adverso en primera remisión, con el fin de informar la elección del tratamiento de consolidación. Para pacientes con riesgo estimado de recaída que sea mayor al 35-40%, el trasplante alogénico de células madre sigue siendo la terapia de elección después de la remisión. Esto incluye a pacientes con LMA de riesgo adverso o enfermedad de riesgo no adverso con persistencia de EMR. En el subconjunto de pacientes

que reciben inducción con inhibidores de *FLT3*, CPX-351 o Gemtuzumab ozogamycin, estos agentes pueden ser incorporados a la terapia de consolidación (24).

No existe una definición generalmente aceptada de "terapia de mantenimiento". La FDA define la terapia de mantenimiento para LMA como un curso extendido pero limitado en el tiempo de tratamiento, generalmente menos tóxico, administrado después de alcanzar la RC con el objetivo de reducir el riesgo de recaída. Por lo tanto, un ensayo diseñado para demostrar la eficacia de la terapia de mantenimiento debería incluir un tratamiento de inducción y consolidación especificado seguido de una aleatorización a una duración predefinida de tratamiento (24). La terapia de mantenimiento es un enfoque positivo en muchos cánceres, incluyendo la LLA. Sin embargo, los estudios en LMA no pudieron confirmar un beneficio claro de la terapia de mantenimiento, hasta los recientes resultados positivos reportados con azacitidina oral (26).

En el ensayo multicéntrico internacional, QUAZAR AML-001, se aleatorizó a 472 pacientes de 55 años o más (media de edad 68 años) con LMA en primera RC durante <4 meses a azacitidina oral (300 mg orales diarios x 14 días todos los meses) (n=238), o placebo (n=234). La supervivencia media fue 24.7 meses versus 14.8 meses con el placebo. La FDA aprobó la azacitidina oral como terapia de mantenimiento para LMA en septiembre del 2020 (26). Un segundo estudio (HOVON97) aleatorizó a 116 pacientes de 60 años o más con LMA que estaban en RC después de dos cursos de quimioterapia intensiva a azacitidina 50 mg/m² subcutánea diariamente x 5 cada mes durante cursos (n=56) versus observación (n=60). La supervivencia libre de enfermedad a 12 meses fue del 64% con azacitidina versus 42% con observación (26).

En el contexto post-trasplante de células madre alogénico, la terapia de mantenimiento también ha sido beneficiosa. Buchert y colaboradores, informaron sobre 83 pacientes (mediana de edad 54 años) con LMA *FLT3-ITD* post-trasplante de células madre alogénico que fueron aleatorizados a sorafenib 200-400 mg dos veces al día durante dos años versus placebo. La tasa de supervivencia libre de progresión a 2 años fue del 85% con sorafenib versus el 53% con placebo, la supervivencia también fue mejor con sorafenib (26).

Pacientes no considerados candidatos para terapia intensiva

Se ha logrado un progreso sustancial en el manejo de pacientes no considerados aptos para terapia intensiva. En comparación con la azacitidina sola, la adición del inhibidor de BCL-2, venetoclax, mejoró la respuesta clínica (RC/RCi, 66.4% versus 28.3%) y la supervivencia media (14.7 versus 9.6 meses), estableciendo un nuevo estándar de cuidado para pacientes mayores o no aptos para terapia intensiva. Para pacientes que no pueden recibir agentes hipometilantes, la citarabina a baja dosis en combinación con venetoclax representa una opción de tratamiento alternativa. Los pacientes con LMA con mutación en *IDH1/IDH2* que se consideran demasiado frágiles para tolerar el tratamiento basado en agentes hipometilantes pueden recibir cuidados de apoyo óptimos o monoterapia con inhibidores dirigidos de *IDH1/IDH2* (24).

En ausencia de intolerancia al tratamiento, los enfoques de tratamiento no intensivo generalmente se han continuado hasta la progresión de la enfermedad, pero hasta ahora no hay datos que respalden la ventaja de un enfoque de duración abierta sobre la terapia durante un período limitado (24).

Tratamiento en Leucemia Promielocítica Aguda

Representa del 5-10% de las LMA y se define por la anomalía citogenética t(15;17), que da como resultado el oncogén de fusión *PML-RARA* y su oncoproteína *PML-RARA*, que provoca un bloqueo de maduración y el cuadro clínico de la LPA. En un inicio se establecieron combinaciones de antraciclinas y citarabina como tratamiento, con una tasa de curación del 30-40%. La mortalidad temprana a causa de coagulación intravascular diseminada (CID) y sangrado fueron significativos, alrededor del 10-20% (26). Actualmente tiene un régimen terapéutico que se pueden esquematizar en tres opciones propuestas (7):

1. Tratamiento convencional con ácido transretinoico (ATRA) y quimioterapia.
2. Tratamiento con ATRA y quimioterapia, reforzado con trióxido de arsénico (ATO).
3. Tratamiento con ATRA y ATO sin uso o con mínimo uso de quimioterapia.

Algunas de las consideraciones importantes en el manejo de pacientes con LPA son: 1) no deben usarse nunca factores de crecimiento de colonias granulocíticas como el filgrastim o pegfilgrastim, debido a que estos factores pueden inducir un aumento drástico

en la progresión de la LPA y desencadenar una CID fatal; 2) estar atento a la sobrecarga de líquidos, que se encuentra relacionado con el ATRA y el ATO, así como con el uso de transfusiones sanguíneas de plasma fresco congelado en volumen elevado para prevenir la complicación de una CID. Esta complicación se puede manejar suspendiendo brevemente la terapia con ATRA y con diuresis agresiva; 3) El desarrollo de un síndrome de diferenciación con posible fallo multiorgánico. Para prevenirlo se utilizan esteroides profilácticos durante la inducción; 4) Una complicación rara en pacientes con LPA es el sangrado en SNC al momento del diagnóstico, a estos pacientes se les debe administrar dos inyecciones intratecales de citarabina para eliminar la complicación (26).

Terapias dirigidas

La comprensión más profunda de la biología de la LMA ha llevado a la identificación de vías desreguladas que impulsan la proliferación de blastos. A su vez, estos descubrimientos han llevado al desarrollo de agentes específicos que atacan estas vías moleculares y han revolucionado el cuidado de los pacientes con LMA (30). Terapias como el venetoclax, inhibidores de *FLT3* (gilteritinib) e inhibidores de *IDH* (enasidenib, ivosidenib) fueron aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y se utilizan como estándares de atención, ya sea en las indicaciones aprobadas por la FDA o en terapias de modalidad combinada que potencian sus beneficios clínicos (26).

- **Inhibidores de *BCL2* (venetoclax):** Las proteínas de la familia BCL2 desempeñan un papel importante en la respuesta apoptótica mitocondrial intrínseca. Se ha documentado que los blastos de la LMA tienen un aumento en la expresión de las proteínas de la familia BCL2 y que dependen de esta proteína para su supervivencia. La alta expresión de BCL2 se ha asociado con una respuesta inferior a la quimioterapia y una supervivencia deficiente en los pacientes con LMA. El venetoclax es un inhibidor selectivo de moléculas pequeñas de BCL2, y en estudios preclínicos demostró inducir apoptosis en células malignas que dependen de BCL2 para su supervivencia (31). Para pacientes considerados no aptos para terapia intensiva, se ha logrado un progreso sustancial utilizando venetoclax con azacitidina, en comparación con la azacitidina sola, la combinación con el venetoclax mejoró las tasas de RC/RCi (66,4% vrs 28.3%) y la mediana de supervivencia global (14.7 vrs 9.6 meses) (31).

- **Agentes hipometilantes (azacitidina, decitabina):** Los agentes hipometilantes inducen hipometilación global y potencialmente afecta el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis, la señalización celular, angiogénesis y el control de la invasión y metástasis de células cancerosas (32). La azacitidina ha demostrado eficacia en combinación con el venetoclax en el tratamiento de la LMA de novo, en pacientes en recaída y en pacientes no aptos para terapia intensiva. Puede ser necesario reducir la dosis si se desarrolla supresión clínicamente significativa de la médula ósea, y en caso de riesgo de síndrome de lisis tumoral, puede ser necesaria la administración profiláctica de fármacos reductores de ácido úrico con un estrecho monitoreo electrolítico (30).
- **Inhibidores de isocitrato deshidrogenasa (IDH1 e IDH2) (ivosidenib, enasidenib):** La IDH1 e IDH2 son enzimas metabólicas expresadas de manera ubicua, ubicadas predominantemente en el citoplasma y las mitocondrias. Son mediadoras en el ciclo del ácido tricarboxílico, catalizando la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato (33) (34). En este proceso también se genera NADPH, un agente reductor crucial con funciones protectoras contra el daño oxidativo. Las mutaciones en IDH1 e IDH2 están presentes en el 6-10% y 9-13% de los pacientes con LMA respectivamente (35). Las enzimas IDH1 e IDH2 mutadas convierten el α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, utilizando el NADPH como cofactor. El metabolito 2-hidroxiglutarato inhibe enzimas reguladoras del estado epigenético del ADN, como las desmetilasas de histonas y ADN, lo que resulta en hipermetilación del ADN, diferenciación celular defectuosa y posterior leucemogénesis (34). El ivosidenib es un inhibidor oral, fue aprobado por la FDA en el 2019, para el tratamiento de la LMA recurrente/refractaria con mutación del IDH1 (35). El enasidenib es un inhibidor oral específico de la IDH2 mutante, fue aprobado por la FDA en el 2017, como tratamiento de la LMA recurrente/refractaria. Ambos fármacos fueron probados en ensayos clínicos como monoterapia mostrando respuestas clínicas prolongadas, además también se probó en combinación de la azacitidina mostrando respuestas favorables (35).

- **Inhibidores de FLT3 (midostaurina, sorafenib, gilteritinib, quizartinib):** Las mutaciones oncogénicas *FLT3-ITD* y *FLT3-TKD* son comunes en la LMA, con frecuencias de 25% y 10% respectivamente. La midostaurina y el sorafenib son inhibidores de *FLT3* de primera generación que funcionan de manera relativamente no selectiva contra el *FLT3*, y aunque la midostaurina ha sido aprobada como terapia de primera línea, ambos tienen poca actividad como monoterapia en pacientes con recaídas. La adición de la midostaurina en pacientes con *FLT3* mutado con daunorrubicina-citarabina y a la consolidación con citarabina en altas dosis mejoró la supervivencia global a 4 años en un 7,1% de los pacientes. El valor como terapia de mantenimiento es incierto. Los inhibidores de próxima generación, como gilteritinib y quizartinib han demostrado actividad antileucémica única, el gilteritinib está aprobado por la FDA para LMA con *FLT3* mutado refractaria/recaída. El ensayo ADMIRAL comparó los resultados en pacientes con LMA con *FLT3* mutado r/r que recibieron gilteritinib o quimioterapia de rescate estándar, y la administración de gilteritinib resultó en una supervivencia significativamente más larga que la quimioterapia (9.3 versus 5.6 meses), así como un alto porcentaje de pacientes con remisión completa en comparación con la quimioterapia de rescate (21.1% versus 10.5%) (30).

Trasplante de células madre alogénico y autólogo

Un metaanálisis que combina datos de múltiples ensayos aleatorizados demostró el beneficio significativo, en promedio, del trasplante de células madre (SCT) alogénico en primera RC. La validez del SCT alogénico en la primera RC de LMA fue difícil de confirmar en ensayos aleatorizados anteriores debido al número limitado de pacientes en cada estudio, además muchos pacientes asignados al SCT alogénico no pudieron someterse al procedimiento (por infecciones, disfunción orgánica, morbilidades relacionadas con la quimioterapia, recaída, entre otros). Un estudio del Medical Research Council, reportó que los beneficios de la quimioterapia versus el SCT alogénico en primera RC fueron similares cuando se consideró el beneficio del SCT alogénico en segunda RC (26).

El SCT alogénico es un estándar de cuidado aceptado en primera RC, y se basa en varios factores del paciente, la LMA y el tratamiento asociado, por ejemplo, la presencia de un cariotipo adverso de LMA o mutación *FLT3* en el diagnóstico, EMR persistente en RC,

riesgo bajo de mortalidad asociada al SCT según la edad del paciente y comorbilidades, disponibilidad de donantes y grado de compatibilidad (26). Con la aprobación de la FDA y la disponibilidad de venetoclax e inhibidores de FLT3 e IDH, el papel de SCT alogénico en primera RC debe ser evaluado continuamente. El SCT alogénico no debe considerarse como un procedimiento independiente, sino como parte de la estrategia total de quimioterapia, terapia dirigida y SCT. Las investigaciones sobre la estrategia de mantenimiento posterior al SCT alogénico para reducir el riesgo de recaída deben incorporarse (26).

La indicación más frecuente para SCT alogénico, es la LMA. La posibilidad de contar con donantes no emparentados parcialmente compatibles, sangre de cordón umbilical y familiares haploidénticos, hace posible en la mayoría de los pacientes encontrar un donante. Centros experimentados han implementado regímenes no mieloablativos y de acondicionamiento de intensidad reducida para que sea posible realizar SCT alogénico en pacientes de hasta 80 años. La prevención de infecciones y de enfermedad de injerto contra huésped hace que los resultados después del trasplante mejoren, dejando la recurrencia de la enfermedad como la causa principal del fallo del tratamiento. Una minoría de los pacientes para los que está indicado el trasplante se someten al procedimiento (24).

El SCT autólogo ha sido en gran parte abandonado en los Estados Unidos debido a la falta de beneficios definitivos. Los expertos europeos en LMA aún abogan por su papel en la primera RC basados en ensayos aleatorizados que muestran que el SCT autólogo proporciona resultados equivalentes a múltiples consolidaciones de quimioterapia (generalmente menos de 4). Con el conocimiento del Medical Research Council en RC, es posible que los estudios históricos hayan reinfundido médulas autólogas con carga significativa de LMA persistente, aumentando así las tasas de recaída. Esto puede haber anulado el beneficio potencial de este enfoque. Estudios futuros pueden evaluar nuevamente el beneficio del SCT autólogo utilizando médulas recolectadas negativas para EMR (26).

CAPÍTULO 3

3.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS CITOGÉNÉTICOS

La citogenética es el estudio de los cromosomas en número y estructura. A finales del siglo XIX se dieron los primeros pasos en la citogenética humana con la publicación de Flemming en 1882, de las primeras ilustraciones de un cromosoma humano a partir de observaciones mediante microscopía; posteriormente Waldeyer introdujo el término cromosoma. A partir de este momento surgieron preguntas en torno a los cromosomas humanos, cuestionando el número total de cromosomas y si existían variantes en el número según etnia, sexo, y otros factores (36).

En el año 1956, se determinó el número de cromosomas $2n=46$, en el cariotipo humano (37) (38). Número que fue confirmado en años posteriores. Los cromosomas mitóticos exhibían características morfológicas claras, como la longitud de los brazos, de acuerdo a esto los ubicaron inicialmente en siete grupos. Patau, propuso en 1960 que los siete grupos fueran nombrados con letras de la A-G. Los cromosomas fueron organizados en 23 pares, este criterio fue aceptado en la conferencia de Londres y en la reunión de Chicago (36)

En la década de 1950, Sajiro Makino, Albert Levan y George Klein, demostraron que algunas líneas celulares cancerígenas tenían números de cromosomas variables y que tendían a ser mitóticamente inestables (36). Sin embargo, fue hasta la descripción del cromosoma Filadelfia, por Novell y Hungerford (39), que una anomalía genética demostró estar consistentemente asociada con cáncer en este caso con la LMC. La descripción del cromosoma Filadelfia marcó el inicio de una nueva era en la citogenética del cáncer (40).

Los investigadores de la época determinaron que era fundamental obtener cromosomas individuales para poder analizarlos a profundidad, lo cual motivó la mejora en las técnicas que se utilizaban. Entre los reactivos que se implementaron se pueden mencionar: la solución hipotónica para obtener una mejor diseminación de los cromosomas, el descubrimiento de la capacidad de la fitohemaglutinina para estimular la división de los glóbulos blancos; y el efecto de la colchicina como agente capaz de inducir el arresto de células en división. Sin embargo, la introducción de las técnicas de bandeo por Caspersson

y colaboradores, fue de los aportes más importantes a la técnica, debido a que permitió una adecuada identificación de los cromosomas normales y de rearrreglos cromosómicos (36).

Las primeras pruebas de la base genética de la LMA comenzaron con el análisis citogenético donde se puede identificar cambios a nivel cromosómico como translocaciones, deleciones, inserciones, inversiones, monosomías, trisomías, poliploidías y otras aberraciones. Generalmente se detectan una o más anomalías citogenéticas en aproximadamente el 55% de los pacientes con LMA, debido a esto confiere un fuerte factor pronóstico dentro de la clasificación de la OMS (7). Por lo tanto, el análisis citogenético convencional se considera obligatorio para todas las leucemias recién diagnosticadas, debido a su utilidad en el diagnóstico, clasificación y pronóstico (40). Las técnicas citogenéticas clásicas son operacionalmente complejas, costosas y requieren de personal calificado no sólo para cultivar las muestras sino también para analizar las células en metafase que presentan anomalías complejas (41).

3.1.1 TÉCNICAS DE BANDEO CROMOSÓMICO

El objetivo de las técnicas de bandeo cromosómico es hacer un análisis adecuado de los cromosomas, individualizándolos y permitir identificarlos adecuadamente. Se han descrito las bandas G, bandas R, bandas C, bandas T y las bandas Nor; las más utilizadas por sus características son las bandas G y las bandas R (36).

- **Bandas Q:** Fue la primera técnica de bandeo que se describió, cuando la individualización de los cromosomas era aún imposible. Se basó en el conocimiento de teñir componentes nucleares mediante métodos fluorescentes, uniendo fluorocromos con agentes alquilantes, debido a que solo el fluorocromo generaba una tinción homogénea sobre los cromosomas. Los segmentos ricos en A-T se visualizaban fluorescentes, y los segmentos ricos en C-G opacos (36). El método no se usó de forma generalizada debido a que las preparaciones teñidas con quinacrina no eran permanentes ya que la fluorescencia tiende a desvanecerse rápidamente y una vez que eran expuestos a la luz ultravioleta no podían usarse nuevamente debido a la degradación del fluorocromo (42).
- **Bandas G:** También denominadas bandas GTG, se producen al someter las láminas a la acción proteolítica de la tripsina. Se tiñen oscuro las regiones ricas en A-T,

zonas que son transcripcionalmente inactivas, pobres en genes y en secuencias *Alu*, pero ricas en secuencias *Line*, de replicación tardía (36). El uso de las bandas G se popularizó porque tiene la ventaja de no necesitar microscopio de fluorescencia que es más complejo y costoso (42).

- Bandas R: Con estas bandas se obtiene un patrón inverso a la de las bandas G. Son ricas en GC, en genes y en secuencias *Alu*, pobres en secuencias *Line*, son zonas de replicación temprana y se producen al someter las preparaciones en solución salina a altas temperaturas y coloreadas con Giemsa (36).
- Bandas C: Detectan regiones heterocromáticas. Utiliza hidróxido de sodio con el objetivo de desnaturalizar las proteínas y permitir que el colorante se adhiera mejor a los cromosomas y de esta manera diferenciar mejor las bandas. Se incuban los cromosomas en una solución salina, posteriormente se tiñen con Giemsa. Los centrómeros son regiones ricas en heterocromatina, por lo tanto, tiñe principalmente regiones centroméricas, pericentroméricas y gran parte del cromosoma Y (36).
- Bandas T: Es una variante de las bandas R, se incuba con el mismo buffer, pero por un tiempo más prolongado. Las bandas T, son una tinción diferencial de la porción distal de los cromosomas (36).

3.1.2 ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas pueden ser divididas en numéricas y estructurales. Las numéricas se subdividen en poliploidía y aneuploidía. La poliploidía hace referencia a la presencia de un complemento cromosómico múltiplo de 23, el cual es el número haploide de cromosomas. Se llama aneuploidía cuando se presenta un múltiplo irregular del número haploide de cromosomas. Entre las aneuploidías tenemos las trisomías y las monosomías (36).

Las anomalías estructurales se clasifican en, translocaciones balanceadas, translocaciones desbalanceadas, duplicaciones, inversiones, deleciones e isocromosomas. A continuación, se describirán brevemente (43):

- Translocaciones balanceadas: Comprende el intercambio de partes de dos cromosomas sin pérdida o ganancia de material genético.

- Translocaciones desbalanceadas: Comprende el intercambio de partes de dos cromosomas con pérdida o ganancia de material genético.
- Duplicaciones: Hace referencia a la producción de una o más copias de un segmento particular de ADN en un mismo cromosoma.
- Inversiones: Generan una dirección contraria de una parte intersticial del cromosoma, pueden ser paracentromérica o pericentromérica. La paracentromérica involucra un solo brazo (no se involucra el centrómero) y la pericentromérica involucra ambos brazos (involucrando el centrómero).
- Deleciones: Es la pérdida de una parte de un cromosoma, que puede ser terminal cuando la pérdida incluye el telómero o intersticial cuando no se pierde el telómero, sino una porción del cromosoma entre el centrómero y el telómero.
- Isocromosomas: Producen una imagen de espejo en el patrón de bandas de un cromosoma con respecto a su centrómero. Se origina de un quiebre y fusión de cromátides hermanas o de una translocación entre cromosomas homólogos.
- Anillo cromosómico: Se produce cuando el extremo de un cromosoma se une a otro extremo y forma un anillo.

3.1.3 CARIOTIPO

El cariotipo es la organización de los cromosomas de acuerdo con el tamaño y la posición del centrómero, se distribuyen en pares en orden decreciente de longitud (39). El número que se le asignó a cada cromosoma fue basado en el patrón de bandas Q, propuesto por Caspersson y colaboradores en 1971. El análisis del cariotipo requiere células en metafase, para obtener una mejor clasificación y evaluación de los cromosomas (36).

Para obtener células en metafase se debe contar con un tejido con gran cantidad de células en división, las cuales deben cultivarse *in vitro*, para alcanzar un número suficiente de metafases analizables. Los leucocitos, especialmente los linfocitos T, por su capacidad de crecer y dividirse rápidamente en cultivo, son los más accesibles y puede ser estimulados utilizando fitohemaglutinina. Hacia el final de incubación, la división celular se detiene mediante el tratamiento de la muestra con colchicina, que funciona inhibiendo la

formación el huso acromático, además esta sustancia ayuda a la contracción de los cromosomas, hecho que permite una mejor delineación, un extendido más eficiente y un mejor análisis al aumentar el número de cromosomas en metafase utilizables. Posteriormente, se debe realizar un tratamiento de las células detenidas con una solución hipotónica para mejorar el rendimiento y la calidad de las extensiones, mediante el rompimiento de las membranas nucleares. Las células se tratan también con ácido glacial y carbinol para fijar las células en un estado particular de la división celular. Después de este tratamiento, se preparan las láminas para la observación microscópica (39) (40) (36).

Los cromosomas obtenidos anteriormente son cuerpos transparentes. Por lo tanto, para analizarlos, se tratan con un tinte para que aparezcan bandas visibles y así puedan distinguirse según los patrones de las bandas. Generalmente los cromosomas se tiñen con Giemsa, y se conocen como cromosomas de bandas G. Las imágenes capturadas tienen los 46 cromosomas colocados aleatoriamente. No todas las imágenes son adecuadas para el análisis, debido a que pueden contener cromosomas que se tocan o se superponen. Por esta razón el analista debe verificar y detectar las imágenes de cromosomas en metafase antes de proceder con el cariotipo (39).

Depende del tipo de muestra el analista necesita un número diferente de imágenes de cromosomas en metafase analizables. Para muestras de médula ósea, se necesitan un mínimo de 20 imágenes analizables, debido que se debe reportar la anormalidad en al menos tres o más células. Para sangre periférica se toman de 20 a 30 imágenes analizables, de las cuales 17 se utilizan para contar los cromosomas y 5 se utilizan para encontrar las anomalías estructurales numéricas (39).

En la Figura 2, se ilustra de manera resumida el análisis cromosómico por medio de cariotipo en cinco pasos principales: 1) cultivo celular, 2) recolección de cromosomas en metafase, 3) preparación de cromosomas, 4) bandeo y tinción utilizando un protocolo especial, y 5) análisis mediante microscopía óptica o análisis asistido por computadora de cariotipo (40).

El cariotipo ha sido el estándar de atención para pacientes con LMA durante décadas, proporcionando la base para el manejo actual y la estratificación de riesgo. Las técnicas clásicas de cariotipo tienen un límite de resolución de sólo 5 a 10 Mb, y algunas

variantes somáticas son crípticas y no se puede identificar independientemente de la resolución (41). Además, una limitación inherente al bandeo cromosómico es la dependencia de las células que se dividen *in vitro*. En algunas neoplasias hematológicas es posible que no se obtenga un número suficiente de células en metafase analizables para lograr el estudio cromosómico (44).

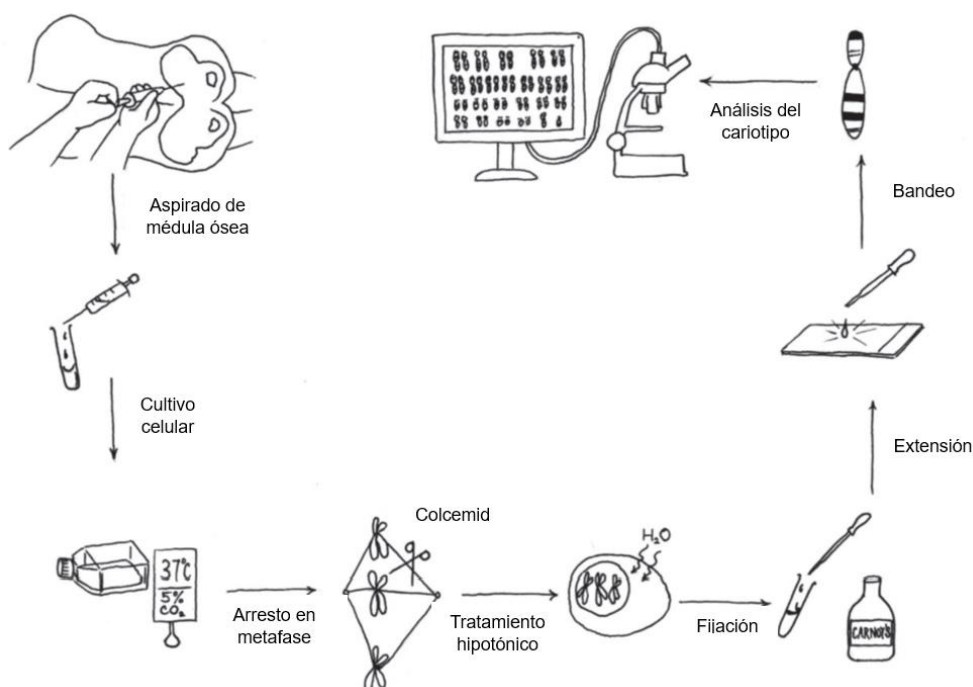


Figura 2. Procedimiento de preparación de muestra para análisis de cariotipo en pacientes con leucemia. Modificado de Wan, 2014 (40).

3.1.4 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)

La hibridación fluorescente in situ (FISH) fue descrita en el año 1986 por Pinkel y colaboradores. La técnica se desarrolló con el objetivo de clasificar y detectar aberraciones cromosómicas. Para ello, se utilizó ADN marcado con biotina, el cual se hibridiza con los cromosomas objetivo. Posteriormente se induce la emisión fluorescencia por medio de tratamientos sucesivos con avidina marcada con fluoresceína y anticuerpo anti-avidina biotinilados (45).

El primer paso para realizar el FISH es la preparación de las sondas, las cuales corresponden a secuencias cortas de ADN de cadena sencilla que coincide con la porción

del gen que se está buscando. La sonda de ADN se debe etiquetar, para lo cual se pueden utilizar dos estrategias de etiquetado: el directo y el indirecto. En el directo las sondas se etiquetan con nucleótidos que contienen un fluoróforo. En el etiquetado indirecto, son los nucleótidos modificados los que contienen un hapteno en el que se etiquetan las sondas. Luego, la sonda etiquetada y el ADN diana se desnaturalizan. El apareamiento de secuencias de ADN complementarias ocurre debido a las consecuencias combinadas de la sonda y el ADN diana desnaturalizados. En el caso del etiquetado indirecto, se necesita un paso adicional para la visualización del hapteno no fluorescente que utiliza un sistema de detección enzimática o inmunológica (46). En resumen, se puede simplificar el protocolo de FISH en cinco pasos principales ilustrados en la Figura 3: 1) pretratamiento de la muestra, 2) desnaturalización de la sonda y la muestra, 3) hibridación de la sonda a células objetivo, 4) lavado post-hibridación y 5) detección utilizando un microscopio de epifluorescencia simple con juegos de filtros apropiados (40).

La precisión y la versatilidad del FISH fueron posteriormente aprovechadas en la investigación biológica y médica. Esta técnica proporciona un grado intermedio de resolución entre el análisis de ADN y las investigaciones cromosómicas. El FISH es una técnica que consume menos tiempo en comparación con el método convencional de análisis de cariotipo en metafase, debido a que no necesita realizar cultivo celular, sino que requiere procesamiento de los núcleos en interfase. En caso de tener tejido parafinado, el primer paso antes de empezar la técnica debe ser eliminar la parafina. Con esta técnica es posible enumerar y trazar aberraciones citogenéticas específicas, así como anomalías en los números de copia (46). El FISH ha demostrado una mayor sensibilidad que el cariotipo tanto para los cambios cromosómicos sutiles como para las anomalías crípticas, además de tener un procesamiento más rápido. Tiene la limitación que solo evalúa regiones objetivo específicas, por lo que requiere de grandes paneles para una evaluación integral de todas las anomalías clínicamente significativas en la LMA (41).

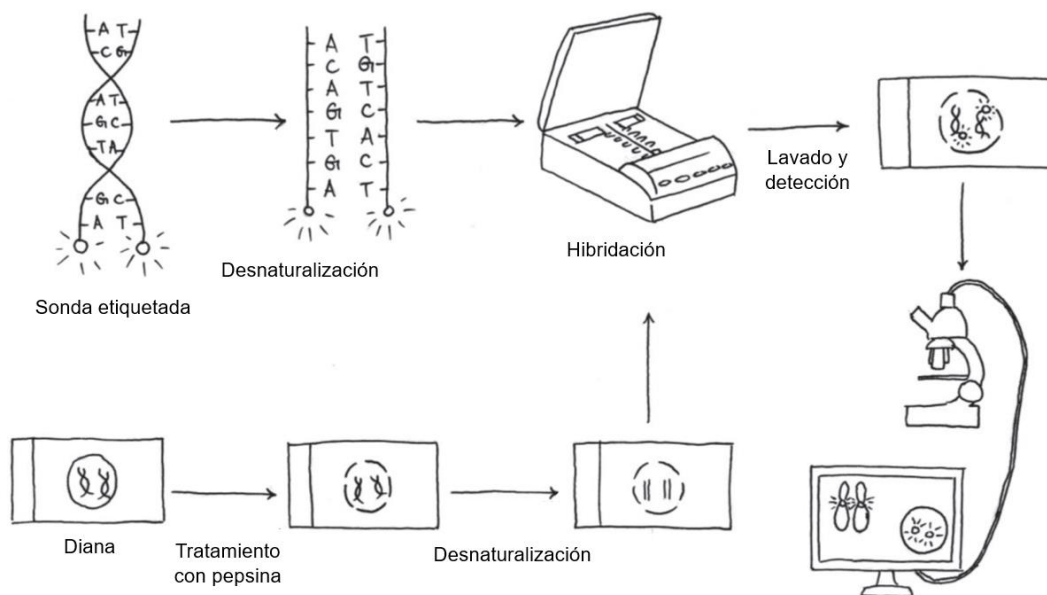


Figura 3. Esquema del protocolo del FISH Modificado de Wan, 2014 (40).

3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULARES

3.2.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue definida por Kary B. Mullis en 1985, no solo como una técnica específica o un conjunto de técnicas, sino también como un concepto. La PCR utiliza una enzima con acción nucleasa natural, la polimerasa, para catalizar la regeneración del ADN con una reacción en cadena. Consta de tres pasos (desnaturalización, hibridación y extensión) que se repiten una y otra vez para amplificar exponencialmente el ADN objetivo (47). Para la reacción también se puede utilizar ADN copia, este se obtiene por medio de un proceso de retrotranscripción donde el ARN mensajero es convertido en ADN copia por medio de una enzima transcriptasa reversa, método que fue copiado de los Retrovirus. Los elementos de la reacción son el templado o molde (ADN o ADN copia), polimerasa, primers, desoxirribonucleótidos trifosfato, ión magnesio, buffer y H₂O. Los equipos que se utilizan para llevar a cabo la reacción son los termocicladores, en ellos se establecen los ciclos con la temperatura y tiempo del ensayo (48)

El producto de la amplificación debe ser analizado a través de una electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis se basa en la separación de grandes moléculas de ácidos

nucleicos a través de una matriz sólida, que sirve de filtro para separar moléculas a través de un campo eléctrico. La separación se da en función del tamaño y la carga. Para hacer el análisis del gel se deben correr los productos de la PCR junto con un marcador de peso molecular, para hacer la respectiva comparación del tamaño obtenido con el esperado (48).

3.2.2 PCR EN TIEMPO REAL

En el año 1992, Higuchi y colaboradores fueron los primeros en establecer las pautas para desarrollar lo que hoy conocemos como PCR en tiempo real (49). El fundamento de la técnica se basa en la PCR punto final, con la diferencia en la detección y el análisis de los productos de la PCR. Su nombre se debe a que la detección de los productos amplificados se da en cada ciclo de la reacción. Además, se considera cuantitativo, debido a que es posible cuantificar la cantidad de ADN de la muestra. La PCR en tiempo real es un método sensible, específico y eficiente, aún cuando se cuenta con cantidades pequeñas de templado (48).

Hay dos métodos para para detectar los productos amplificados, los específicos y los no específicos. Los métodos no específicos usan moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y al ser oxidados emiten señales fluorescentes. Esta fluorescencia emitida es capturada en la extensión de cada ciclo y es directamente proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenido en cada uno de los ciclos de la PCR. El reportero más usado en este caso es el SYBR Green, el cual tiene la característica que mientras no este unido al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia y cuando se une aumenta 1000 veces su fluorescencia. Como desventaja se sabe que puede unirse a cualquier molécula de ADN doble banda, incluidos los dímeros de primers, sin embargo, por su bajo costo es utilizado a pesar de esa limitación (48).

Los métodos específicos siguen el principio de conocido como "transferencia de energía de resonancia fluorescente" para generar la señal. Consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o quencher. Existen dos métodos específicos, los basados en hidrólisis y por hibridación. Con cualquiera de los métodos mencionados es necesario excitar al reportero, capturar la señal de emisión y realizar el análisis cuantitativo (48).

El análisis de los resultados generalmente se hace con un software que genera una serie de gráficas donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa. Las gráficas de amplificación muestran el curso y el progreso de la reacción y las gráficas de disociación o de melting muestra información sobre la especificidad de la reacción. Se puede utilizar la cuantificación absoluta y relativa. La absoluta se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas o la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Y la relativa puede ser útil para evaluar cambios en la expresión de genes, los cuales se dan en torno a los niveles de ARN mensajero del gen blanco comparado con un gen de referencia que no cambia su expresión a pesar que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas (48).

3.2.3 SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

La secuenciación de Sanger o secuenciación de primera generación, fue desarrollada en la década de 1970 por Frederick Sanger y es la antecesora a todas las técnicas de secuenciación actuales. La secuenciación de Sanger se basa en el uso de dideoxidonucleótidos (ddNTPs), que son nucleótidos con una modificación química en la desoxirribosa, donde se sustituye el 3'-OH para detener la síntesis de la cadena de ADN (50). La evolución de la secuenciación Sanger a la secuenciación de nueva generación (NGS), junto con la disminución de los costos de la secuenciación, ha marcado el comienzo de una era genómica sin precedentes (44).

La NGS es una forma de secuenciación de alto rendimiento que abarca diferentes plataformas y métodos. Independientemente de la plataforma una vez que el ADN ha sido extraído y purificado (o el ARN ha sido extraído y convertido en ADN copia [cADN]), el flujo de trabajo puede dividirse en cuatro pasos principales: 1) preparación de las librerías; 2) amplificación de ADN/generación de clusters; 3) secuenciación de ADN; y 4) análisis de datos (51). Durante la preparación de las librerías los fragmentos de ADN, creados por fragmentación sónica, digestión enzimática o transcripción inversa de fragmentos de ARN, se ligan con adaptadores de ADN sintéticos, que permiten la unión de las moléculas de ADN a una superficie sólida y también sirven como sitios de iniciación para la amplificación y secuenciación (51).

Los códigos de barras de ADN sintéticos o "adaptadores índice" también se agregan durante la preparación de las librerías para permitir la agrupación de diferentes librerías para la secuenciación. Dependiendo de la reacción de secuenciación, se agregan códigos de barras moleculares, también compuestos de ADN sintético, a cada molécula de ADN individual para aumentar la sensibilidad y detectar errores de la reacción en la PCR durante la amplificación subsiguiente (51).

La amplificación de ADN/generación de clusters, ocurre después de que las moléculas de ADN se adhieren a una base sólida. Una vez amplificados, los clusters de ADN se secuencian. Siendo los dos métodos más populares la secuenciación basada en fluorescencia (plataformas Illumina®) y la secuenciación basada en semiconductores (plataformas Ion Torrent) (51). Ambos métodos se basan en la secuenciación por síntesis, la cual implica la incorporación dependientes de la ADN polimerasa, en la cadena de ADN extendida sobre la base de amplificación (52). Los pasos que fueron previamente numerados como 2 y 3 ocurren dentro de la plataforma de secuenciación (51).

El sistema Illumina® se basa en una técnica que se conoce como "amplificación en puente" en la que se utilizan moléculas de ADN de aproximadamente 500 pb, con adaptadores ligados en cada extremo. Estos adaptadores sirven como sustratos para las reacciones de amplificación en la celda de flujo (soporte sólido), esta celda de flujo contiene secuencias de oligonucleótidos complementarias a los adaptadores ligados. Los oligonucleótidos de la celda están espaciados de manera que el ADN al ser sometido a varios ciclos de amplificación, crea clusters que constan de aproximadamente 1000 copias de cada fragmento de oligonucleótidos. Cada celda es capaz de soportar millones de reacciones de grupos paralelos. Los nucleótidos que participan en las reacciones de síntesis se encuentran marcados con un terminador fluorescente reversible, se incorporan y posteriormente se detectan. Dicho lo anterior, la secuenciación se basa en la lectura óptica de la incorporación de nucleótidos modificados mediante una ADN polimerasa. Las reacciones son repetidas durante 300 ciclos o más (52).

Por su parte, en el sistema Ion Torrent de Thermo Fisher®, convierte directamente la secuencia en información digital en un chip semiconductor. En la reacción de síntesis de ADN, cuando se incorpora un nucleótido correcto frente a su base complementaria en una cadena de ADN en crecimiento, se libera un ion hidrógeno. Esto cambia el pH de la solución,

que puede registrarse como un cambio de voltaje por un sensor de iones, similar a un medidor de pH. Si no se incorpora ningún nucleótido, no ocurre ningún pico de voltaje. Las reacciones de secuenciación de Ion Torrent ocurren en millones de pozos que cubren un chip semiconductor que contiene millones de píxeles, los cuales convierten la información química en información de secuenciación (52).

La NGS se puede implementar mediante la secuenciación de genoma completo (WGS), secuenciación de exoma completo (WES) y la secuenciación dirigida por paneles

- Secuenciación de genoma completo (WGS)

La secuenciación del genoma completo (WGS), especialmente la que involucra fragmentos de ADN de lectura larga o inserción larga, es una tecnología atractiva que puede detectar los 3 tipos de variantes genómicas (variantes estructurales, en número de copia y de nucleótido único) de manera imparcial. A pesar de las ventajas la WGS aún no se adopta para uso clínico en todo el mundo debido a su complejidad en comparación con otras tecnologías en relación con los procesos, flujos de trabajo y recursos necesarios para su implementación (44).

- Secuenciación de exoma completo (WES)

La secuenciación de exoma completo (WES) cubre todas las secuencias exónicas y tiene el potencial de eliminar gran parte de la variabilidad, al menos en lo que respecta al contenido. Aunque los costos de WES han disminuido drásticamente en los últimos 5 años, siguen siendo una limitación en muchas partes del mundo. Los algoritmos bioinformáticos mejorados han permitido que WES detecte la mayoría de las variantes en número de copia, aunque con un rendimiento variable, dependiendo de la calidad y profundidad de datos de secuenciación y los parámetros de normalización. Además, dado que WES excluye regiones intrónicas y genómicas regulatorias, no puede detectar un gran subconjunto de variantes estructurales. Esta deficiencia es significativa, ya que la detección de algunas variantes estructurales intrónicas es esencial en la evaluación de ciertas neoplasias hematológicas. La WES tiene el potencial de adaptarse rápidamente a nueva información derivada de la investigación traslacional, aunque también sufre la incapacidad de detectar todas las aberraciones genómicas pertinentes (44).

- Secuenciación dirigida por paneles

En el entorno clínico, la implementación de NGS dirigida por paneles, permite reducir costos, proporciona mayor velocidad y produce datos clínicamente aplicables (51) Sin embargo, al ser dirigidos a genes específicos requieren actualizaciones periódicas a medida que se identifican nuevos genes clínicamente relevantes (44).

Durante el análisis de datos, los datos en bruto se convierten en una secuencia de nucleótidos, las lecturas de secuencia se alinean con un genoma de referencia y se analizan para detectar variantes de secuencia y su impacto clínico. La Asociación para la Patología Molecular y el Colegio Americano de Patólogos publicaron recientemente estándares y pautas para validar *pipelines* (flujos de trabajo) bioinformáticos de NGS. El flujo de trabajo puede ser conceptualizado en análisis primario, secundario y terciario (51).

El análisis primario consiste en traducir las señales de secuenciación que se encuentran en bruto en datos de bases de nucleótidos. El propósito del análisis primario es la generación de secuencias. El software de análisis primario a menudo ya está instalado en los instrumentos de secuenciación (51). El análisis secundario implica alineación de secuencias, llamadas de variantes y filtrado de variantes. La alineación de secuencias consiste en emparejar las lecturas cortas generadas por NGS (típicamente <250 pb) con un genoma humano de referencia. La llamada de variantes consiste en identificar las variaciones entre la muestra y la secuencia del genoma de referencia (51).

El análisis terciario consiste en interpretar el conjunto de variantes detectadas por el análisis secundario. Utiliza metadatos extensivos para anotar variantes generando una secuencia de cADN y aminoácidos, clasificándolas como polimorfismos en función de su frecuencia en la población humana y detectando su ocurrencia en bases de datos de cáncer o germinales. El proceso de priorización de variantes identifica variantes clínicamente insignificantes, como variantes sinónimas o intrónicas profundas, y polimorfismos benignos bien establecidos. Después de excluir las variantes clínicamente insignificantes, el conjunto restante de variantes se debe clasificar y generar el informe (51).

Entre las limitaciones de la NGS se puede mencionar que sufre de incapacidad para identificar variantes estructurales (SV) asociadas con elementos repetitivos o regiones no mapeables y requieren instrumentación costosa, tuberías de bioinformática complejas y

personal de atención médica calificado para interpretar los datos (41). El volumen de datos generado de un análisis de NGS es realmente masivo y requiere de capacidad de procesamiento de datos rápido. Los laboratorios deben prepararse para un aumento en los requisitos de análisis y almacenamiento de datos y para una inversión financiera en computadoras y almacenamiento local o en la nube. Los datos de NGS deben ser almacenados por el laboratorio para mantener la trazabilidad de los resultados de los pacientes (53).

En la Tabla 7, se resumen las principales ventajas, limitaciones y utilidad clínica de las tecnologías abordadas a lo largo del capítulo. El cariotipo y la secuenciación de genoma completo se diferencian de las demás por la posibilidad de tener una cobertura total, sin embargo, en cuanto a la distinción de clones celulares, solo el cariotipo y el FISH son capaces de hacerlo. El tiempo en días desde el momento de la recepción de la muestra hasta el reporte final varía según la técnica utilizada, el NGS es una técnica más laboriosa y por ende el tiempo de procesamiento es mayor que en las otras tecnologías que se están comparando. Actualmente la tecnología más costosa es el NGS, se estima que la inversión que debe realizar un laboratorio para llevar a cabo estos análisis es de aproximadamente \$899.000-\$1.330.000, entre equipos, bases de datos con alta capacidad de almacenamiento, costos de validación de los ensayos y recurso humano capacitado. La PCR en tiempo real y la secuenciación dirigida por paneles se han destacado por ser utilizadas para el análisis de la EMR. La capacidad para detectar variantes estructurales, variantes en número de copias y variantes de nucleótido único se resumen por técnica en la Tabla 7 (44).

Tabla 7. Ventajas, limitaciones, y utilidad clínica de las tecnologías genómicas disponibles para malignidades hematológicas (44).

	Cariotipo	FISH	RT-PCR	NGS		
				WGS	Dirigido por paneles	
Analito	Cromosomas en metafase	ADN en interfase o metafase	ARN	ADN	ADN	ARN
Cobertura	Total	Dirigida	Dirigida	Total	Dirigida	Dirigida
Distinción de clones celulares individuales	Sí	Sí	No	No	No	No
Tiempo (días)	3-7	4 horas a 2 días	4 horas a 5 días	7-14	7-14	7-14
Detección de regiones no mapeadas	Sí	No	No	No	No	No
Capacidad multiplex	Baja	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta
Sensibilidad analítica (%)	1-3 de 20 metafases	1-10	~ 0.01	20-30	1-10	5-10
SV	Sí	Sí	Limitada	Sí	No	Genes de fusión
CNV	Sí	Sí	Limitada	Sí	Limitada	Limitada
SNV	No	No	No	Sí	Sí	Sí
Estado de la enfermedad	Diagnóstico, monitoreo de la enfermedad, recaída	Diagnóstico, monitoreo de la enfermedad, recaída	Diagnóstico, monitoreo de la enfermedad, recaída, EMR	Diagnóstico, recaída	Diagnóstico, monitoreo de la enfermedad, recaída, EMR	Diagnóstico, monitoreo de la enfermedad, recaída, EMR
Costo	++	++	++	+++++	+++	+++

FISH: Hibridación fluorescente in situ; RT-PCR: PCR en tiempo real; NGS: Secuenciación de nueva generación; WGS: Secuenciación de genoma completo; SV: Variantes estructurales; CNV: Variantes en número de copias; SNV: Variantes de nucleótido único; EMR: Enfermedad medible residual

CAPÍTULO 4

ABORDAJE CITOGÉNÉTICO, MOLECULAR Y TERAPÉUTICO DE PACIENTES CON LMA EN COSTA RICA

4.1.1 ABORDAJE CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES CON LMA

Los estudios citogenéticos para diagnóstico y seguimiento de LMA en Costa Rica, se han llevado a cabo a lo largo de los años por el personal del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños. Desde el año 1990 se realizan cariotipos para pacientes pediátricos con LMA. Con el pasar de los años y hasta la actualidad se reciben las muestras de la totalidad de los pacientes diagnosticados con LMA sin importar su edad o centro de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) que las refiera (54).

Actualmente el Laboratorio de Citogenética ofrece dos tipos de pruebas para pacientes con LMA, el cariotipo y el FISH. Se reciben muestras de sangre periférica, tejidos parafinados, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y líquidos peritoneales infiltrados por células malignas. Como parte del flujo de trabajo las muestras son recibidas y se inicia con el cultivo para recuperar las metafases y hacer el cariotipo. De acuerdo a los resultados del cariotipo y la citometría de flujo se eligen las sondas de FISH que serán analizadas. En caso de no recuperar metafases se inicia con el FISH sin el resultado del cariotipo. El laboratorio cuenta con un escáner CytoVision® de Leica Byosystems, para realizar la búsqueda automatizada de las metafases y la captura de las imágenes para ser posteriormente analizadas, en cuanto al FISH todo se realiza de manera manual con equipos Leica Byosystems y se cuenta con las siguientes sondas comerciales (54):

- Sonda CFBF inv16/t(16;16)
- Sonda D20S108(20q12)
- Sonda EGR1(5q31)
- Sonda LSI *PML/RARA*, t(15;17)
- Sonda LSI 17q *RARA* BREAK APART
- Sonda LSI 21 trisomía 21
- Sonda LSI CSF1R (5q33-5q34) MIELODISPLASIA
- Sonda LSI p53
- Sonda LSI PTEN (10q23)

- Sonda Oncogene *MLL* t(11q23)
- Sonda *ETO-AML-1* t(8;21)
- Sonda LSI *PDGFRB* 5q esoinofilia
- Sonda LSI *PDGFRa* 4q12 esoinofilia
- Sonda LSI D13S319 SO/13q34 SG 01N20-020
- Sonda ETV6 dual color BREAK APART
- Sonda LSI BCR/ABL, t(9;22)
- D-5124-100-OG XL t(3;3) *GATA2* / *MECOM* DF
- Sonda LSI (7q31)/CEP 7
- Sonda FUS cromosoma 16
- Sonda FGR1 cromosoma 8p

El tiempo de respuesta desde el momento en que se recibe la muestra hasta el informe final de cariotipo tarda en promedio cinco días, y el de FISH de dos a tres semanas en promedio. Generalmente se solicitan las pruebas citogenéticas al momento del diagnóstico y en caso de recaída se envía una nueva muestra para ser analizada (54).

4.1.2 ABORDAJE MOLECULAR DE PACIENTES CON LMA

Los estudios moleculares para pacientes con LMA iniciaron en el año 2015 para pacientes pediátricos y se extendió a pacientes adultos en el 2018. Al igual que las pruebas citogenéticas para el análisis molecular se reciben las muestras de todos los pacientes diagnosticados con LMA en la CCSS. Cuando la muestra es recibida en el laboratorio se procede a realizar la extracción de ADN y posteriormente una retrotranscripción, esto porque las PCR se hacen con cADN. El algoritmo de trabajo también depende de los resultados de la citometría de flujo y se organiza de la siguiente manera (55):

- Si la citometría de flujo indica que es una LMA mínimamente diferenciada o LMA sin maduración, se realiza PCR en tiempo real para *NMP1* y PCR en punto final para *FLT3*.
- Si la citometría de flujo indica que es una LMA con maduración, se realiza PCR en tiempo real para *NMP1* y para t(8;21) *RUNX1::RUNX1T1* y PCR en punto final para *FLT3*.

- Si la citometría de flujo indica que es una leucemia promielocítica aguda, se realiza PCR en tiempo real para t(15;17) *PML::RARA*.
- Si la citometría de flujo indica que es una LMA mielomocítica, se realiza PCR en tiempo real para inv(16) *CBFB::MYH11* y para *NMP1* y PCR en punto final para *FLT3*.
- A los pacientes que al momento del diagnóstico se les reportó leucocitosis se les adiciona el análisis de *BCR::ABL1*.

El tiempo de respuesta promedio desde el momento en que llega la muestra hasta que se reporta en el sistema de información de es de aproximadamente tres días. Se reciben muestras tanto de diagnóstico como de seguimiento. Actualmente no se están realizando análisis de NGS como parte de la rutina para pacientes con LMA. En casos muy excepcionales y comentados en sesiones clínicas se puede tomar la decisión de procesar un exoma clínico para evaluar más a profundidad al paciente (55).

En la Tabla 8, se presenta los datos de las médulas recibidas en el laboratorio de citogenética y biología molecular del Hospital Nacional de Niños, de los pacientes diagnosticados con LMA del año 2019 al 2023. La casilla de monitoreo y recaídas solo toma en cuenta las muestras de recibidas en el laboratorio de citogenética. Según los datos que se muestran el año donde se recibieron más muestras fue en el 2022 En promedio se recibieron la siguiente cantidad de muestras mensuales: 6.4 muestras en el 2019; 7.2 en el 2020; 7.1 en el 2021; 9.3 en el 2022 y 7.2 en el 2023.

Tabla 8. Médulas óseas de pacientes diagnosticados con LMA procesadas en el laboratorio de citogenética y el laboratorio de diagnóstico molecular del HNN en los años 2019, 2020, 2021, 2022 y 2023 (54). Elaboración propia.

Mes	2019	2020	2021	2022	2023
Enero	8	9	5	15	9
Febrero	3	4	8	8	9
Marzo	7	8	7	11	3
Abril	2	7	7	10	5
Mayo	12	4	10	14	8
Junio	6	9	9	6	7
Julio	6	9	9	4	4
Agosto	7	8	6	15	3
Septiembre	6	8	5	9	10
Octubre	9	8	5	10	7
Noviembre	8	6	5	5	14
Diciembre	3	6	9	5	7
Sumatoria	77	86	85	112	86
Monitoreo o recaídas	2	5	3	10	12
Promedio	6.4	7.2	7.1	9.3	7.2

4.1.2 ABORDAJE TERAPEÚTICO DE PACIENTES CON LMA

La Lista Oficial de Medicamentos y Normativa de la CCSS, es realizada por la Dirección de Farmacoepidemiología y es un documento donde se enumeran los fármacos que son utilizados en la institución y los médicos que tienen autorización de prescribirlos. En la Tabla 9, se resumen los fármacos presentes en la LOM que se utilizan para el tratamiento de pacientes con LMA en la CCSS (56).

En pacientes con mutación de *FLT3* se puede solicitar al Comité Central de Farmacoterapia la compra de midostaurina, esto respaldado mediante evidencia de laboratorio. Además, en pacientes refractarios al tratamiento se ha autorizado la compra venetoclax. Es importante destacar que el médico tratante debe hacer solicitudes individuales para cada paciente que requiera un fármaco que no se encuentre en la LOM (57).

Tabla 9. Fármacos aprobados como tratamiento para pacientes diagnosticados con LMA según la Lista Oficial de Medicamentos y Normativa, 2024 (56). Elaboración propia

Fármaco	Presentación	Mecanismo
Citarabina	100 mg 100 mg/mL 500 mg	Antimetabolito
Etopósido	20 mg/mL	Inhibidor de topoisomerasa tipo II
Idarubicina hidrocloreuro	5 mg	Antraciclina
Vinblastina sulfato	10 mg 1 mg/mL	Alcaloide de vinca
Vincristina sulfato	1 mg/mL 1 mg	Alcaloide de vinca
Filgrastim 300 µg/mL	300 µg/mL	Agonista del receptor de G- CSF

CONCLUSIONES

1. La biología molecular, citogenética y citometría de flujo han permitido avances significativos en el entendimiento de la LMA. Ha proporcionado conocimientos profundos sobre las bases moleculares, patogénesis y nuevas dianas terapéuticas.
2. No existe una prueba ideal para diagnóstico y seguimiento de la LMA. Cada técnica tiene ventajas y limitaciones específicas en términos de costo, tiempo de procesamiento, capacidad para detectar diferentes tipos de variantes genéticas y aplicaciones clínicas.
3. Las terapias dirigidas son una realidad gracias a la comprensión de las bases genéticas de la LMA. Se ha demostrado que la LMA por su naturaleza heterogénea requiere de dianas terapéuticas que puedan resultar más beneficiosas para los pacientes que los regímenes de quimioterapia tradicional y estos avances han sido posibles por lo avances en comprensión genética de la LMA.
4. La CCSS ofrece pobres alternativas terapéuticas para pacientes con LMA. La lista oficial de medicamentos y regulaciones del año 2024, no contempla terapias dirigidas como el venetoclax, azacitidina o sorafenib, y estas terapias son necesarias para mejorar la sobrevida de pacientes refractarios o no aptos para quimioterapia intensiva.
5. En Costa Rica los estudios de NGS aportarían más información a los pacientes con cariotipo normal y sin alteraciones moleculares identificadas. Para que los pacientes puedan ser catalogados adecuadamente según la clasificación de la OMS 2022 y la estratificación de riesgo de ELN 2022, requieren de una correcta caracterización genética. Además, el uso de NGS puede contribuir a tomar mejores decisiones terapéuticas o a solicitar fármacos que no se encuentran disponibles en la CCSS.

REFERENCIAS

1. Tebbi CK. 2021. Etiology of acute leukemia: A review. *Cancers (Basel)*. MDPI <https://doi.org/10.3390/cancers13092256>.
2. Hoffman R, Benz E, Silberstein L, Heslop H, Weitz J, Anastasi J, Salama M. 2018. *Hematology Basic Principles and Practice*. ELSEVIER.
3. Hernández A, Roldán M, Herrera L, Villegas JD, Álvarez LF, Hernández F, Martín L. 2019. Leucemia de manifestación aguda y las nuevas alternativas terapéuticas. *Medicina Interna México* 4:553–563.
4. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. Springer Nature <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
5. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, DiNardo CD, Godley LA, Iacobucci I, Jaiswal S, Malcovati L, Vannucchi AM, Patel KP, Arber DA, Arcila ME, Bejar R, Berliner N, Borowitz MJ, Branford S, Brown AL, Cargo CA, Döhner H, Falini B, Garcia-Manero G, Haferlach T, Hellström-Lindberg E, Kim AS, Klco JM, Komrokji R, Lee-Cheun Loh M, Loghavi S, Mullighan CG, Ogawa S, Orazi A, Papaemmanuil E, Reiter A, Ross DM, Savona M, Shimamura A, Skoda RC, Solé F, Stone RM, Tefferi A, Walter MJ, Wu D, Ebert BL, Cazzola M. 2022. Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015853>.
6. Pourrajab F, Zare-Khormizi MR, Hashemi AS, Hekmatimoghaddam S. 2020. Genetic characterization and risk stratification of acute myeloid leukemia. *Cancer Manag Res* 12:2231–2253.
7. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Ángel Gómez-Guijosa M, Cortes-Penagos C. 2017. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research Review Article IJHOSCR*.

8. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. 2019. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* Churchill Livingstone <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005>.
9. Kayser S, Levis MJ. 2023. The clinical impact of the molecular landscape of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* Ferrata Storti Foundation <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.280801>.
10. Winer ES. 2020. Secondary Acute Myeloid Leukemia: A Primary Challenge of Diagnosis and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* W.B. Saunders <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.11.003>.
11. American Cancer Society. 2024. Acerca de la leucemia mieloide aguda.
12. Talami A, Bettelli F, Pioli V, Giusti D, Gilioli A, Colasante C, Galassi L, Giubolini R, Catellani H, Donatelli F, Maffei R, Martinelli S, Barozzi P, Potenza L, Marasca R, Trenti T, Tagliafico E, Comoli P, Luppi M, Forghieri F. 2021. How to improve prognostication in acute myeloid leukemia with cbfb-myh11 fusion transcript: Focus on the role of molecular measurable residual disease (mrd) monitoring. *Biomedicines* 9.
13. Reed F, Larsuel ST, Mayday MY, Scanlon V, Krause DS. 2021. MRTFA: A critical protein in normal and malignant hematopoiesis and beyond. *Journal of Biological Chemistry* 296.
14. Nacheva EP, Grace CD, Brazma D, Gancheva K, Howard-Reeves J, Rai L, Gale RE, Linch DC, Hills RK, Russell N, Burnett AK, Kottaridis PD. 2013. Does BCR/ABL1 positive Acute Myeloid Leukaemia Exist? *Br J Haematol* 161:541–550.
15. Li X, Song Y. 2021. Structure, function and inhibition of critical protein–protein interactions involving mixed lineage leukemia 1 and its fusion oncoproteins. *J Hematol Oncol.* BioMed Central Ltd <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01057-7>.
16. Ottema S, Mulet-Lazaro R, Berna Beverloo H, Erpelinck C, Van Herk S, Van Der Helm R, Havermans M, Grob T, Valk PJM, Bindels E, Haferlach T, Haferlach C, Smeenk L, Delwel R. 2020. Atypical 3q26/MECOM rearrangements genocopy inv(3)/t(3;3) in acute myeloid leukemia.
17. Lim HH, An GD, Woo KS, Kim KH, Kim JM, Kim SH, Han JY. 2017. NUP98 rearrangement in acute myelomonocytic leukemia with t(11;19)(p15;p12): The first case report worldwide. *Ann Lab Med.* Seoul National University, Institute for Cognitive Science <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.3.285>.
18. Heald J, Carreras J. 2022. Identification of novel NUP98 fusion partners and co-mutations in Acute Myeloid Leukemia: an adult cohort study. *Blood Adv*

- <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023012479/2220006/bloodadvances.2023012479.pdf>.
19. Dourisboure R. 2012. Factores moleculares pronóstico en leucemia mieloide aguda: detección de mutaciones en FLT3, NPM1 y CEBPA. *Hematología* 16:200–202.
 20. Su L, Shi YY, Liu ZY, Gao SJ. 2022. Acute Myeloid Leukemia With CEBPA Mutations: Current Progress and Future Directions. *Front Oncol. Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.806137>.
 21. Arber D, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz M, Calvo K, Kvasnicka H-M, Wang S, Bagg A, Barbui T, Branford S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Dal Cin P, DiNardo C, Dombret H, Duncavage E, Ebert B, Estey E, Facchetti F, Foucar K, Gangat N, Gianelli U, Godley L, Gokbuget N, Gotlib J, Hellstrom-Lindberg E, Hobbs G, Hoffman R, Jabbour E, Kiladjian J-J, Larson R, Le Beau M, Loh M, Lowenberg B, Macintyre E, Malcovati L, Mullighan C, Niemeyer C, Odenike O, Ogawa S, Orfao A, Papaemmanuil E, Passamonti F, Porkka K, Pui C-H, Radich J, Reiter A, Rozman M, Rudelius M, Savona M, Schiffer C, Schmitt-Graeff A, Shimamura A, Sierra J, Stock W, Stone R, Tallman M, Thiele J, Tien H-F, Tzankov A, Vannucchi A, Vyas P, Wei A, Weinberg O, Wierzbowska A, Cazzola M, Dohner H, Tefferi A. 2022. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 140:1200–1228.
 22. Haferlach T, Schmidts I. 2020. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol. Blackwell Publishing Ltd* <https://doi.org/10.1111/bjh.16360>.
 23. Hughes CFM, Gallipoli P, Agarwal R. 2021. Design, implementation and clinical utility of next generation sequencing in myeloid malignancies: acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Pathology. Elsevier B.V.* <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.01.005>.
 24. Dohner H, Wei A, Appelbaum F, Craddock C, DiNardo C, Dombret H, Ebert B, Fenaux P, Godley L, Hasserjian R, Larson R, Levine R, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Rollig C, Sierra J, Stein E, Tallman M, Tien H-F, Wang J, Wierzbowska A, Lowenberg B. 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 140:1345–1377.
 25. Quessada J, Cuccuini W, Saultier P, Loosveld M, Harrison CJ, Lafage-Pochitaloff M. 2021. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia: A review of the current knowledge. *Genes (Basel)* 12.

26. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, Garcia-Manero G, Konopleva M, Ravandi F. 2021. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. Springer Nature <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3>.
27. Heuser M, Freeman S, Ossenkoppele G, Buccisano F, Hourigan C, Ngai LL, Tettero J, Bachas C, Baer C, Bene M, Bucklein V, Czyz A, Denys B, Dillon R, Dohner K, Roboz Gail, Cloos J. 2021. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* 138:2753–2767.
28. Heuser M, Ofran Y, Boissel N, Brunet Mauri S, Craddock C, Janssen J, Wierzbowska A, Buske C. 2020. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 31:697–712.
29. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhäuser M, Juliusson G, Râcil Z, Rowe JM, Russell N, Mohty M, Löwenberg B, Socié G, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ. 2012. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: An integrated-risk adapted approach. *Nat Rev Clin Oncol* <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.150>.
30. Mohamed Jiffry MZ, Kloss R, Ahmed-khan M, Carmona-Pires F, Okam N, Weeraddana P, Dharmaratna D, Dandwani M, Moin K. 2023. A review of treatment options employed in relapsed/refractory AML. *Hematology (United Kingdom)* 28.
31. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, Konopleva M, Döhner H, Letai A, Fenaux P, Koller E, Havelange V, Leber B, Esteve J, Wang J, Pejsa V, Hájek R, Porkka K, Illés Á, Lavie D, Lemoli RM, Yamamoto K, Yoon S-S, Jang J-H, Yeh S-P, Turgut M, Hong W-J, Zhou Y, Potluri J, Pratz KW. 2020. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 383:617–629.
32. Kordella C, Lamprianidou E, Kotsianidis I. 2021. Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter. *Front Oncol*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.650473>.
33. Abou Zahr A, Borthakur G. 2017. Emerging cell cycle inhibitors for acute myeloid leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs*. Taylor and Francis Ltd <https://doi.org/10.1080/14728214.2017.1330885>.
34. Dang L, Yen K, Attar EC. 2016. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of Oncology*. Oxford University Press <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw013>.
35. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, Swords R, Collins RH, Mannis GN, Pollyea DA, Donnellan W, Fathi AT, Pigneux A, Erba HP, Prince GT, Stein

- AS, Uy GL, Foran JM, Traer E, Stuart RK, Arellano ML, Slack JL, Sekeres MA, Willekens C, Choe S, Wang H, Zhang V, Yen KE, Kapsalis SM, Yang H, Dai D, Fan B, Goldwasser M, Liu H, Agresta S, Wu B, Attar EC, Tallman MS, Stone RM, Kantarjian HM. 2018. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1 -Mutated Relapsed or Refractory AML . *New England Journal of Medicine* 378:2386–2398.
36. Silva C, Contreras N, Fonseca D. 2008. Utilidad de la citogenética en la medicina actual Visión histórica y aplicación. *Acta Médica Colombiana* 33:309–316.
37. Tjio J, Levan A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1–6.
38. Ford C, Hamerton J. 1956. The chromosome of man. *Nature* 4541:1020–1023.
39. Arora T, Dhir R. 2016. A review of metaphase chromosome image selection techniques for automatic karyotype generation. *Med Biol Eng Comput.* Springer Verlag <https://doi.org/10.1007/s11517-015-1419-z>.
40. Wan TSK. 2014. Cancer cytogenetics: Methodology revisited. *Ann Lab Med* 34:413–425.
41. Levy B, Baughn LB, Akkari Y, Chartrand S, LaBarge B, Claxton D, Lennon PA, Cujar C, Kolhe R, Kroeger K, Pitel B, Sahajpal N, Sathanoori M, Vlad G, Zhang L, Fang M, Kanagal-Shamanna R, Broach JR. 2023. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood Adv* 7:1297–1307.
42. Drets M. 2002. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeó cromosómico. Significado y proyección biomédica. *Revista Médica del Uruguay* 18:107–121.
43. ISCN. 2020. ISCN 2020. ISCN 2020 <https://doi.org/10.1159/000510090>.
44. Akkari Y, Baughn L, Dubuc A, Smith A, Mallo M, Dal Cin P, Diez M, Gallego M, Granada I, Haase D, Schlegelberger B, Slavutsky I, Mecucci C, Levine R, Hasserjian R, Solé F, Levy B, Xu X. 2022. Guiding the global evolution of cytogenetic testing for hematologic malignancies. *Blood* 139:2273–2284.
45. Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization (in situ hybridization/biotin labeling/hybrid cells/chromosome-specific staining) *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*.
46. Ratan ZA, Zaman S Bin, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N. 2017. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus* <https://doi.org/10.7759/cureus.1325>.
47. Garcia JGN, Ma SF. 2005. Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. *Crit Care Med* 33.

48. Tamay L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2:70–78.
49. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413–417.
50. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc Natl, Acad Sci USA* 74:5463–5467.
51. Hanbazazh M, Harada S, Reddy V, Mackinnon AC, Harbi D, Morlote D. 2021. The Interpretation of Sequence Variants in Myeloid Neoplasms. *Am J Clin Pathol*. Oxford University Press <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab039>.
52. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 122.
53. Yin Y, Butler C, Zhang Q. 2021. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol* 82:812–819.
54. Obando C. 27 May 2024. Entrevista sobre pruebas citogenéticas utilizadas para pacientes con LMA en el Laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños. Entrevistador: P Zúñiga.
55. Barboza E, Morera E. 27 May 2024. Entrevista sobre pruebas citogenéticas utilizadas para pacientes con LMA en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños. Entrevistador: P Zúñiga.
56. Caja Costarricense de Seguro Social. 2024. Lista Oficial de Medicamentos y Normativa. Dirección de Farmacoterapia. Comité Central de Farmacoterapia.
57. Jiménez F. 19 Jun 2024. Entrevista sobre tratamientos utilizados en Costa Rica para pacientes con LMA refractarios al tratamiento. Entrevistador: P Zúñiga.

ANEXOS

ANEXO 1. ENTREVISTA 1

Entrevista sobre pruebas citogenéticas utilizadas para pacientes con LMA en el Laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños

Perfil del entrevistado

Nombre:

Sección:

Cargo:

Funciones:

1. ¿A partir de que año se empezaron a aplicar pruebas citogenéticas para pacientes con LMA?
2. ¿Qué pruebas citogenéticas están disponibles en el HNN para pacientes con LMA?
3. ¿Cuáles centros de salud refieren muestras para análisis citogenético de pacientes con LMA?
4. ¿Qué tipo de muestras se utilizan para realizar pruebas citogenéticas a pacientes con LMA?
5. ¿Cuáles son los equipos con los que cuenta el Laboratorio de Citogenética?
6. ¿Cuáles son sondas de FISH utilizan para pacientes con LMA?
7. ¿Cuál es el flujo de trabajo para las muestras de pacientes con LMA?
8. ¿Cuál es el tiempo de respuesta promedio desde la recepción de la muestra hasta la generación del informe para pacientes con LMA?
9. ¿En qué casos les envían muestras para seguimiento de pacientes con LMA?
10. ¿Cuál es la cantidad de médulas mensuales promedio de nuevos diagnósticos de LMA en el año 2024?

ANEXO 2. ENTREVISTA 2

Entrevista sobre pruebas moleculares utilizadas para pacientes con LMA en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Hospital Nacional de Niños

Perfil del entrevistado

Nombre:

Sección:

Cargo:

Funciones:

1. ¿A partir de que año se empezaron a aplicar pruebas moleculares para pacientes con LMA?
2. ¿Qué pruebas moleculares están disponibles en el HNN para pacientes con LMA?
3. ¿Cuáles centros de salud refieren muestras para análisis molecular de pacientes con LMA?
4. ¿Qué tipo de muestras se utilizan para realizar pruebas moleculares a pacientes con LMA?
5. ¿Cuáles son los equipos con los que cuenta el Laboratorio de Diagnóstico Molecular?
6. ¿Cuál es el flujo de trabajo para las muestras de pacientes con LMA?
7. ¿En que tipos de pacientes con LMA se está realizando NGS?
8. ¿Cuál es el tiempo de respuesta promedio desde la recepción de la muestra hasta la generación del informe para pacientes con LMA?
9. ¿Cuál es la cantidad de médulas mensuales promedio de nuevos diagnósticos de LMA en el año 2024?