

Índice de ADN en pacientes con leucemia linfoblástica aguda como herramienta para la clasificación de riesgo de recaída temprana

Parra-Ortega I¹, Nájera-Martínez N¹, Mendoza-García E¹, Vega-Cardelás JM¹, Hernández-Echáurregui G², López-Martínez B³, Vilchis-Ordoñez A¹

Resumen

ANTECEDENTES: el índice de ácido desoxirribonucleico (ADN) tiene estrecha correlación con otros parámetros clínicos como factor pronóstico en la leucemia aguda linfoblástica infantil, se ha descrito que los pacientes con ADN hipodiploide tienen peor pronóstico que los pacientes con ADN hiperdiploide.

OBJETIVO: evaluar la utilidad clínica de la cuantificación del índice de ADN para la correcta clasificación del riesgo de recaída temprana.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio prospectivo y transversal realizado de junio de 2015 a marzo de 2016 en el que se midió el índice de ADN en células mononucleares por la metodología de citometría de flujo en pacientes con leucemia aguda.

RESULTADOS: se estudiaron 27 pacientes de los que 12 (44%) eran del sexo masculino. Con base en las recomendaciones de la clasificación EGIL el tipo de leucemia que se identificó fue: leucemia linfoblástica aguda Pro-B 1 (4%), leucemia linfoblástica aguda Pre-B 8 (30%), leucemia linfoblástica aguda Pre-B común 17 (62%) y leucemia bifenotípica o de linaje ambiguo (linaje B y linaje mieloide) 1 (4%). El valor de índice de ADN en estos pacientes fue: hipodiploide en 22.2%, diploide en 3.7%, hiperdiploide menor en 40.7% e hiperdiploide mayor en 33.3%.

CONCLUSIONES: al contar con índice de ADN pudo reclasificarse a los pacientes que anteriormente se consideraban en riesgo estándar, ahora se reclasificaron en riesgo alto, con la posibilidad de cambiar su esquema de tratamiento y así aumentar las posibilidades de supervivencia libre de enfermedad.

PALABRAS CLAVE: leucemia linfoblástica aguda, índice de ácido desoxirribonucleico, recaída.

¹ Departamento de Laboratorio Clínico.

² Departamento de Hemato-Oncología.

³ Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México.

Recibido: 4 de julio 2017

Aceptado: 18 de julio 2017

Correspondencia

M en C Armando Vilchis Ordoñez
vilchisarmando82@hotmail.com

Este artículo debe citarse como

Parra-Ortega I, Nájera-Martínez N, Mendoza-García E, Vega-Cardelás JM y col. Índice de ADN en pacientes con leucemia linfoblástica aguda como herramienta para la clasificación de riesgo de recaída temprana. Hematol Méx. 2017 jul;18(3):114-126.

Rev Hematol Mex. 2017 July;18(3):114-126.

Deoxyribonucleic acid index in patients with acute lymphoblastic leukemia as tool for the classification of risk of early relapse.

Parra-Ortega I¹, Nájera-Martínez N¹, Mendoza-García E¹, Vega-Cardelaz JM¹, Hernández-Echáurregui G², López-Martínez B³, Vilchis-Ordoñez A¹

Abstract

BACKGROUND: Deoxyribonucleic acid index (DNA) has close correlation with another clinical settings as forecast factor in children acute lymphoblastic leukemia (ALL). It has been described that hypodiploid DNA index is related to high risk stratification unlike hyperdiploid DNA index.

OBJECTIVE: To assess the clinical usefulness of quantification of DNA index for the correct classification of risk of early relapse.

MATERIAL AND METHOD: Flow cytometry of bone marrow aspirates (BMA) was performed to determine DNA index in mononuclear cells (MNCs) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL).

RESULTS: Among 27 ALL BMA, 44% were male. According to EGIL classification cell lineage and stage of maturation determined lymphoblastic leukemia identification: ALL corresponded to Pro B (4%), Pre B (30%) and common Pre B (62%), bifenotypic leukemia's (4%). Hypodiploid DNA index corresponded to 22%, hyperdiploid corresponded to 33.3%.

CONCLUSIONS: DNA index is a powerful tool to classify children with ALL according to risk of early relapse, risk stratification (high or standard) modifies treatment schedule. It is important that every diagnostic laboratory develops all the battery on methodologies to classify accurately children with ALL.

KEYWORDS: acute lymphoblastic leukemia; deoxyribonucleic acid index; relapse

¹ Departamento de Laboratorio Clínico.

² Departamento de Hemato-Oncología.

³ Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico.

Hospital Infantil de México Federico Gómez,
Ciudad de México.

Correspondence

Men C Armando Vilchis Ordoñez
vilchisarmando82@hotmail.com

ANTECEDENTES

Las leucemias agudas se caracterizan por afectar el tejido hematopoyético; el arresto en vías de diferenciación y capacidad de proliferación de los precursores hematopoyéticos es un común denominador. De acuerdo con el linaje afectado,

las leucemias agudas pueden dividirse robustamente en mieloide y linfoide. Las leucemias agudas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en la edad pediátrica. La leucemia linfoblástica aguda tiene incidencia de 80% y la mieloide aguda de 20% aproximadamente.¹ La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer de

mayor incidencia en los niños, afecta a 41 casos por cada millón de habitantes; es una enfermedad heterogénea y compleja, en la que factores ambientales, microambientales y genéticos se ven implicados; también se ha observado que la población latina es más susceptible que la caucásica.² El diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda se efectúa en la médula ósea, en la que la identificación morfológica sigue siendo fundamental, posteriormente debe identificarse el linaje y estadio de afectación, es decir, linaje de T, ProB, PreB y Pro/Pre B. El análisis cromosómico juega un papel importante para el abordaje de la enfermedad, donde el cariotipo es el patrón de referencia; sin embargo, el problema es que se requiere personal altamente capacitado para ello.³ Existen factores clínicos y biológicos universalmente aceptados para asignar el riesgo de recaída temprana: edad, leucocitos en sangre periférica, presencia del transcripto BCR-ABL, linaje de T, ciertas traslocaciones como MLL, pérdida cromosómica e índice de ADN, estos factores son adversos y pueden repercutir fuertemente en el pronóstico de la enfermedad en caso de no ser identificados.⁴

El índice de ADN es un parámetro que evalúa indirectamente la cantidad cromosómica y es un parámetro utilizado para estratificar a un paciente con leucemia linfoblástica aguda con base en el riesgo que tiene de recaída temprana, se ha descrito que pacientes con ADN hipodiploide tienen peor pronóstico que los pacientes con ADN hiperdiploide.⁵

La citometría de flujo es una metodología que se aplica con éxito para el estudio del ciclo celular, que puede analizarse a lo largo de sus diferentes fases, esto se realiza marcando cada célula con una tinción ligada específicamente al ADN, que permite clasificar las poblaciones celulares en G1, S o G2/M. Entre los numerosos métodos descritos para la tinción del ADN, se utiliza yoduro de propidio

como fluorocromo y agente intercalante para analizar la distribución del ADN. Este fluorocromo tiene sobre otros la propiedad de ser muy estable y poder ser excitado por un láser de argón estándar, producir histogramas con coeficiente de variación bajos y emitir en la región naranja-roja del espectro.⁶⁻⁹

El análisis de índice de ADN utilizando la citometría de flujo se ha convertido en una herramienta importante para medir e identificar las poblaciones celulares anormales.⁸ El estudio del contenido del ADN celular puede proveer información para el análisis del ciclo celular así como establecer el índice (indicador indirecto de aneuploidías). Para el análisis de estas muestras biológicas es necesario tener metodologías y plataformas que cuenten con un estricto control de calidad para que los resultados obtenidos tengan la confiabilidad necesaria. Esto con la finalidad de que el clínico tome una decisión en la clasificación de la enfermedad y el tratamiento del paciente.¹⁰⁻¹⁴

De acuerdo con las guías internacionales de institutos pediátricos, contar con la cuantificación del índice de ADN es de vital importancia para la correcta clasificación del riesgo a recaída temprana, por lo que en el departamento del Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de México Federico Gómez se implementó y evaluó la utilidad clínica del parámetro, utilizando un kit comercial.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras

Estudio prospectivo y transversal realizado de junio de 2015 a marzo de 2016 en el que se utilizaron muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA, obtenida de personas clínicamente sanas, para realizar la estandarización de la prueba. En el caso de los pacientes,

se utilizó una muestra de 2.0 mL de aspirado de médula ósea anticoagulada con EDTA, obtenida de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda, que cumplieran con los siguientes criterios: 1) que contaran con clasificación inmunológica (inmunofenotipo), 2) que no hubieran recibido tratamiento al momento de la extracción de la muestra y 3) que no estuvieran en recaída. Se excluyeron las muestras de los pacientes que no cumplieran con los criterios mencionados.

Se utilizó un kit Cycletest Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson) con los siguientes reactivos y controles:

Reactivos

- Solución de tripsina en regulador de espermina y un detergente no iónico, que disgrega los lípidos de la membrana y del citoesqueleto, RNasa A para digerir el ARN.
- Inhibidor de la tripsina y RNasa A en regulador de citratos estabilizado con espermina.
- Yoduro de propidio (PI) y espermina en regulador de citratos. El PI se une al ADN en forma equivalente en una concentración de 125 µg/mL.
- Regulador de citratos-sacarosa-DMSO, para lavar y colectar tejidos, para congelar o descongelar.

Controles

- Suspensión de CEN (núcleos de eritrocitos de pollo) en un regulador y etanol.
- Suspensión de CTN (núcleos de timo de carnero) en un regulador con formaldehído y 0.01% de timerosal.
- Solución de 50 µg/mL de PI en regulador.

RESULTADOS

Siguiendo las recomendaciones del fabricante y pegas a las descripciones de inserto, se procesaron sangre periférica y muestras de médula ósea para realizar la estandarización de la prueba y el procesamiento de controles (**Figuras 1 a 6**).

Se estudiaron 27 pacientes de los que 12 (44%) eran de sexo masculino; con base en las recomendaciones de la clasificación EGIL (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemia*) el tipo de leucemia que se identificó fue: leucemia linfoblástica aguda Pro-B un caso (3.7%), leucemia linfoblástica aguda Pre-B 8 casos (29.6%), leucemia linfoblástica aguda Pre-B común 17 casos (62.9%) y leucemia bifenotípica o de linaje ambiguo (linaje B y linaje mieloide) un caso (3.7%).

Los resultados de los pacientes estudiados se muestran en los **Cuadros 1 a 3**. De acuerdo con las guías internacionales, al encontrar un índice de ADN ≤ 1.16 debe considerarse al paciente en riesgo alto.¹⁵

DISCUSIÓN

En la actualidad la leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común de la infancia y en México se ha reportado una de las mayores tasas de incidencia de América Latina, por lo que la determinación de un parámetro que aporta herramientas para su correcta clasificación es de gran utilidad en la vigilancia del éxito terapéutico del paciente.

En el caso de las pruebas que se realizan utilizando citometría de flujo la experiencia del analista y la estandarización del proceso de las muestras son fundamentales. En diversas publicaciones se han descrito variaciones en los resultados obtenidos por la heterogeneidad de protocolos, instrumentos y operadores cuando se realizan mediciones celulares.¹⁵⁻¹⁸

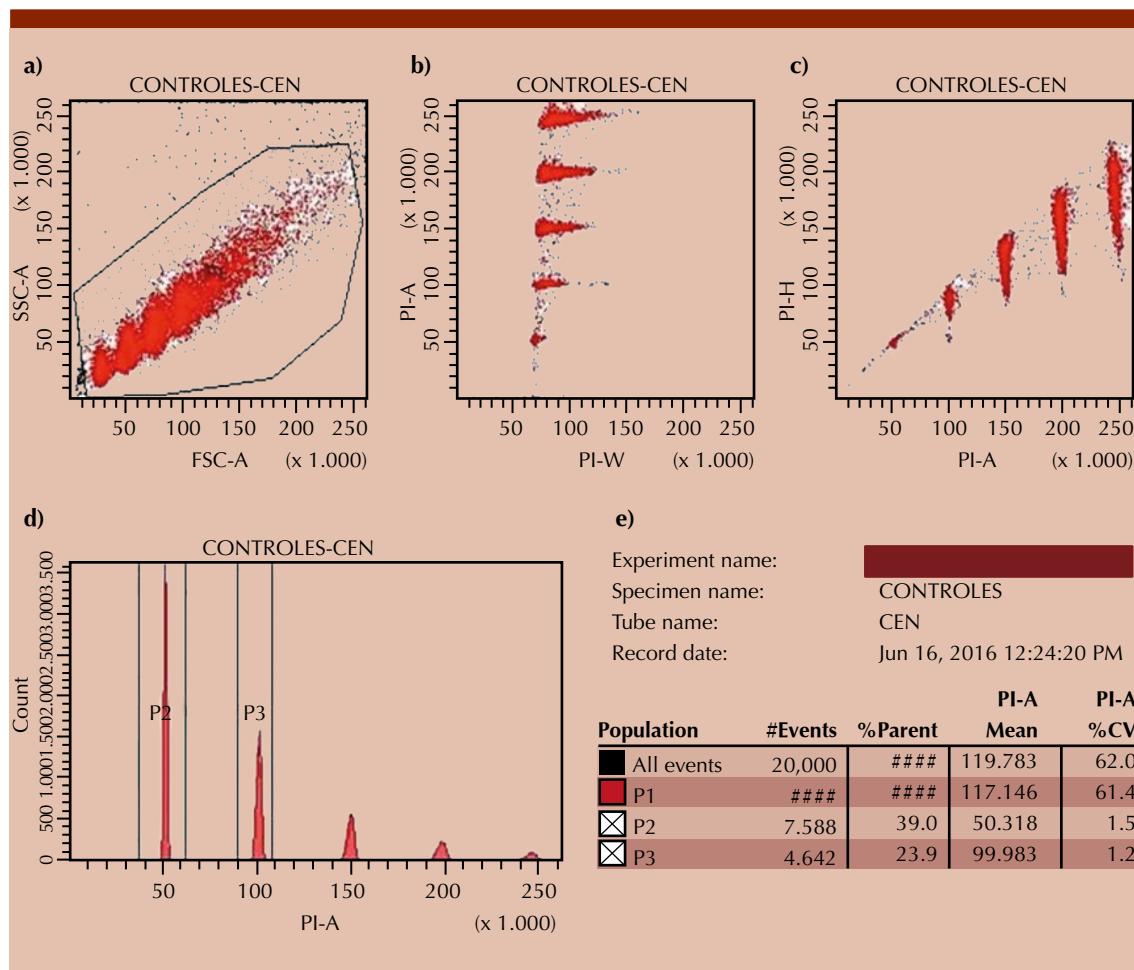


Figura 1. Plantilla de controles CEN (núcleos de eritrocitos de pollo). Con los núcleos CEN se obtiene la linealidad y resolución del instrumento porque estos núcleos tienen la propiedad de adherirse entre sí generando dobletes y tripletes, los cuales el equipo es capaz de distinguir gracias al ajuste de voltaje de los PMT (tubos fotomultiplicadores) y a la forma de medición de pulsos. **A.** Se observa la totalidad de la población (singuletes dobletes y tripletes) dispersos en cuanto a tamaño y complejidad (FSC vs SSC). **B.** En este histograma podemos observar la forma de dispersión de los núcleos en cuanto a ancho vs área y así podemos observar los singuletes con menor ancho y altura al final del histograma y van en aumento conforme estas dos características aumentan logrando así la correcta separación de los singuletes, dobletes y demás agregados. **C.** Esta imagen muestra un histograma con los parámetros de área vs altura. **D.** Histograma en el que se ajusta el voltaje del yoduro de propidio para dar una intensidad media de fluorescencia (IMF) 50,000, parámetro que se asigna a los singuletes (P2) debido a que éstos cuentan con la cantidad normal de ADN (2n), de esta manera los dobletes (P3) deberán encontrarse en una IMF de 100,000, los tripletes en 150,000 y así sucesivamente. De esta plantilla se obtiene la linealidad del equipo dividiendo la IMF de P3 entre la IMF de P2 que debe variar entre 1.95 y 2.05. El último factor a resaltar aquí es CV%, que nos da la variación entre la cantidad de ADN medido en los núcleos de P2, y cuyo valor no debe ser mayor a 3.

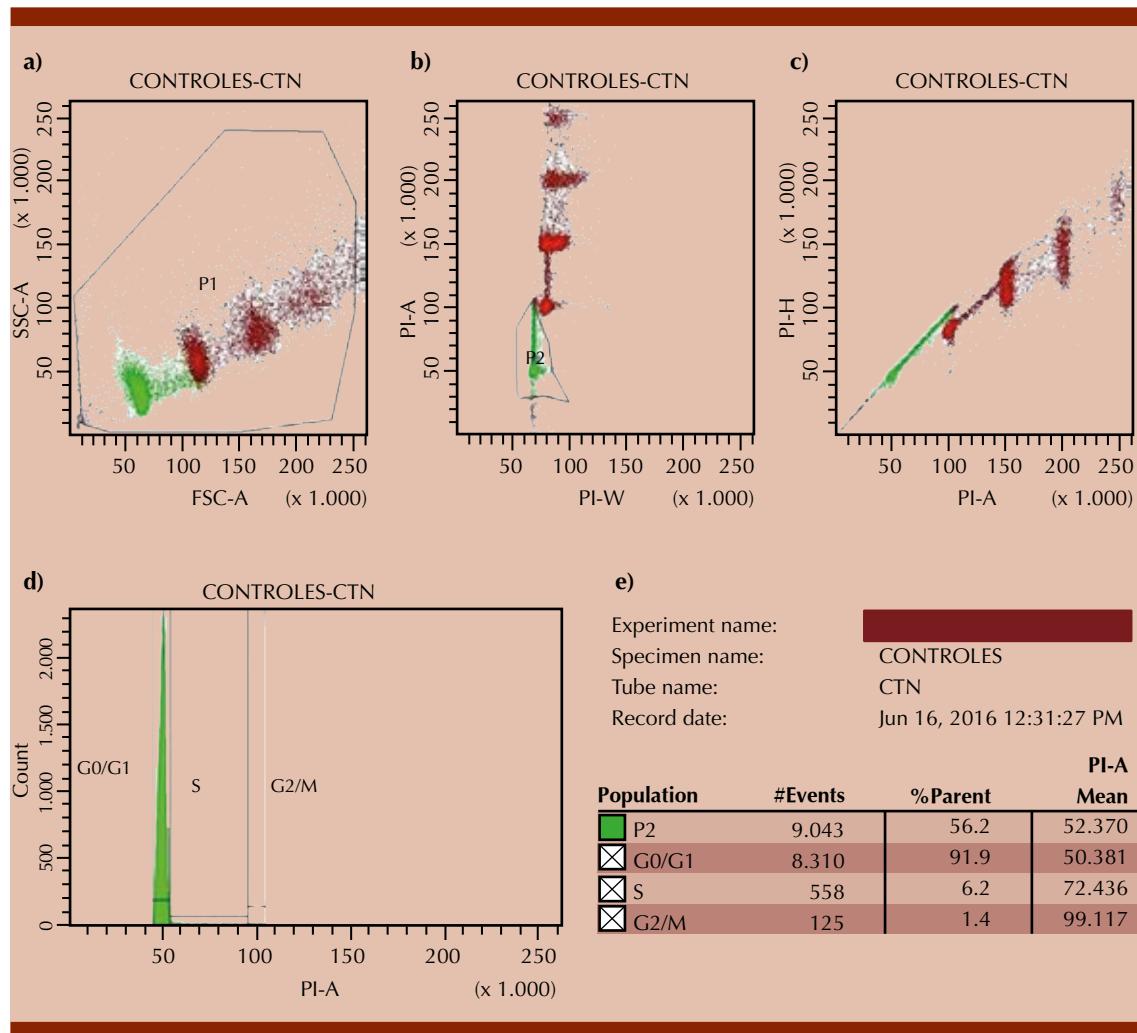


Figura 2. Plantilla de controles CTN (núcleos de timo de carnero). Los núcleos de timo de carnero contienen singuletes en todas las fases del ciclo celular y cantidades pequeñas de dobletes y tripletes en todas las fases del ciclo celular, la mayoría de los núcleos están en la fase G0/G1 (2n DNA) y una pequeña proporción está en la fase S y G2+M (4n DNA) de núcleos en singulete. Los núcleos en doblete de la fase G0/G1 (4n DNA) también están presentes y pueden ser discriminados de las fases G2+M de singuletes (4n DNA), usar estos núcleos permite estimar los porcentajes de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular. **A.** Muestra el total de la población de acuerdo con el tamaño y complejidad FSC vs SSC. **B.** Muestra la dispersión de los núcleos (ancho vs área), también podemos distinguir dentro de cada población la cantidad de núcleos que se encuentran en fase G0, la cantidad de núcleos que se encuentran en fase S y la cantidad de núcleos que están en G2/M. **C.** Este histograma muestra los mismos parámetros que el histograma B, pero en esta ocasión en términos de área vs altura. **D.** Muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la población seleccionada P2 (singuletes) y las acomoda en cantidades de ADN, los núcleos en fase G0/G1 se ajustan a una IMF de 50,000, los núcleos en fase S se mantienen en un intervalo de 55,000 a 95,000 y los núcleos en fase G2/M a una IMF de 100,000. Se corrobora el porcentaje de las fases del ciclo con los datos del lote correspondiente (*DNA QC particles kit*) cuyos valores deben estar \pm 3.5% para la fase G0/G1, \pm 1.5% para la fase S y 1.0% para G2+M.

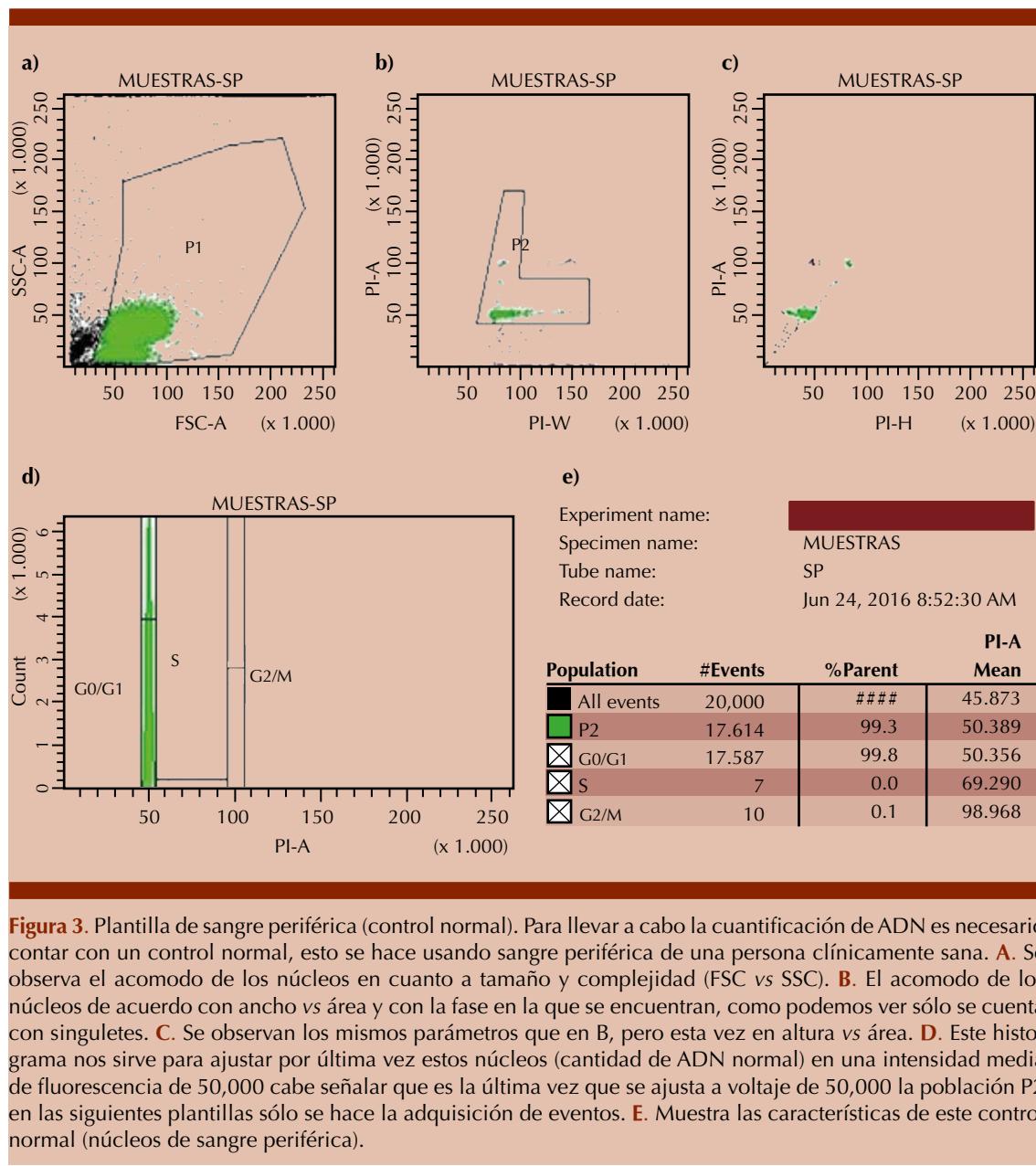


Figura 3. Plantilla de sangre periférica (control normal). Para llevar a cabo la cuantificación de ADN es necesario contar con un control normal, esto se hace usando sangre periférica de una persona clínicamente sana. **A.** Se observa el acomodo de los núcleos en cuanto a tamaño y complejidad (FSC vs SSC). **B.** El acomodo de los núcleos de acuerdo con ancho vs área y con la fase en la que se encuentran, como podemos ver sólo se cuenta con singuletes. **C.** Se observan los mismos parámetros que en B, pero esta vez en altura vs área. **D.** Este histograma nos sirve para ajustar por última vez estos núcleos (cantidad de ADN normal) en una intensidad media de fluorescencia de 50,000 cabe señalar que es la última vez que se ajusta a voltaje de 50,000 la población P2 en las siguientes plantillas sólo se hace la adquisición de eventos. **E.** Muestra las características de este control normal (núcleos de sangre periférica).

Los beneficios en la estratificación de riesgo que ofrece la integración de todas las herramientas diagnósticas ayuda al clínico a implementar un tratamiento específico. El utilizar paquetes comerciales que cuentan con valores de control de calidad en la ejecución e interpretación del

proceso analítico genera evidencia objetiva de la confiabilidad de los resultados.^{15,16}

En todo el mundo, respecto de los estándares de seguridad del paciente en los procesos analíticos, se ha descrito en diferentes normas y guías de

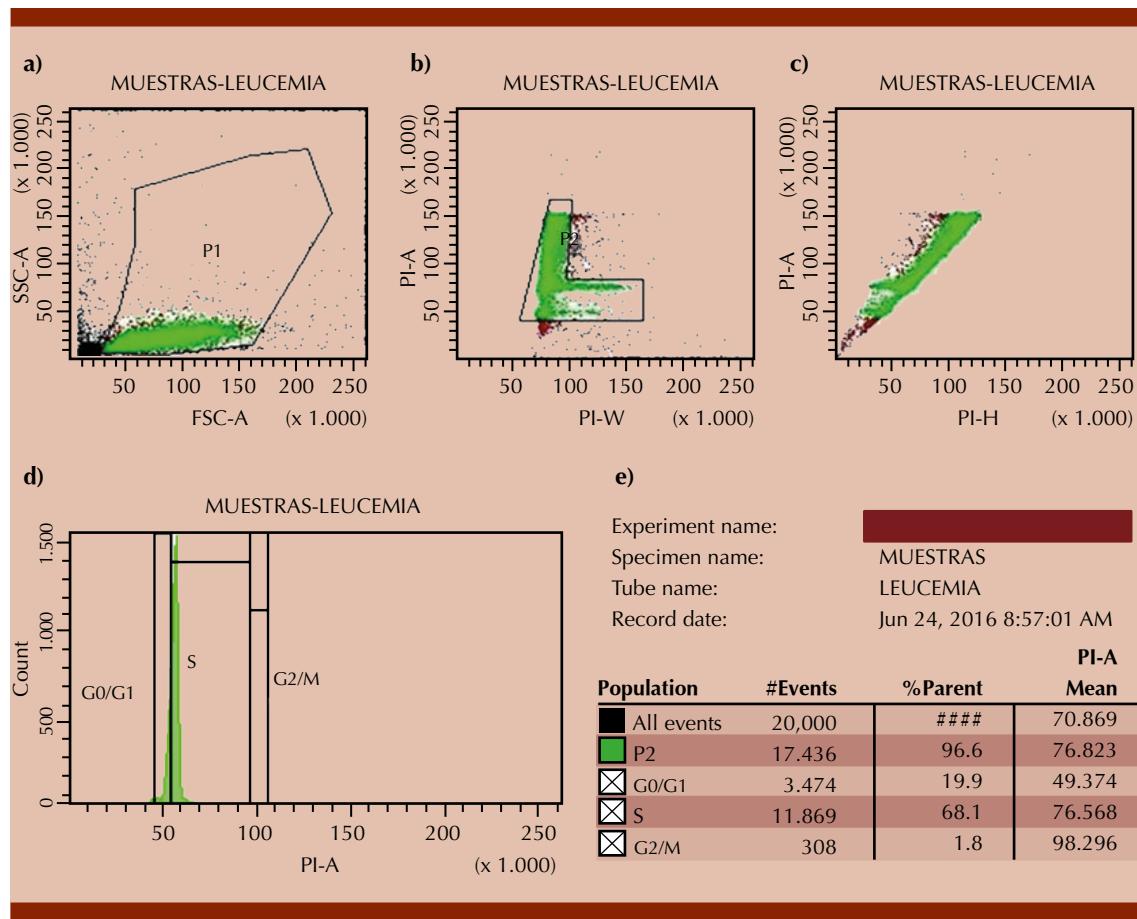


Figura 4. Plantilla de una muestra de médula ósea de paciente con leucemia aguda Pre-B común. **A.** Se observa la dispersión de la población de acuerdo con FSC vs SSC. **B.** Se observa el acomodo de los núcleos de acuerdo con ancho y área de los núcleos, podemos observar desde este punto dos poblaciones definidas. **C.** Observamos el acomodo de los núcleos de acuerdo con altura vs área, también es posible distinguir las dos poblaciones. **D.** Observamos la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las poblaciones antes señaladas, esta IMF se traduce en cantidad de ADN, por lo que podemos decir que dentro de los núcleos de médula ósea identificamos con dos poblaciones que difieren en la cantidad de ADN. **E.** Se observan las características de estas poblaciones.

laboratorio que es indispensable contar con evidencia objetiva. Por lo anterior es indispensable contar con material de referencia que genere evidencia y trazabilidad en los procesos analíticos y así detectar esas variaciones que pueden afectar el valor en un resultado y, por ende, la interpretación clínica.¹⁹⁻²¹

En el caso de los pacientes con leucemia aguda, es fundamental la correcta estratificación del riesgo, para así ponderar un tratamiento efectivo

de acuerdo con las características clínicas del paciente; sin embargo, aún es necesario realizar esfuerzos conjuntos para seguir implementando herramientas adicionales que nos permitan estratificar el riesgo de los diferentes grupos de la enfermedad y de esa manera conocer mejor la biología de la enfermedad y modificar la actitud terapéutica en el paciente, haciendo necesario el uso de técnicas moleculares cada vez más avanzadas que cuenten con valor pronóstico de la enfermedad.^{11-14,21-23}

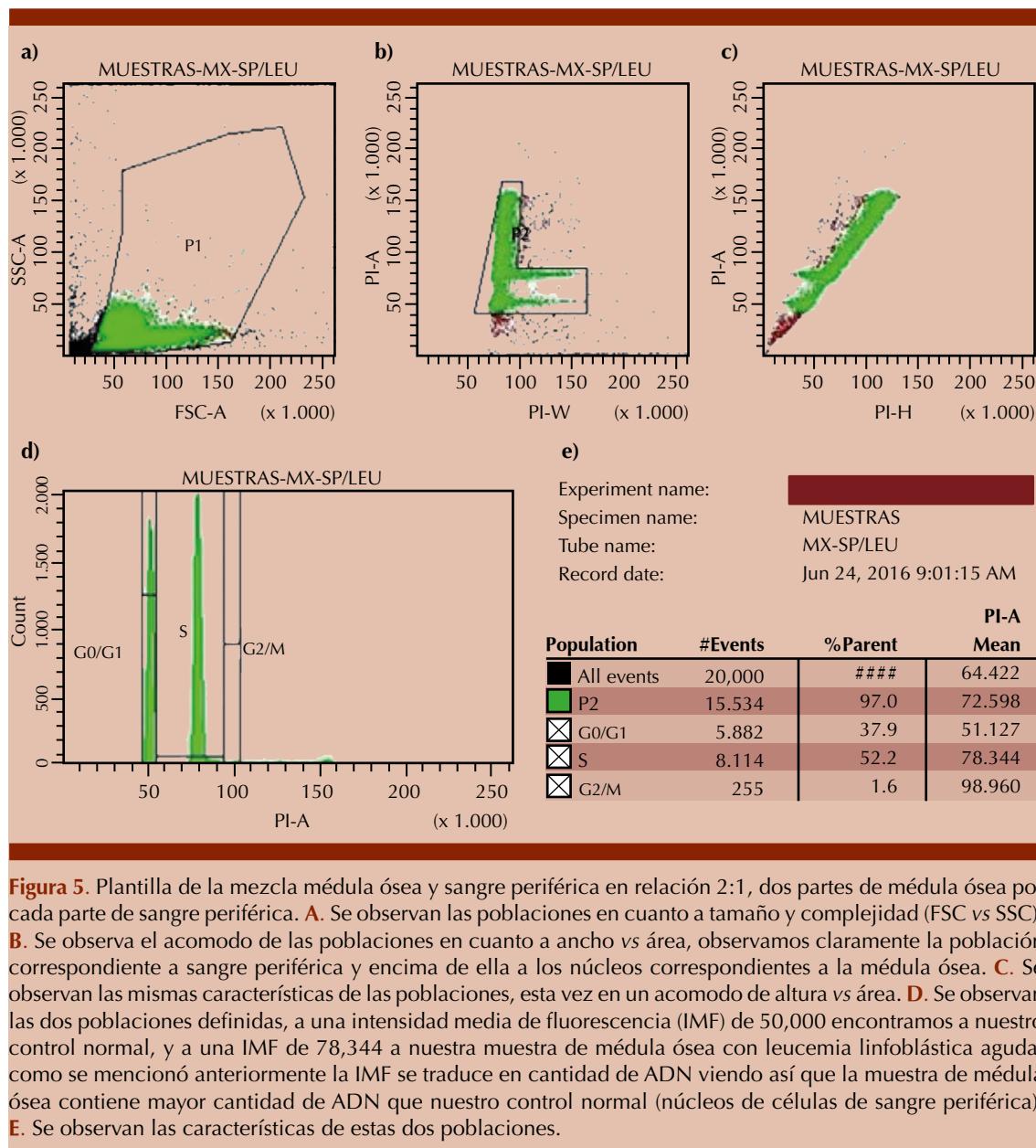


Figura 5. Plantilla de la mezcla médula ósea y sangre periférica en relación 2:1, dos partes de médula ósea por cada parte de sangre periférica. **A.** Se observan las poblaciones en cuanto a tamaño y complejidad (FSC vs SSC). **B.** Se observa el acomodo de las poblaciones en cuanto a ancho vs área, observamos claramente la población correspondiente a sangre periférica y encima de ella a los núcleos correspondientes a la médula ósea. **C.** Se observan las mismas características de las poblaciones, esta vez en un acomodo de altura vs área. **D.** Se observan las dos poblaciones definidas, a una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 50,000 encontramos a nuestro control normal, y a una IMF de 78,344 a nuestra muestra de médula ósea con leucemia linfoblástica aguda, como se mencionó anteriormente la IMF se traduce en cantidad de ADN viendo así que la muestra de médula ósea contiene mayor cantidad de ADN que nuestro control normal (núcleos de células de sangre periférica). **E.** Se observan las características de estas dos poblaciones.

Cuadro 1. Resultados de la investigación de índice de ADN en 27 pacientes con leucemia linfoblástica aguda

	Núm. (%)
Médula ósea hipodiploide	6 (22.2)
Médula ósea diploide	1 (3.7)
Médula ósea hiperdiploide menor	11 (40.7)
Médula ósea hiperdiploide mayor	9 (33.3)

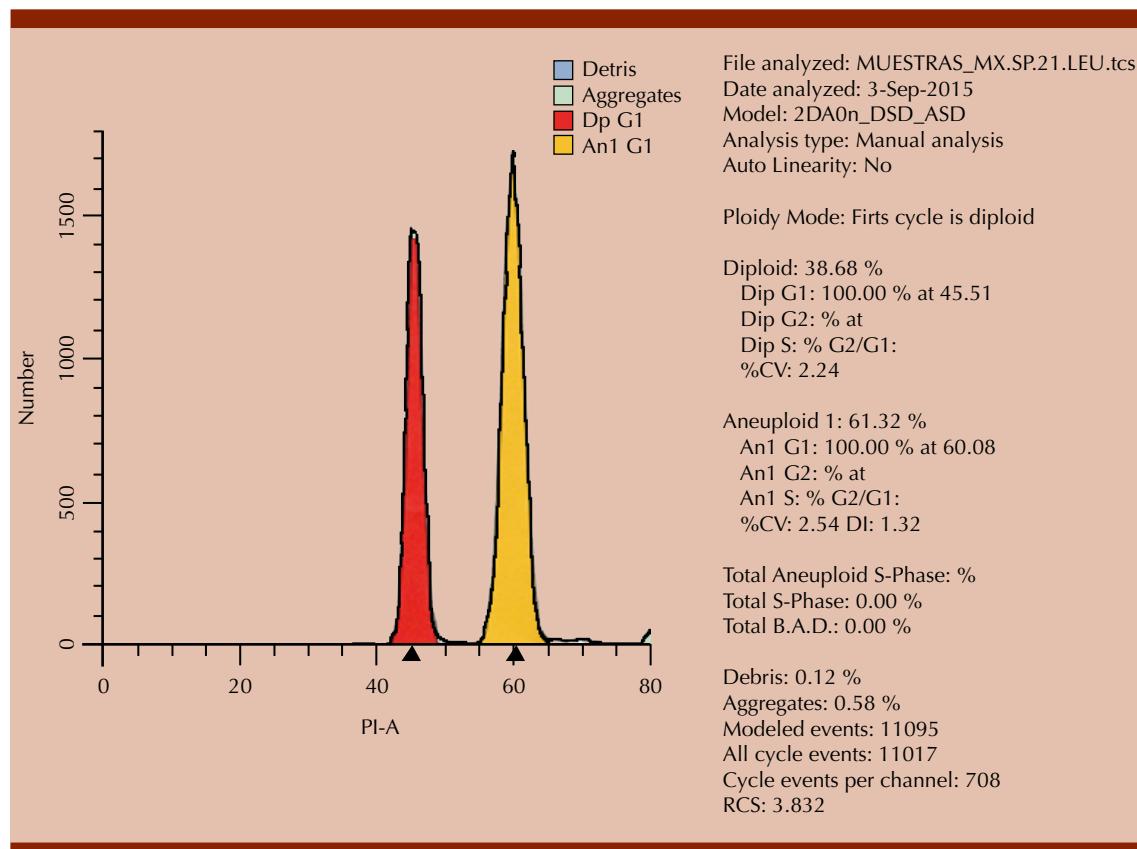


Figura 6. Análisis en el programa ModFit 4.1 donde observamos (45 PI-A) los núcleos con ADN de 2n (diploide) (60 PI-A) y los núcleos con ADN mayor a 2n (aneuploido en este caso específicamente hiperdiploide, cabe señalar que si el ADN de los núcleos en mitosis fuera hipodiploide éste se situaría en una intensidad media de fluorescencia menor a 50,000, es decir, del lado izquierdo del ADN de los núcleos con ADN normal). Este programa nos proporciona varios datos, la relación en núcleos de sangre periférica y núcleos en mitosis, que debe ser de 35 y 65%, respectivamente, las características de la población diploide (control normal), cantidad de núcleos en fase GO/G1, fase S y G2/M y las características de la población aneuploido (núcleos en mitosis), núcleos en fase GO/G1, fase S y G2/M, la cantidad de debris que interviene en el estudio, cantidad de eventos y la resolución (capacidad del programa para distinguir entre dos picos de muestras diferentes, el coeficiente de variación entre cada núcleo tanto de sangre periférica como médula ósea, y la información más relevante es el índice de ADN (ID), que en este caso corresponde a 1.32.

CONCLUSIONES

Al contar con el índice de ADN pudo reclasificarse a dos pacientes que anteriormente estaban clasificados como en riesgo estándar, ahora se reclasificaron a riesgo alto, con la posibilidad de modificar el esquema de tratamiento y así aumentar sus posibilidades de supervivencia

libre de enfermedad. Sin embargo, este trabajo no cuenta con la correlación estricta con el patrón de referencia en la evaluación de las aneuploidías por laboratorio (cariotipo), por lo que consideramos realizar a mediano plazo una evaluación del desempeño de las herramientas utilizadas (kit comercial) contra el cariotipo por bandeo G.

Cuadro 2. Resultados de la investigación de índice de ADN de acuerdo con el tipo de leucemia linfoblástica aguda según la clasificación de EGIL

Resultado del índice de ADN	Tipo de leucemia	Núm. (%)
Hipodiploide	Pre B	1 (3.7)
	Pre B común	4 (14.8)
	Bifenotípica	1 (3.7)
Hiperdiploide índice bajo	Pre B	6 (22.2)
	Pre B común	5 (18.5)
Hiperdiploide índice alto	Pre B	1 (3.7)
	Pre B común	8 (29.6)
Diploide	Pro-B	1 (3.7)

Cuadro 3. Características de los pacientes incluidos y su cambio en la clasificación de riesgo de acuerdo con la investigación de índice de ADN (Continúa en la siguiente página)

Número de paciente	Género	Edad	Leucocitos x 10 cél/µL en sangre periférica	Inmunofenotipo	Translocación*	Índice de ADN	Riesgo establecido antes del índice de ADN	Riesgo establecido con el índice de ADN
1	Masculino	2 años	13.3	Pre-B común	Negativo	1.32	Habitual	Habitual
2	Masculino	16 años	42.7	Pre-B	Negativo	1.02	Alto	Alto
3	Femenino	3 años	44.7	Pre-B	t(12;21)	1.07	Habitual	Alto
4	Femenino	14 años	13.4	Pre-B común	Negativo	1.26	Alto	Alto
5	Masculino	10 años	27.2	Pre-B	t(1;19)	1.29	Alto	Alto
6	Masculino	5 años	7.2	Pre-B común	t(8;21)	1.37	Habitual	Habitual
7	Femenino	12 años	5.8	Pre-B común	Negativo	0.98	Alto	Alto
8	Masculino	5 años	51.1	Pre-B	Negativo	1.14	Alto	Alto
9	Femenino	10 años	59.3	Pre-B común	Negativo	0.94	Alto	Alto
10	Masculino	7 años	26	Pre-B común	Negativo	1.27 y 1.13	Habitual	Habitual
11	Femenino	16 años	152	Pre-B comun	t(16;21)	0.94	Alto	Alto
12	Femenino	8 años	118.1	Pre-B	Negativo	1.01	Alto	Alto
13	Masculino	14 años	142.7	Bifenotípica	t(9;22)	0.97	Muy alto	Muy alto
14	Femenino	13 años	33.7	Pre-B común	Negativo	1.17	Alto	Alto
15	Femenino	14 años	415.9	Pre-B común	Negativo	1.02	Alto	Alto
16	Femenino	12 años	59.9	Pre-B común	Negativo	1.03	Alto	Alto
17	Femenino	2 años	50.1	Pre-B común	Negativo	1.18	Alto	Alto
18	Femenino	3 años	72.2	Pre-B común	Negativo	1.13	Alto	Alto
19	Femenino	5 meses	23.6	Pre B común	t(9;11)	1.1	Alto	Alto
20	Masculino	4 años	29	Pre B común	Negativo	1.06	Habitual	Alto

Cuadro 3. Características de los pacientes incluidos y su cambio en la clasificación de riesgo de acuerdo con la investigación de índice de ADN (Continuación)

Número de paciente	Género	Edad	Leucocitos x 10 cél./μL en sangre periférica	Inmunofenotipo	Translocación*	Índice de ADN	Riesgo establecido antes del índice de ADN	Riesgo establecido con el índice de ADN
21	Masculino	8 años	214	Pre-B	Negativo	1.03	Alto	Alto
22	Masculino	4 años	21.4	Pre-B	t(12;21)	0.97	Habitual	Alto
23	Femenino	6 meses	201.9	Pro-B	Negativo	1	Alto	Alto
24	Femenino	4 años	103	Pre-B común	Negativo	0.98	Alto	Alto
25	Femenino	15 años	35.7	Pre-B común	Negativo	1.28	Alto	Alto
26	Masculino	4 años	25.2	Pre-B común	Negativo	1.27	Habitual	Habitual
27	Masculino	14 años	70.9	Pre-B común	Negativo	1.01	Alto	Alto

* Se buscaron 28 alteraciones moleculares frecuentes en leucemias agudas.

REFERENCIAS

- Vilchis-Ordoñez A, Dorantes-Acosta E, Vadillo E, López-Martínez B, Pelayo R. Early hematopoietic differentiation in acute lymphoblastic leukemia: the interplay between leukemia-initiating cells and abnormal bone marrow microenvironment. In: Mejía-Aranguré JM, editor. *Etiology of acute leukemias in children*. Springer International Publishing 2016;291-318.
- Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I; Células troncales y medicina regenerativa. 1^a ed. México, Programa Universitario de Investigación en Salud/Coordinación de la Investigación Científica, 2012.
- Schafer ES, Hunger SP. Optimal therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:417-24.
- Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006;3:193-203.
- Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Aranguré JM, Hernández-Cruz L y col. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud Pública* 1999;6:75-88.
- Fajardo-Gutiérrez A, Rendón-Macías ME, Mejía-Aranguré JM. Epidemiología del cáncer en niños mexicanos. Resultados globales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2011;49:43-70.
- Peralta-Zaragoza O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Méx* 1997;39:451-462.
- Lagunas Cruz MC, et al. Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Rev Esp en Ciencias de la Salud* 2014;17:98-107,
- Kastan MB1, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432:316-323.
- Tembhare P, Badrinath Y, Ghogale S, et al. A novel and easy FxCycle™ violet based flow cytometric method for simultaneous assessment of DNA ploidy and six-color immunophenotyping. *Cytometry A* 2016;89:281-291.
- Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, et al. 7-amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry* 1984;5:348-354.
- El-Gamal EM, Gouida MS. Flow cytometric study of cell cycle and DNA ploidy in bilharzial bladder cancer. *Clin Lab* 2015;6:211-218.
- Lopez-Otero A, Ruiz-Delgado GJ, Hernandez-Arizpe A, et al. The flow-cytometric DNA content of the plasma cells of patients with multiple myeloma is a prognostic factor: A single institution experience. *Hematology* 2010;15:378-381.
- Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, et al. DNA index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *Int J Lab Hematol* 2010;32:288-298.
- Haixia T, Jihong Z, Chunwei L, Zhuogang, et al. Immunophenotypic, cytogenetic and clinical features of 113 acute lymphoblastic. *Ann Acad Med Sing* 2010;39:49-53.
- Carbonari M, Mancaniello D, Tedesco T, Fiorilli M. Flow acetone-staining technique: A highly efficient procedure for the simultaneous analysis of DNA content, cell morphology, and immunophenotype by flow cytometry. *Cytometry Part A* 2008;73:168-174.
- Swerts K, Van Roy N, Benoit Y, et al. DRAQ5: Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clin Chim Acta* 2007;379:154-157.
- Loh ML, Mullighan CG. Advances in the genetics of high-risk childhood B progenitor acute lymphoblastic leukemia

- and juvenile myelomonocytic leukemia: Implications for therapy. *Clin Cancer Res* 2012;18:2754-2767.
- 19. Paulsson K, Forestier E, Lilljebjörn H, et al. Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:21719-21724.
 - 20. Tsurusawa M, Katano N, Fujimoto T. Prognosis and DNA aneuploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematol Blood Transfus* 1990;33:174-181.
 - 21. Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer* 2013;132:1646-1650.
 - 22. Kenney B, Zieske A, Rinder H, Smith B. DNA ploidy analysis as an adjunct for the detection of relapse in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2008;49:42-48.
 - 23. Balandrán JC, Purizaca J, Enciso J, et al. Pro-inflammatory-related loss of CXCL12 niche Promotes acute lymphoblastic leukemic progression at the expense of normal lymphopoiesis. *Frontiers in immunology* 2017;7:1-14.