

Curso 2011/12  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/14**  
I.S.B.N.: 978-84-15910-09-1

**ANA C. BARONI LUENGO**

**Diagnóstico citogenético  
en Neoplasias mieloides**

**Director**

**JOSÉ LUIS GARCÍA MIRANDA**



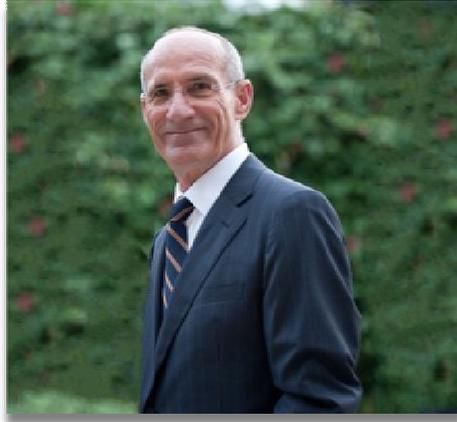
**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**



Un poco de ciencia aleja de Dios...

Mucha ciencia devuelve a Él...

Louis Pasteur (1822-1895)



Al Dr. José Luis García Miranda

Plenamente consciente del regalo que significa  
que haya aceptado dirigir mi tesis doctoral.

Con agradecimiento y afecto.

Con deseos de que en breve  
disfrute plenamente y por mucho tiempo,  
de lo que verdaderamente le importa y le hace feliz.  
Encomendando reciba desde ya el ciento por uno aquí...

# ¡ Gracias !

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sincera y enormemente a Ana Otero Gómez, Sandra Afonso Hernández y Beatriz Esquivel Vázquez el tiempo que me regalaron realizando aportaciones y sugerencias; a Alejandro Jiménez Sosa su consejo para un correcto diseño interpretación y análisis estadístico de los datos y a Adoración Merino Arribas la supervisión del texto, para mantenerlo tan "amigable" como fue concebido.

Agradecer al Dr. José Luis García Miranda es insuficiente. No está a la altura de la categoría de sentimiento que me genera. Sólo por la paciencia que tuvo conmigo y con múltiples incidencias que surgieron en el camino, se merece una compensación más digna y eficaz que un "gracias" escrito en este trabajo. Por esto, me propongo corresponder en justicia, de un modo generoso y eficaz: educar a tres de esas "incidencias": Santiago, Tomás y Martina, de modo que él sonría feliz, con la certeza de que el retraso que el nacimiento de cada uno pudo causar a este trabajo, pese a todo, valió la pena.



# ABREVIATURAS

AR	Anemia Refractaria
AREB	Anemia Refractaria con exceso de blastos
CRDM	Citopenia refractaria con displasia multilineaje
CRT	Cariotipo
Dx	Diagnóstico
EPO	Eritropoyetina
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMA con inv(16)	Leucemia Mieloide Aguda con inversión del cromosoma 16
LMA FM	Leucemia Mieloide Aguda de fenotipo mixto
LMA y NPR	Leucemia Mieloide Aguda y neoplasias de precursores relacionados
LMC	Leucemia mieloide crónica (BCR ABL positiva)
LMC <sub>a</sub>	Leucemia mieloide crónica atípica (BCR ABL negativa)
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
LPMA	Leucemia promielocítica aguda
MDP	Mielodisplásicos
MF	Mielofibrosis (primaria)
MPF	Mieloproliferativos
N	Número de casos
NMD	Neoplasias mielodisplásicas
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas
NOS	No otherwise specified (no especificado de otra forma)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PV	Policitemia Vera
RT- PCR	Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
S/E	Sin especificar
SMD	Síndromes Mielodisplásicos
TE	Trombocitemia Esencial



<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>21</b>
CLASIFICACIÓN DE LA OMS DE LOS TUMORES DE TEJIDOS LINFOIDES Y HEMATOPOYÉTICOS (4ª EDICIÓN, 2008).....	24
1. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP).....	26
1.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA BCR-ABL 1 POSITIVA (LMC).....	28
1.2 POLICITEMIA VERA (PV).....	32
1.3 MIELOFIBROSIS PRIMARIA (MF).....	34
1.4 TROMBOCITEMIA ESENCIAL (TE).....	37
2. NEOPLASIAS MIELODISPLASICAS / MIELOPROLIFERATIVAS.....	39
2.1 LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA (LMMC).....	40
2.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA ATIPICA BCR-ABL1 - (LMC <sub>a</sub> ).....	41
3. SINDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD).....	43
3.1 ANEMIA REFRACTARIA (AR).....	49
3.2 CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILINAJE.....	50
4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y DE PRECURSORES RELACIONADOS.....	51
4.1 LMA CON ALTERACIONES GENETICAS RECURRENTES:.....	55
4.2 LMA CON INVERSIÓN DEL CROMOSOMA 16.....	56
4.3 LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA (LPA) CON TRANSLOCACION (15;17); PML –RARA.....	57
5. LMA DE LINAJE AMBIGUO.....	57
LMA CON FENOTIPO MIXTO CON T(9;22) (Q34;Q11.2) BCR-ABL1.....	58
APLICACIÓN DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y CITOGENÉTICA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO ONCOHEMATOLÓGICO.....	58
<i>TÉCNICAS DE CITOGENETICA CONVENCIONAL. BANDEADO CROMOSOMICO</i> .....	59
• VENTAJAS DEL CARIOTIPO CON BANDEADO CROMOSÓMICO.....	59
• DESVENTAJAS DEL CARIOTIPO CON BANDEADO CROMOSÓMICO.....	59
<i>TÉCNICAS DE CITOGENETICA MOLECULAR FISH</i> .....	60
• VENTAJAS DE LA FISH.....	62
• DESVENTAJAS DE LA FISH.....	63
PRINCIPALES ALTERACIONES CITOGENÉTICAS DE LAS PATOLOGÍAS MIELOIDES APRECIABLES MEDIANTE FISH.....	63
<i>TRANSLOCACIÓN (9;22) GENES INVOLUCRADOS BCR-ABL. CROMOSOMA     PHILADELPHIA</i> .....	63
<i>TRANSLOCACIÓN (8;21). GENES INVOLUCRADOS ETO-AML1</i> .....	68
<i>TRANSLOCACIÓN (15;17) . GENES INVOLUCRADOS PML-RARA</i> .....	71
<i>TRANSLOCACIÓN (8q 22) MYC</i> .....	73
<i>INVERSIÓN (16)</i> .....	77
<i>MLL (REORDENAMIENTO 11q23)</i> .....	78
<i>DELECIÓN 7q31</i> .....	80

DELECIÓN 5q31 (EGR1) .....	81
DELECIÓN 5q33- q34 .....	83
TRISOMÍA+ 8p11.1-q11.1 .....	85
DELECIÓN 20q12 .....	86
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>88</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>92</b>
<i>PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS</i> .....	94
<i>PASOS DEL PROCESO DE ANALISIS DE LAS MUESTRAS</i> .....	94
• <i>CARIOTIPOS:</i> .....	95
• <i>FISH:</i> .....	95
<i>CLASIFICACIÓN DE LOS DATOS</i> .....	96
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i> .....	96
<i>P VALOR</i> .....	98
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>100</b>
1.-BASE DE DATOS INFORMATIZADA .....	102
2.-CITOGENÉTICA COVENCIONAL (CARIOTIPO) VERSUS MOLECULAR (FISH) .....	108
2.1. <i>ESTUDIOS DE LAS 1684 MUESTRAS MIELOIDES TOTALES</i> .....	108
2.1.1 <i>Resultados de cariotipo</i> .....	109
2.1.2 <i>Resultados de la FISH</i> .....	110
2.1.3 <i>Concordancia de diagnósticos FISH para los distintos resultados de cariotipo en las 1648 muestras mieloides</i> .....	116
<i>FISH EN CARIOTIPOS NO VALORABLES</i> .....	116
<i>FISH EN CARIOTIPOS NORMALES</i> .....	120
<i>FISH EN CARIOTIPOS PATOLÓGICOS</i> .....	121
2.1.4 <i>CORRELACION SOSPECHA CLINICA Y CONFIRMACIÓN CON CARIOTIPO</i> .....	124
2.1.5 <i>CORRELACION SOSPECHA CLINICA Y CONFIRMACIÓN CON FISH</i> .....	124
2.2 <i>ESTUDIOS DE LAS 872 MUESTRAS MIELOIDES (OMITIENDO LAS QUE NO TENIAN FISH)</i> .....	125
2.3 <i>CAUSAS POR LA QUE SE REALIZÓ LA FISH</i> .....	125
2.4 <i>ESTUDIO DE LAS 602 MUESTRAS DE NEOPLASIAS MIELOIDES QUE POSEEN RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH</i> .....	130
2.4.1 <i>NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS</i> .....	131
2.4.2 <i>NEOPLASIAS MIELODISPLASICAS/ MIELOPROLIFERATIVAS</i> .....	132
2.4.3 <i>SINDROMES MIELODISPLASICOS</i> .....	133
2.4.4 <i>LMA Y NEOPLASIAS DE PRECURSORES RELACIONADOS</i> .....	134
2.4.5 <i>LMA con fenotipo mixto y t (9;22) (q34;q11.2)</i> .....	135
2.5 <i>CARIOTIPOS PATOLOGICOS EN PACIENTES CON FISH NORMALES Y CARIOTIPOS NORMALES EN PACIENTES CON FISH PATOLOGICO</i> .....	136
2.6 <i>ANALISIS ESTADISTICO</i> .....	137
3.-SONDAS FISH UTILIZADAS EN CADA ENTIDAD .....	144
<i>NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS SIN ESPECIFICAR</i> .....	145
<i>LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA</i> .....	145
<i>MIELOFIBROSIS</i> .....	146

<i>POLICITEMIA VERA</i> .....	147
<i>TROMBOCITEMIA ESENCIAL</i> .....	147
<i>NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS MIELOPROLIFERATIVAS S/E</i> .....	148
<i>LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA ATÍPICA</i> .....	148
<i>LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA CRÓNICA</i> .....	149
<i>CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILINAJE</i> .....	149
<i>SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS S/E</i> .....	149
<i>ANEMIA REFRACTARIA</i> .....	152
<i>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y NEOPLASIAS DE PRECURSORES RELACIONADOS S/E</i> .....	152
<i>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON INVERSIÓN 16</i> .....	154
<i>LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA CON t (15,17)</i> .....	154
<i>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON FENOTIPO MIXTO CON t (9,22)</i> .....	156
<i>3.2 VISIÓN GLOBLAL DEL SONDAS</i> .....	157
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>161</b>
1.-COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH.....	162
1.1 DISCREPANCIAS FISH – CARIOTIPO EN NEOPLASIAS MIELOIDES.....	162
1.2 CONCORDANCIAS FISH-CARIOTIPO.....	171
2.-CRITERIO DE SELECCIÓN DE SONDAS.....	181
<i>DIFERENCIAS ENTRE LOS RESULTADOS DE NUESTRAS SONDAS Y LAS DE     OTROS ESTUDIOS</i> .....	181
<i>¿CUANTO DEBERÍAMOS ACOTAR LAS SONDAS A UTILIZAR?</i> .....	187
<i>Del (5)</i> .....	187
<i>Cromosomas 7 y 8</i> .....	189
<i>Gen BCR-ABL</i> .....	190
3.-VALORACIÓN DEL PROTOCOLO UTILIZADO.....	190
DIFICULTADES.....	197
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>200</b>
CONFLICTO DE INTERESES.....	207
APORTACION.....	207
<b>ANEXO DE TABLAS</b> .....	<b>208</b>
<b>ÍNDICE DE TEMAS</b> .....	<b>254</b>
<b>INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS</b> .....	<b>260</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>267</b>



A pesar de que la citogenética convencional se considera el *gold estándar* para detectar anomalías cromosómicas en muchas mielopatías, la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) se utiliza cada vez más. Entre otras consideraciones, su mayor sensibilidad permite estudiar células con bajos índices mitóticos y deleciones pequeñas, no detectables por el cariotipo convencional (Rigolin GM, et al 2001). El objetivo de este estudio es evaluar la contribución real de análisis de FISH en el diagnóstico citogenético de las neoplasias mieloides.

El presente trabajo estudia las 5.942 historias en soporte papel y las 939 informatizadas, que recogen los resultados de las muestras de médula ósea recogidas para cultivo y diagnóstico entre 1999 y 2009, en la Sección de Citogenética del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias. Con las cuales, tras eliminar los deficitarios, creamos una base de datos informatizada con 3.409 muestras.

16

Registramos los hallazgos clínicos y las alteraciones genéticas detectadas mediante cariotipo y FISH para cada muestra. Analizamos estadísticamente la concordancia entre los resultados de cada test para cada entidad mieloi-de. Profundizamos en el estudio de los 1.684 pacientes con diagnósticos de patologías mieloides, considerando que este grupo es subsidiario de nuevas terapias dirigidas que modifican sustancialmente el pronóstico, motivo por el que su correcto y pronto diagnóstico llega a ser trascendental. De entre estos pacientes, 602 tenían resultados válidos comparables de FISH y cariotipo

Del análisis resulta que el número de estudios de FISH realizadas a cada paciente es variable (1-11 sondas). Los estudios de FISH confirmaron los

hallazgos citogenéticos de las bandas G en un 82,05% (494/602) de las muestras mieloides. Entre éstas, 15,18% (75) eran patológicas y 84,81% (419) normales. La FISH detectó patología en un 12,45% (75/602) de los casos en los que el estudio citogenético diagnosticó normalidad. De los cariotipos no valorables, un 22,59% (61/270) eran patológicos según FISH y el resto normales.

Estas discrepancias pueden deberse al menor índice mitótico de algunas patologías, en las cuales la FISH cuenta con ventaja respecto al cariotipo, pudiendo diagnosticar en células en interfase.

17 Tras comparar los resultados de FISH y cariotipo obtenidos, impresiona conveniente hacer la FISH como primera opción diagnóstica para: Las LMA y NPR S/E y las LMA con FM con t(15,17), los SMD en los análisis evolutivos post diagnóstico inicial, los SMD S/E, las leucemias en remisión, las neoplasias iatrogénica, las LMC, las LMCa y los diagnósticos iniciales de los SMD en los casos en que el cariotipo convencional no ha sido concluyente.

Interesa consensuar la incorporación del cuestionario Euro Quol (EQ-5D) a la solicitud, la definición de patológica a las muestras con un 5 a 10% de núcleos patológicos y el orden de preferencia y condiciones de la muestra a enviar para el estudio, respecto a los demás participantes del diagnóstico (muestras subóptimas limitan los resultados).

Vemos que la FISH puede proporcionar información pertinente sobre aquellas mielopatías en las que el análisis citogenético convencional no tuvo éxito, además de ofrecer información sobre los cariotipos cuyo análisis citogenético convencional es inválido o normal pero la clínica sugiere otra

cosa. Su aportación no es igual en todas las patologías mieloides, destacando en particular su importancia en los SMD.



Existe un conjunto de neoplasias hematológicas en las que se han descrito alteraciones citogenéticas más o menos específicas que, de ser detectadas, contribuyen al diagnóstico de la enfermedad. La mayoría de las neoplasias hematológicas son causadas por la expansión clonal de una célula que ha adquirido una mutación somática en un alelo de un gen que interviene en el proceso de maduración y división celular (proto-oncogén). Este gen mutado, ahora llamado oncogén, estimula de forma inapropiada la proliferación celular, favoreciendo el desarrollo de cáncer.

La oncohematología abarca un heterogéneo grupo de enfermedades que difieren en etiología, historia natural, pronóstico y respuesta al tratamiento. La disponibilidad actual de nuevas terapias selectivas dirigidas a los distintos grupos de riesgo, hacen que un correcto diagnóstico y clasificación sean clave para identificar los subtipos específicos -con características biológicas particulares- que los hacen susceptibles a distintos tratamientos (García Miranda JL, Cruz J, Acosta MT, Carrasco JL, Otero A 1995). En los últimos años se han incorporado avances en inmunofenotipo y análisis genético y molecular a la que sigue siendo la base del diagnóstico: la morfología.

Si bien el bandeo cromosómico sigue siendo la técnica "gold standard" en varias neoplasias mieloides, y permite valorar todo el cariotipo de una vez, la FISH se ha venido utilizando de manera creciente, como complemento al cariotipo, puesto que es más sensible y permite analizar células con un índice mitótico bajo, indetectable mediante la citogenética convencional. Sin embargo, considerando que la FISH solo aporta información sobre una zona específica y determinada, habría que analizar que sondas específicas elegir para cada patología.

El propósito principal de este trabajo es valorar la aportación de los estudios FISH en pacientes con neoplasias mieloides. Compara los resultados obtenidos mediante cariotipo convencional y FISH, sabiendo que pese a la diferencia de costes de ambas pruebas, la FISH puede aportar información relevante respecto al pronóstico, lo que influye en un tratamiento más adecuado.

23

La gran diversidad de características clínicas, morfológicas, inmunohistoquímicas y genéticas de los tumores de los tejidos hematopoyéticos, se traduce en la existencia de gran cantidad de sistemas de clasificación: Rappaport (Rappaport 1966), Kiel Lukes y Collins (Lukes-Collins 1992), Working Formulation (National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas 1982), Revised European-American Classification o REAL (Harris 1994), French-American-British system (JM Bennett 1989), OMS (Jaffe 2001) Y puesto que la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de diciembre de 2008 (Swerdlow 2008) es la más aceptada actualmente y considera criterios genéticos, nos vemos obligados a partir de la publicación de la misma, a rediseñar el análisis de todos los datos, adecuándola a esta última. Se basa en criterios morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos. Debido a que la causa subyacente de la mayoría de estas neoplasias aún son desconocidas, y pueden variar, esta clasificación utiliza toda la información disponible para definir las enfermedades, sin decantarse por un "gold standard" común a todas las enfermedades, porque en cada una la importancia de cada tipo de diagnóstico tiene un peso específico distinto.

En la mayoría de las neoplasias mieloides se encuentran alteraciones genéticas. Su estudio orienta sobre el pronóstico de la enfermedad, y los resul-

tados obtenidos con las técnicas disponibles actualmente permiten definir entidades clínicas diferentes (Swerdlow 2008). A continuación resumimos la clasificación actual.

**CLASIFICACIÓN DE LA OMS DE LOS TUMORES DE TEJIDOS LINFOIDES Y HEMATOPOYÉTICOS (4ª EDICIÓN, 2008).**

El reciente descubrimiento de la JAK2 V617F y mutaciones dentro de las NMP ha dado lugar a una reclasificación completa de los trastornos mieloproliferativos en 2008 por la Organización Mundial de la Salud (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008) y ha provocado una carrera para ofrecer terapias correspondientes de drogas.

Al final del trabajo, en el Anexo de Tablas pueden ver la Tabla 29 que describe la clasificación completa actual de los tumores de tejidos linfoides y hematopoyéticos.

Esta clasificación incluye entidades determinadas en parte por anormalidades genéticas, comprendiendo reordenamientos genéticos debidos a translocaciones cromosómicas y a mutaciones específicas, por tanto la determinación de alteraciones genéticas debería realizarse siempre que fuese posible.

Cabe llevar a cabo un análisis citogenético completo de médula ósea al inicio de la evaluación del paciente para establecer su perfil citogenético y a intervalos regulares para disponer de evidencia de la evolución genética (García Miranda 1995). En algunos casos RT-PCR y/o FISH puede detectar

reordenamientos genéticos que están presentes en un bajo porcentaje pero no se observan en el análisis cromosómico inicial.

En nuestro trabajo vamos a revisar exclusivamente las neoplasias mieloides, y dentro de ellas, de un modo más específico, las siguientes:

Tabla 1: Entidades mieloides que estudiaremos en este trabajo

Neoplasias mieloides	
	Neoplasias mieloproliferativas
	Leucemia mieloide crónica <i>BCR-ABL 1</i> positiva
	Policitemia vera
	Mielofibrosis primaria
	Trombocitemia esencial
	Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas.
	Leucemia mielomonocítica crónica
	Leucemia mieloide crónica atípica, <i>BCR-ABL 1</i> negativa
25	Síndromes mielodisplásicos
	Anemia refractaria.
	Citopenia refractaria con displasia multi-linaje.
	Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias de precursores relacionados.
	LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
	LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>

## 1. NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)

La última clasificación de la OMS ha cambiado la nomenclatura de “enfermedades” mieloproliferativas a “neoplasias” mieloproliferativas, y los nombres de sus subgrupos también se han cambiado para relacionarlos con su naturaleza neoplásica.

Además, ha sido influenciada por dos hechos: el descubrimiento reciente de las anomalías genéticas involucradas en la patogénesis de las entidades BCR-ABL1 negativas y el mayor conocimiento sobre manifestaciones histológicas (morfología y topografía megacariocítica, cambios estromales en la médula ósea e identificación de linajes celulares específicos involucrados en la proliferación) que se correlacionan con manifestaciones clínicas y pueden ser criterios diagnósticos para los subtipos de las NMP. (Thiele 2006)

26

Las neoplasias mieloproliferativas son alteraciones clonales hematopoyéticas de las células stem, caracterizadas por la proliferación de uno o más de los linajes mieloides.

Sobre todo, son neoplasias de adultos con dos picos de frecuencia en la quinta y en la séptima década de la vida, pero algunos subtipos, en especial la leucemia mieloide crónica y la trombocitemia esencial, también se diagnostican en niños.

La incidencia anual de todos los subtipos combinados es de 6 a 10 por cada 100.000 habitantes (Johansson 2004).

Inicialmente, las neoplasias mieloproliferativas se caracterizan por hiperplasia de la médula ósea con maduración hematopoyética efectiva y aumento del número de granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas en la fase de proliferación blástica. La esplenomegalia y hepatomegalia son frecuentes y se deben a un exceso del secuestro de células sanguíneas o la proliferación anormal de células hematopoyéticas. Pese a este comienzo, todos los subtipos pueden progresar hasta fallo medular por mielofibrosis, hematopoyesis ineficaz, o evolucionar a una fase aguda.

La mayoría, si no todas las NMP, están asociadas a anomalías clonales de los genes que codifican para las proteínas citoplasmáticas o sus receptores. Y las alteraciones derivadas de esto, se traducen en que se activan señales de transducción que llevan a una proliferación anormal, dato que finalmente señala que la proliferación mieloide es más neoplásica que reactiva.

27

La mutación JAK2 V617F se encuentra, en mayor o menor grado, en:

- ✓ Policitemia vera (PV)
- ✓ trombocitemia esencial (TE)
- ✓ mielofibrosis primaria (MF)
- ✓ leucemia neutrofilica crónica (LNC)

y también en la leucemia mieloide crónica atípica (LMCa) que actualmente pertenece a otro grupo de entidades.

Sin embargo, un paso más en desentrañar el misterio de las NMP es su respuesta selectiva a imatinib (Gleevec®). (Virgili A 2010) Si bien la masto-

citosis, responde bien al tratamiento con Gleevec®, la leucemia eosinofílica crónica no lo hace (www.gleevec.com 2011)

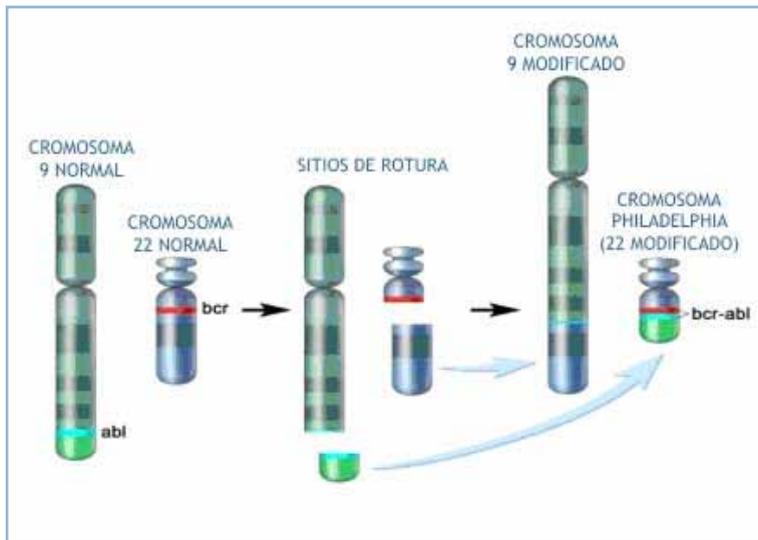
### 1.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA BCR-ABL 1 POSITIVA (LMC)

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa originada en una célula madre pluripotencial anormal, asociada a la fusión de los genes BCR y ABL1, localizados en el cromosoma Philadelphia (Melo 2007). Aunque el hallazgo fundamental suele ser la leucocitosis neutrofílica, la alteración BCR-ABL 1 se encuentra en todas las células mieloides, así como en algunas linfoides y en las células endoteliales. Comienza con una fase crónica indolente, seguida de una fase de aceleración y luego de una fase blástica, o ambas a la vez. (Carrasco Juan JL, Hernández García MT, Otero A, Vilar MC, Marsá L, González Brito G, García Miranda JL, Hernández Nieto L 1992) (Cotta 2007).

28

**Características genéticas:** En el 95% de los casos está presente el cromosoma Philadelphia, que se forma cuando se fusionan el gen BCR del cromosoma 22 con el gen ABL1 del cromosoma 9 (translocación recíproca t(9;22)(q34;q11.2)). (Cigudosa JC, Acosta Almeida MT, Carrasco V, Bello T, Carrasco JL, Otero Gómez A, García Talavera J, García Miranda JL. 1995) El gen c-ABL codifica de forma fisiológica una proteína con actividad tirosina-kinasa (TK) receptor-independiente, que participa en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.

Imagen 1: Formación de BCR-ABL, modificado de Terese Winslow (Winslow 2010)



29

En el 5% de los casos se cuentan otras translocaciones adicionales que afectan a un tercer o cuarto cromosoma.

Se han descrito también dos translocaciones crípticas  $t(9q34)$  y  $t(22q11.2)$  que no pueden identificarse mediante análisis citogenéticos rutinarios, sino mediante técnicas de FISH, RT-PCR o Southern blot.

La FISH demuestra que un grupo de pacientes presenta una gran deleción del cromosoma 9. Esta alteración ocurre en el momento de la translocación y es más frecuente en casos de translocaciones variantes. Muchos pacientes presentan también una pequeña deleción en el cromosoma 22. Esta pérdida está asociada a resistencia al interferón y un peor pronóstico.

También hay pacientes que no muestran la translocación  $t(9;22)$  pero se detecta el reordenamiento BCR/ABL a nivel molecular. Esta entidad es cla-

sificada por algunos como LMC Phi negativa y la veremos más adelante como LMC atípica BCR-ABL negativas.

El gen BCR-ABL1 genera una proteína mutante (p230 o variantes de ésta) con elevada actividad tirosina quinasa, que activa cascadas de segundos mensajeros intracelulares.

Las implicaciones de la proteína p230 en el desarrollo de la LMC se pueden resumir en tres acciones biológicas clave, que resumen la patogenia de la LMC: Estimulación de la proliferación celular, Inhibición de la adhesión de las células leucémicas al estroma medular e inhibición de la apoptosis.

El conocimiento de estas alteraciones en la comunicación intracelular permite el diseño de moléculas sintéticas que tengan como objetivo bloquear la actividad enzimática de BCR-ABL1, como por ejemplo el imatinib®, que fue la primera molécula usada con éxito en la LMC, que actúa interrumpiendo las señales oncogénicas, y es bastante eficaz si se utiliza en las fases precoces. Sobretodo para el tratamiento de leucemias asociadas a ABL1 y otros reordenamientos involucrados en los genes de la tirosinkinasa (Druker 2006). Las bases moleculares que determinan la transformación desde la fase indolente no se conocen.

Pueden aparecer anomalías citogenéticas adicionales meses antes del desarrollo de la fase blástica (FB). Las más frecuentes son +8, +Ph, i(17q), +19, -Y, +21 y -7 (Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, García Miranda JL, Trujillo González M, Herrera Fernández M, Bello Hernández T 1992), con diferente frecuencia dependiendo del linaje de la transformación blástica. También pueden observarse las alteraciones citogenéticas que se encuentran en las LMA y síndromes mielodisplásicos (SMD) *de novo*. La amplifica-

ción de BCR-ABL ha sido asociada a la refractariedad al tratamiento con imatinib mesilato. (Deininger 2003) También se han implicado en la progresión de la enfermedad a las alteraciones en genes supresores de tumores como p53, RB1 y p16. Y por último, durante el estadio de transformación, es frecuente el hallazgo de genes alterados (MYC, p16, TP53...) aunque se desconoce su papel en dicha transformación (Melo 2007).

La citogenética convencional tiene la ventaja de detectar evolución clonal, es decir, la aparición de alteraciones genéticas secundarias. Sin embargo, una vez alcanzada la respuesta citogenética, la técnica se hace poco sensible puesto que, habitualmente, se analizan 20 metafases.

FISH: es la técnica más adecuada en fase de remisión citogenética, ya que permite analizar un número elevado de núcleos.

31

PCR: es la técnica más sensible, detectando la presencia de transcritos de ARN, por lo que se utiliza para la detección de enfermedad mínima residual (EMR). (Cigudosa JC 1996)

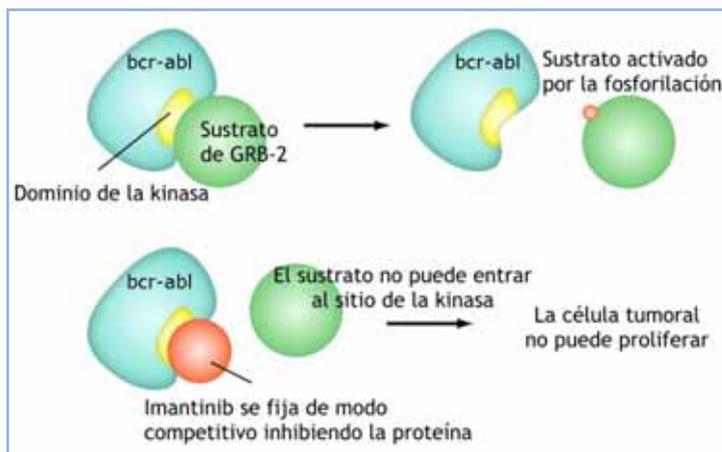
**Pronóstico y factores predictivos:** la supervivencia media antes de la existencia y utilización de tratamiento efectivo era de 2 – 3 años. Con el uso de quimioterapia convencional se aumentaba a 4 años, con interferón  $\alpha$  se retrasó la progresión y se aumentó la supervivencia media a seis años.

Con trasplantes alogénicos, según el estadio y edad del paciente, tipo de donante y existencia o no de mielofibrosis previa al trasplante, se consiguió alcanzar los 10 años.

Los factores de peor pronóstico son la edad avanzada, un recuento muy elevado de células blancas en sangre periférica, anemia severa, esplenomegalia gigante, alto porcentaje de blastos en médula y sangre, trombocitosis severa y aparición de nuevas alteraciones citogenéticas.

Pero, el factor pronóstico más importante es la respuesta inicial al tratamiento a nivel hematológico, citogenético y molecular. Actualmente, con imatinib se obtiene una remisión completa a nivel citogenético de hasta el 90%, con una supervivencia libre de progresión a los cinco años del 95%.

Imagen 2: Mecanismo de acción del Imatinib® modificado de I. Miles (Isabelle 2010)



## 1.2 POLICITEMIA VERA (PV)

La PV es una neoplasia mieloproliferativa crónica en la que se produce una proliferación anormal de células madres pluripotenciales, que da lugar a una hematopoyesis clonal de hematíes, granulocitos y plaquetas, predomi-

nando la hiperplasia eritroide, independiente de los mecanismos normales que regulan la producción. Consta de 3 fases: 1ª: pródromos prepolicitémi- cos con leve eritrocitosis, 2ª: policitémica, con aumento importante de la fase eritrocitaria, 3ª: mielofibrótica post policitémica, con citopenias debi- das a hematopoyesis ineficaz, fibrosis de medula ósea, hematopoyesis ex- tra medular e hiperesplenismo. Algunos pacientes evolucionan a SMD y/o a leucemias (McMullin 2005)

**Características genéticas:** La alteración genética más frecuente es la mutación en JAK2 V617F u otra mutación funcionalmente similar, que junto con la valoración morfológica celular típica, permitirán el diagnóstico en esta fase precoz. Si bien sucede en el 95%, no es específico de la PV y existe en otros SMP, aunque en una frecuencia mucho menor. No se ha encontrado una mutación específica de la PV

33

En el momento del diagnóstico, en el 20% de los casos se diagnostica al- guna alteración genética, siendo característico encontrar pérdida o ganan- cia de material genético. Las 5 alteraciones más frecuentes son:

- ✓ +9.
- ✓ +8 (a veces se da conjuntamente a +9)
- ✓ Del(20q).
- ✓ Del (9 p)
- ✓ Del (13q).

Dos tercios de los casos citogenéticamente anormales tienen al menos una de estas y el 100% de los que desarrollan SMD o LMA tienen alguna altera- ción genética. La adición de la FISH aumenta el número de anomalías

genéticas detectadas y ayuda al conocimiento de la patogenia de la enfermedad.

En esta fase inicial de la enfermedad no hay cromosoma Philadelphia ni gen de fusión BCR-ABL1, que si aparecen en estadios más avanzados, y llega a existir en el 90% de los pacientes en fase post-PV (Andrieux 2005).

**Pronóstico y factores predictivos:** Con los tratamientos disponibles actualmente, la media de supervivencia ronda los 10 años, pero no hay consenso sobre el peso específico de los factores de riesgo distintos de la edad avanzada.

La mayoría de los pacientes fallece por hemorragia o trombosis, predisposición para la cual los factores no están bien definidos.

Algo más del 20% fallece por SMD o LMA, si bien la incidencia de transformación a SMD y a LMA es sólo del 2-3% en pacientes que no fueron tratados con agentes citotóxicos, y aumenta hasta el 10% o más, dentro del grupo de los que son tratados con algunos agentes quimioterápicos (Marchioli 2005).

34

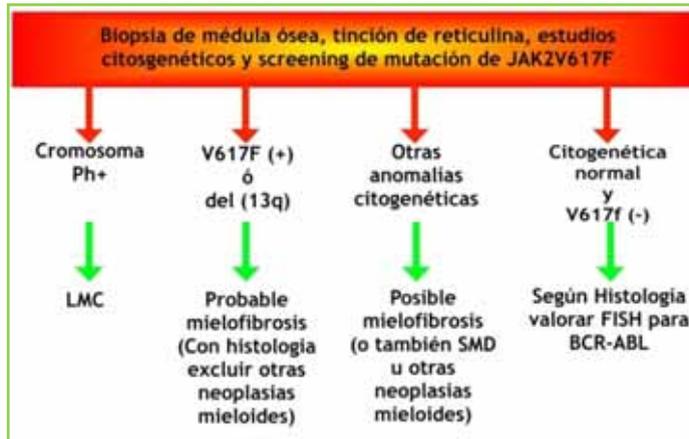
### 1.3 MIELOFIBROSIS PRIMARIA (MF)

La MF es una neoplasia mieloproliferativa crónica caracterizada por mieloproliferación, que al desarrollarse genera un depósito de tejido fibroconectivo y hematopoyesis extramedular. Comienza con una fase prefibrótica caracterizada por hiper celularidad medular, con fibrosis reticulínica mínima o ausente, que evoluciona con una importante fibrosis reticulínica o de colágeno en la MO y frecuentemente osteoesclerosis. Este estadio se caracteriza por leucoeritroblastosis sanguínea con eritrocitos en forma de lágri-

ma, hepato y esplenomegalia (Mesa 2007). En un número desconocido aparece como una patología hereditaria autosómica recesiva (Roszbach 2006). En los estadios iniciales hay un aumento de progenitores CD34+ en la MO pero no es sangre periférica. Solo en el estadio final conocido como metaplasia mieloide estos aparecen ampliamente distribuidos además de una esplenomegalia importante (Ni 2005). En la fase fibrótica, un 50% de los pacientes tiene la mutación de JAK2 V617F, aunque no es específico de la MF, pues también sucede en la Policitemia Vera y en la Trombocitemia esencial (Cervantes 2005).

**Características genéticas:** Se pueden observar alteraciones citogenéticas en más del 30% de los casos (Reilly 2002), siendo las más frecuentes las alteraciones numéricas de los cromosomas 1 (trisomía parcial), 7, 8 y 9, y las estructurales de 1q, 5q, 13q y 20q (delección). Las alteraciones de los cromosomas 5 y 7 se han asociado al uso de un tratamiento citotóxico previo. La presencia de del(13)(q12-22) o der(6)t(1;6)(q21-23;p21.3) son muy sugestivas de MF pero no diagnósticas. (Dingli 2005). La aplicación de la genética molecular (FISH) detecta deleciones de 13q14, lo que sugiere que existe a ese nivel un gen supresor, patogénicamente importante en la MF. Aproximadamente el 50% de los pacientes con MF tienen la mutación JAK 2 V617F, que no es específica, pues existe en el 95% de las PV. No se ven cromosomas Philadelphia ni genes BCR-ABL1.

Imagen 3: Diagnóstico diferencial de la Mielofibrosis



Dada la gran heterogeneidad en la forma de presentación de la MF, su diagnóstico diferencial es muy amplio.

**Pronóstico y factores predictivos:** La MF sigue un curso crónico, caracterizado por la anemización progresiva, molestias derivadas por la esplenomegalia y los síntomas constitucionales. El rango de supervivencia varía de meses a décadas. Depende en gran medida en qué estadio es diagnosticada. La supervivencia media ronda los 3 a 7 años en pacientes diagnosticados en fase fibrótica, que contrasta con los 10 a 15 años que sobreviven aquellos pacientes diagnosticados precozmente en la fase prefibrótica.

Los factores predictivos negativos son: > de 70 años, Hb < 10mg/dl, < de  $100 \times 10^6$  plaquetas/L y alteraciones en el cariotipo.

La causa más frecuente de morbimortalidad es el fallo de medula ósea. Las infecciones, las hemorragias y las complicaciones vasculares constituyen las causas habituales de muerte. Otras son por trombo embolismos, hipertensión portal, fallo cardíaco de origen hemosiderótico, insuficiencia hepatoce-

lular secundaria a la metaplasia mieloide masiva del hígado y leucemia mieloide aguda (LMA). La frecuencia de aparición de LMA, de mal pronóstico, varía del 5 al 30% a los 10 años, aumentando en pacientes esplenectomizados (Tefferi, Myelofibrosis with myelosis metaplasia 2000). Si bien algunos se relacionan a tratamiento citotóxico previo, otros casos se dan en pacientes que nunca fueron tratados, lo que apoya la teoría de que la LMA es parte de la evolución natural de la MF.

#### 1.4 TROMBOCITEMIA ESENCIAL (TE)

La TE es una NMP caracterizada por un incremento persistente de la cifra de plaquetas por encima de  $450 \times 10^9 /L$  en sangre periférica, con hiperplasia megacariocítica de la médula ósea. Esta cifra de plaquetas es menor que la establecida en los criterios diagnósticos de trombocitemia esencial ideados por el PVSG en 1997, que era más alta ( $>600 \times 10^9 /L$ ) y que ha sido sustituida por la clasificación actual de la OMS, que al considerar más adecuado el valor de  $450 \times 10^9 /L$ , para descartar pacientes con patologías "TE like", incorpora otros 3 criterios diagnósticos que deben darse simultáneamente a ese recuento plaquetario, para diagnosticar a un paciente de TE :Biopsia de MO con proliferación de megacariocitos y ausencia de aumento de eritropoyesis o granulopoyesis; no reunir criterios diagnósticos de PV, MF, LMC BCR-ABL1 +, SMD u otra NMP; y JAK2 V617F u otro marcador clonal positivo, o en ausencia de marcadores, ausencia de evidencia de trombocitosis reactiva (Jensen 2000).

**Características genéticas:** No posee marcadores citogenéticos o moleculares específicos, tal que su diagnóstico es por exclusión respecto al resto de las NMP. La existencia de BCR-ABL1 excluye su diagnóstico, y la presen-

cia de la mutación JAK2 V617F -que existe en un 40-50% de los casos y no es específica- descarta la trombocitosis reactiva. De un 5 a un 10% de los cariotipos pueden presentar alteraciones de 9q, +8, y la Del (20q).

**Pronóstico y factores predictivos:** La escasa literatura relativa al pronóstico de la TE es contradictoria. Esto se debe, probablemente, al reducido número de pacientes, a la heterogeneidad de la presentación y evolución, así como al hecho de que la detección de una fase fibrótica o de transformación leucémica requiere un seguimiento prolongado.

Está caracterizada por ser una enfermedad indolente, con largos intervalos asintomáticos, interrumpidos ocasionalmente por episodios tromboembólicos o de hemorragias. Si bien es infrecuente, transcurridos muchos años, algunos pacientes pueden desarrollar fibrosis asociada a metaplasia mieloi-de. Aproximadamente 5% de los casos sufren transformación de la TE a LMA o a SMD, y suele estar en relación con el tratamiento citotóxico previo.

38

La supervivencia media es de 10 a 15 años, y considerando que la edad habitual de debut de la enfermedad es avanzada, el fallecimiento puede coincidir con la expectativa de vida previa a la enfermedad. Hace falta reunir más datos de pronóstico una vez que se hayan aplicado los criterios diagnósticos de la OMS válidos actualmente.

## 2. NEOPLASIAS MIELODISPLASICAS / MIELOPROLIFERATIVAS

Incluye las neoplasias clonales que en el momento del diagnóstico reúnen algunos criterios morfológicos, clínicos o de laboratorio propios de alguna NMD, a la vez que poseen otros de una entidad del grupo de las NMP. Están caracterizados por hiper celularidad en la MO a cargo de la proliferación de una o más líneas celulares mieloides, con aumento de células circulantes en sangre, que poseen displasias funcionales o morfológicas; a la vez que se manifiesta citopenia de una o más líneas celulares por proliferación ineficaz.

El porcentaje de blastos en sangre suele ser <20%. Si bien, la hepatoesplenomegalia es frecuente, el resto de síntomas incluye todos los posibles, tanto en las NMP como en las NMD. No procede incluir en esta categoría a los pacientes que desarrollan displasia y/o hematopoyesis ineficaz, como parte de la evolución de una neoplasia mieloproliferativa diagnosticada tras recibir tratamiento quimioterápicos. Como tampoco a los pacientes que presenten el gen BCR-ABL1. Las entidades que abarca están indicadas a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Neoplasias mielodisplásicas / Neoplasias mieloproliferativas

NMD / NMP
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)
Leucemia mieloide crónica atípica BCR-ABL - (LMCa)
Leucemia mielomonocítica juvenil
NMD / NMP inclasificable
Anemia refractaria con sideroblastos anillos y trombocitosis (ARS-T)

A la vista de la inexistencia de mutaciones específicas que sugieran reubicar estas entidades en otra categoría de neoplasia mieloide, de momento

quedan situadas en este “híbrido” inespecífico. El subgrupo que genera mayor controversia de entre estas NMD/NMP es el de la ARS-T. Pues la mayoría de estos casos que se han estudiado presentan la mutación JAK2 V617 y no se llega a un consenso respecto a su clasificación. Por esto de momento queda como una entidad provisional (Szpurka 2006).

## 2.1 LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA (LMMC)

La LMMC es una enfermedad clonal hematopoyética con características tanto de las neoplasias mieloproliferativas, como de los síndromes mielodisplásicos. Se caracteriza por: monocitosis persistente  $> 1 \times 10^9 / L$  en sangre periférica, ausencia de cromosoma Philadelphia y del gen BCR-ABL, no existe reordenamiento PDGFRAA o PDGFRAB, menos de 20 % de blastos en MO y sangre periférica y displasia en una o más líneas celulares mieloides. En ausencia de mielodisplasia puede diagnosticarse si existe una alteración citogenética adquirida en alguna célula hematopoyética, o la monocitosis persiste más de 3 meses o se excluyen otras causas de mielocitosis. La LMMC presenta un amplio espectro de manifestaciones, desde las predominantemente mielodisplásicas a las mieloproliferativas. La mutación JAK2 V617F es infrecuente.

40

**Características genéticas:** De un 20 a un 40% de los pacientes presentan anormalidades genéticas, pero ninguna es específica. Las anormalidades más frecuentes son +8, -7 del (7q) y anormalidades estructurales del 12p. Tanto como el 40% de los pacientes tienen mutación del gen RAS al momento del diagnóstico o en el curso de la enfermedad (Willman 1998). Los casos de SMD/NMP con eosinofilia asociados a la t(5;12)(q31-33 p12) y

el gen de fusión ETV6-PDGFRB, que antiguamente se consideraban LMMC, ahora se consideran una entidad distinta.

**Pronóstico y factores predictivos:** La supervivencia de los pacientes con LMMC varía de 1 a más de 100 meses y la supervivencia media ronda entre los 20 y los 40 meses. De un 15 a un 30% de los casos evolucionan a LMA. Los parámetros considerados como factores pronósticos son la esplenomegalia, la severidad de la anemia y el grado de leucocitosis. De todos modos, en la mayoría de los estudios, el porcentaje de blastos en MO y SP es el factor más importante para la determinación de la supervivencia (Germing 2004).

## 2.2 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA ATIPICA BCR-ABL1 - (LMCa)

41

La LMCa es una NMP con características mielodisplásicas y mieloproliferativas desde el principio del diagnóstico. Se caracteriza por la afectación de los neutrófilos y leucocitosis debida al aumento de la displasia morfológica de los neutrófilos y sus precursores. Además, es frecuente la displasia multilineaje y refleja el origen de esta patología en las células madres. Esta neoplasia característicamente no posee el gen de fusión BCR-ABL1. No se sabe la incidencia exacta de la LMCa, pero se considera que existen 1-2 casos por cada 100 casos de LMC BCR-ABL1 positivas (Shepherd 1987). Generalmente se da en pacientes ancianos. En las pocas series documentadas hasta ahora, se registra una edad media de 70 a 80 años, si bien también ha sido diagnosticada en adolescentes. La relación hombres/mujeres diagnosticados varía mucho en las distintas series, pero casi no se encuentra diferencia significativa en la incidencia si se desagrega por sexos (Kurzrock 2001).

**Características genéticas:** El 80% de los pacientes con LMCa presenta anomalías genéticas, de entre las cuales las más frecuentes son: +8, del(20 q), y también se han informado anormalidades en los cromosomas 12,13, 14, 17 y 19 (Brescia 2006). La mayoría de los pacientes a los que se les diagnostica un isocromosoma 17q, pese a que reúnan los criterios diagnósticos para LMMC, presentan una LMCa (McClure 2005). No presentan el gen de fusión BCR-ABL1. Otras alteraciones encontradas en LMCa fueron: Mutación de JAK 2 V617F, y mutación de KRAS o NRAS en aproximadamente un 30% de los casos (Vardiman 2006) .

**Pronóstico y factores predictivos:** Las series de datos disponibles actualmente incluyen pocos pacientes, con una vida media de entre 14 y 29 meses. Los factores predictivos negativos son: tener más de 65 años, ser mujer, trombocitopenia, Hb < 10 g/dL y >50x 10<sup>9</sup>/L leucocitos. Los pacientes que reciben trasplantes de medula ósea mejoran su supervivencia. De un 15 a un 40% de las LMCa evolucionan a LMA (Kurzrock 2001).

### 3. SINDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD)

43

Los Síndromes mielodisplásicos son un grupo de NMP caracterizadas por que se dan de forma simultánea la proliferación y la apoptosis de las células hematopoyéticas, displasia en una o más líneas celulares, hematopoyesis ineficaz con aumento de posibilidad de evolucionar a leucemia mieloide aguda, lo que implica una biopsia de MO normal o hiper celular, a la vez que citopenia/s en sangre periférica debida a la apoptosis. Si la Hb es  $<10$  g/dL, los neutrófilos  $<1,8 \times 10^9/L$  y plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$  es improbable el diagnóstico de SMD, aunque no excluye la posibilidad del mismo cuando la morfología y el perfil genético lo indican (Verburgh 2007). Son panmielopatías clonales en las que existe una mutación de la célula madre pluripotencial mieloide, dando lugar a una expansión clonal con displasia morfológica (anomalía morfológica de los precursores de la médula ósea) y funcional (hematopoyesis ineficaz), dando lugar a citopenias en sangre periférica (con gran frecuencia pancitopenia). Otras denominaciones antiguas de estos síndromes son el de anemias refractarias (por su escasa respuesta a los tratamientos) y el de síndromes preleucémicos (por la elevada frecuencia de transformación hacia leucemia aguda; de hecho, existe una incidencia de 1.000 a 10.000 veces superior de leucemias agudas a la población normal). Son las neoplasias mieloides más engorrosas para diagnosticar y clasificar. No ha habido consenso entre los miembros de la OMS respecto a utilizar como criterio de clasificación el porcentaje de blastos de células nucleadas, aunque la mayoría lo admite. La displasia puede acompañarse por un aumento de hasta un 20% de blastos en sangre periférica, si bien este límite de 20% no es rígido para el diagnóstico diferencial y consecuente tratamiento, con la LMA. Para tratar un paciente como SMD o LMA hay que tener en cuenta la edad y posibles SMD previos,

ambos datos son importantes para decantar adecuadamente a los pacientes con 30% de blastos. Si bien la evolución a LMA es parte del curso habitual de los SMD, hay una gran variedad de subtipos, sobre todo entre los SMD con gran cantidad de mieloblastos (Malcovati 2005). La etiopatogenia de los SMD secundarios a quimio y radioterapia se deben fundamentalmente a las alteraciones de los cromosomas 5 y 7. La probabilidad de desarrollo de SMD y su evolución en estos pacientes está relacionada con la dosis acumulada y el tiempo de exposición.

Tabla 3: Síndromes mielodisplásicos

SMDs
Citopenias refractarias con displasia uni-linaje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia</li> <li>• Neutropenia</li> <li>• Trombocitopenia</li> </ul>
Anemia refractaria con sideroblastos anillados.
Citopenia refractaria con displasia multi-linaje.
Anemia refractaria con exceso de blastos. <ul style="list-style-type: none"> <li>• AREB 1</li> <li>• AREB 2</li> </ul>
Síndrome mielodisplásico con del (5q) aislada.
SMD inclasificable

**Características genéticas:** Los estudios citogenéticos y moleculares juegan un papel muy importante en la valoración de los pacientes, en relación al diagnóstico correcto, a la correlación clínica citogenética y morfológica, al tratamiento y por tanto, al pronóstico. Se detectan anomalías clonales en aproximadamente el 50% de los casos de los SMD. Los SMD asociados a

del (5q) aislada suceden sobre todo en mujeres y son un tipo específico de SMD en la clasificación actual.

En los SMD secundarios a quimio y radioterapia es frecuente la aparición de la mutación de p53 y un curso clínico desfavorable. La pérdida del 17p se asocia a SMD o LMA con la anomalía de pseudo Pelger-Hüet. Los cariotipos complejos (con más de 3 anomalías) incluyen -5 o del(5q) , -7 o del(7q) y en general se asocian a peor pronóstico. Otras alteraciones genéticas parecen guardar relación con anormalidades morfológicas como la del(20q) aislada, que se relaciona con megacariocitos y eritrocitos (Gupta 2007); o las alteraciones del cromosoma 3 [inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21q26.2)] asociados a SMD o LMA con aumento de megacariocitos anormales.

45 Otras alteraciones genéticas que suceden en los SMD no son evidencia suficiente para el diagnóstico de SMN en ausencia de criterios morfológicos característicos, por ejemplo -Y, +8 o del(20q). Las anomalías detalladas en la siguiente tabla, en presencia de citopenia refractaria sin evidencia morfológica de displasia, se presumen evidencia suficiente para diagnosticar un SMD. Se aconseja hacer seguimiento estrecho a estos pacientes. La alta sensibilidad de la FISH es lo que hace que sea la técnica recomendada para monitorizar estos pacientes, una vez que se ha identificado la anormalidad cromosómica. Respecto a los SMD secundarios y pediátricos, de forma somera cabe destacar que el SMD pediátrico es de difícil clasificación, y se asocia a otros trastornos genéticos (síndrome de Down, trisomía 8, neurofibromatosis tipo 1). (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008)

Tabla 4: Frecuencia de alteraciones cromosómicas en los SMD al diagnosticarlas.

Alteración cromosómica	% de ella en SMD al Dx	% de ella en SMDt al Dx
<b>Desequilibradas</b>		
+8*	10 %	
-7 o del(7q)	10 %	50 %
-5 o del(5q)	10 %	40 %
del(20q)	5-8 %	
-Y*	5 %	
i(17q) o t(17p)	3-5 %	
-13 o del(13q)	3 %	
del(11q)	3 %	
del(12p) o t(12p)	3 %	
del(9q)	1-2 %	
idic(x)(q13)	1-2 %	
<b>Equilibradas</b>		
t(11;16)(q23;p13.3)	3 %	3 %
t(3;21)(q26.2;p22.1)	2 %	2 %
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1 %	
t(2;11)(p21;q23)	1 %	
inv(3)(q21q26.2)	1 %	
t(6;9)(p23;q34)	1 %	

\*La presencia de estas anomalías en ausencia de criterios morfológicos no es evidencia suficiente para diagnosticar un SMD. Las demás anomalías sí se consideran suficientes, independientemente de las alteraciones morfológicas.

**Pronóstico y factores predictivos:** Dado que el SMD tiene una gran heterogeneidad, tanto desde el punto de vista clínico como para su clasificación, la estratificación del riesgo es difícil de establecer. Por tanto, es necesario un sistema integrado que incluya clínica, factores citogenéticos, inmunofenotípicos, etc. De esta necesidad surge el IPSS (Malcovati 2005),

que incluye porcentaje de blastos en médula ósea, citogenética y número de citopenias. Combinando estos datos se establecen 4 grupos de riesgo con supervivencia y riesgo de transformación leucémica que permite un pronóstico individualizado. Actualmente surgen nuevos factores pronósticos por el mejor conocimiento de la etiopatogenia. Los grupos de bajo riesgo son las citopenias refractarias con displasia unilínea y las anemias refractarias con sideroblastos en anillos, y en ambos grupos, la supervivencia es menor en los casos que tienen bicitopenia en vez de una citopenia (Verbugh 2007). Los grupos de riesgo intermedio son las citopenias refractarias con displasia multilineal con o sin sideroblastos en anillos (con misma diferencia de supervivencia según tengan afectadas una o más citopenias) y la Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) tipo 1. La AREB tipo 2 tiene el peor pronóstico. Con un moderado grado de variabilidad AREB Y AREBt tienen peor pronóstico, con un rango en la media de supervivencia de 5 a 12 meses, en comparación con AR y ARS con una media de 3 a 6 años. El riesgo de transformación leucémica, según las series, va del 40% al 50% en pacientes con AREB/AREBt de alto riesgo y del 5% al 15% en AR/ARS de bajo riesgo. La AREB tipo II (> 10% de blastos) tiene peor pronóstico que AREB tipo I (< 10%). El síndrome 5q- tiene buen pronóstico y no se leucemiza. En conjunto, parece que la mediana de supervivencia actual es de 18 meses y el riesgo acumulativo de evolución a LMA es del 35% a los 5 años. Los SMD secundarios a radiaciones y quimioterapia tienen muy mal pronóstico porque asocian citogenética adversa (cromosomas 5 y 7), mielofibrosis e inmunofenotipo inmaduro.

La importancia de los estudios genéticos como un indicador pronóstico en los SMD ha sido reconocida ya, y se ha codificado por el grupo internacio-

nal de trabajo en SMD; quienes han definido tres grupos de riesgo en función de los hallazgos citogenéticos.

- ✓ Bajo riesgo: normal, del(5q) aislada, del(20q) aislada, -Y aislada
- ✓ Riesgo intermedio: otra anomalía aislada, dos anomalías
- ✓ Alto riesgo: anomalías muy complejas (>2), anomalías del cromosoma 7.

El sistema de puntuación para predecir la supervivencia y la evolución a LMA se basa en el porcentaje de blastos en MO y el tipo de anomalías genéticas y grado y número de citopenias. Según este sistema, hay 4 grados (bajo, intermedio 1 y 2, y alto) que son los que se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 5 : Índice Pronóstico Internacional (IPSS) (Malcovati 2005).

ÍNDICE PRONÓSTICO INTERNACIONAL (IPSS)						Puntos	
Grupo de riesgo							
PUNTOS	0	0'5	1	1'5	2	0	Bajo
Blastos en MO (%)	<5	5 – 10		11 – 19	20 – 30	0'5 – 1	Intermedio 1
Cariotipo	Bueno	Intermedio	Pobre			1 – 2	Intermedio 2
Citopenias	0 ó 1	2 ó 3				2'5-3'5	Alto

48

Cariotipo bueno: normal, del(5q) aislada, del(20q) aislada, -Y aislada. Cariotipo intermedio: otra anomalía aislada, dos anomalías. Cariotipo pobre: anomalías muy complejas (>2), anomalías del cromosoma 7. Citopenias: hemoglobina < 10 g/dl, plaquetas < 100x10<sup>9</sup>/l, neutrófilos < 1'8x10<sup>9</sup>/l.

En general, los grupos de mayor riesgo, son los que tienen mayor porcentaje de blastos en MO, más hallazgos citogenéticos desfavorables y una citopenia más severa. La consideración de la edad optimiza la predicción de

la supervivencia; los pacientes menores de 60 tienen mejor supervivencia que los de mayor edad.

### 3.1 ANEMIA REFRACTARIA (AR)

La AR es una citopenia refractaria con displasia unilinaje, que a su vez se encuentra dentro de los SMD. Si bien la anemia refractaria con sideroblastos en anillos, también está caracterizada por una displasia unilinaje, se considera una entidad distinta y aparte. El porcentaje de displasia recomendada para este diagnóstico es de  $\geq 10\%$ , y la citopenia de hemoglobina  $< 10\text{g/dL}$ , pese a que esos límites no son definitivos, si la morfología celular o los resultados citogenéticos confirman un SMD. Pueden observarse discordancias entre el tipo de citopenia y el linaje de las células displásicas, si bien lo habitual es que citopenia y displasia sucedan en el mismo grupo celular (Verbugh 2007). Interesa descartar otras causas posibles de la displasia hallada antes de diagnosticarla como SMD, esto implica considerar patologías inmunológicas, deficiencias de vitaminas, déficit o exceso de cobre (Irving 2003), infecciones virales, patologías congénitas o inmunológicas, exposición a toxinas o drogas, tratamientos con factores de crecimiento. La citopenia es refractaria a terapia hemática, pero responde a factores de crecimiento (Howe 2004).

49

**Características genéticas:** Un 50 % de los casos tiene alteraciones genéticas. Se observan otras muchas alteraciones cromosómicas clonales adquiridas, y si bien son útiles para el diagnóstico de la AR, son inespecíficas. Las alteraciones relacionadas con la AR incluyen del(20q), +8, y alteraciones del cromosoma 5 y/o 7. Pero el número de casos de AR declaradas es muy pequeño como para permitir generalizaciones.

**Pronóstico y factores predictivos:** El curso clínico es prolongado, la supervivencia media de los pacientes con AR en una serie es de aproximadamente 66 meses y el porcentaje de progresiones a LMA a los 5 años es del 2%. Aunque la supervivencia media en otro estudio para pacientes mayores de 70 años con AR y con del(5q) no fue diferente de la de los pacientes sin AR. Aproximadamente el 90-95 % de los pacientes con AR tiene un índice pronóstico según el IPSS de grado bajo o intermedio y un 80- 85 % tienen perfiles citogenéticos buenos a intermedios (Malcovati 2005).

### 3.2 CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILINAJE

La citopenia refractaria con displasia multilinjaje (CRDM) es un tipo de SMD con una o más citopenias y cambios displásicos en una, dos o las tres líneas celulares: eritrocitos, granulocitos o megacariocitos. En sangre periférica hay <1% blastos y en MO < del 5%. Los niveles recomendados para definir las citopenias son: Hb < 10g/dL, recuento absoluto de neutrófilos <  $1,8 \times 10^9/L$  y de plaquetas <  $100 \times 10^9/L$ . De todos modos, valores por encima de estos niveles no son excluyentes para el diagnóstico si la citogenética y la morfología son consistentes con el diagnóstico (por ej. coexisten alteraciones citogenéticas complejas). El umbral convenido para diagnosticar las displasias es de  $\geq 10\%$  en cada una de las líneas celulares afectas.

**Características genéticas:** Las alteraciones genéticas clonales presentes en las CRDM incluyen la trisomía del cromosoma 7, del(7q), monosomía del cromosoma 5, del(5q) y del(20q). En un 50% de los pacientes se puede encontrar cariotipos complejos.

**Pronóstico y factores predictivos:** El curso clínico varía. La mayoría de los pacientes con CRDM tiene un pronóstico intermedio en la categorización

de IPSS. Los factores pronóstico dependen del grado de citopenia y displasia. La frecuencia de evolución a LMA a los dos años es de aproximadamente el 10 % (Germing 2004).

#### 4. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y DE PRECURSORES RELACIONADOS

Es una enfermedad maligna clonal de la médula ósea, caracterizada por predominio de blastos, que sustituyen progresivamente el tejido hematopoyético normal, ocasionando un descenso progresivo de las células normales de las tres series hematopoyéticas. Es heterogénea clínica, morfológica y genéticamente, y puede involucrar una o todas las líneas mieloides.

51

**Epidemiología:** En el mundo, la incidencia aproximada es de 2,5 a 3 casos por cada 100.000 habitantes por año. Las leucemias agudas constituyen el 3% de las neoplasias y el 50% de todas las leucemias. La edad media del diagnóstico es a los 65 años, con una pequeña predominancia masculina en la mayoría de los países. En niños menores de 15 años, la LMA supone del 15 al 20 % de todas las leucemias agudas, con un pico de incidencia a los 3-4 años (Deschler 2006).

**Etiología:** Se ha asociado a la radiación ionizante; retrovirus, factores genéticos (los gemelos univitelinos tienen un 20% de posibilidad de patología en otro gemelo), inestabilidad cromosómica (la anemia de Fanconi, la ataxia telangiectásica y el Síndrome de Down incrementan el riesgo de leucemias agudas 10 a 20 veces respecto a la población normal) y factores químicos (benceno, cloranfenicol y alquilantes).

**Tejidos afectados:** La LMA es una enfermedad derivada de una expansión clonal de blastos mieloides en sangre periférica, medula ósea u otros tejidos

**Hallazgos clínicos:** Para diagnosticar una LMA se ha establecido un umbral de  $\geq 20\%$  blastos (mieloblastos y/o monoblastos/promonocitos y/o megacarioblastos) en sangre periférica o medula ósea. Por una parte, se caracterizan por el fracaso progresivo de la hematopoyesis, lo que conlleva síndrome anémico, neutropenia progresiva con infecciones de repetición y trombopenia progresiva con hemorragias. Otro conjunto de características clínicas se derivan de la infiltración provocada por las células leucémicas en diferentes tejidos. Así podemos encontrar hepatoesplenomegalia, adenopatías, dolor óseo, infiltración del sistema nervioso central, masa mediastínica por crecimiento del timo (aunque es más frecuente en las leucemias agudas linfoblásticas T), infiltración de piel y encías. Hay que tener en cuenta que, inicialmente, hasta el 10% de las leucemias pueden presentar un hemograma normal. A veces no se objetivan blastos en sangre periférica (leucemia aleucémica). Lo habitual es que encontremos un número progresivamente mayor de blastos en sangre periférica y médula ósea. El diagnóstico se basa en la punción medular, objetivando la infiltración por blastos superior al 30% de la celularidad medular, aunque en la actualidad se tiende a considerar más del 20%.

**Características genéticas:** El diagnóstico de sarcoma mieloide es sinónimo de LMA, independientemente del número de blastos, a menos que el paciente tenga historia previa de NMD/NMP, en cuyo caso se evidencia una transformación a LMA. Se puede diagnosticar LMA con valores por debajo de este umbral, si concurre alguna de las siguientes alteraciones cromosó-

micas: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22) o t(15;17)(q22;q12). La vigente clasificación de la WHO es posterior a la incorporación de los algoritmos diagnósticos que consideran las alteraciones genéticas, por eso, incorpora muchas novedades respecto a las clasificaciones previas.

Tabla 6 : Clasificación de las LMA según WHO(Swerdlow 2008)

**Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias de precursores relacionados.**

LMA con alteraciones genéticas recurrentes.  
 LMA con t(8 ;21)(q22 ;q22) ; *RUNX1-RUNX1T1*.  
 LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*.  
 Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*.  
 LMA con t(9 ;11)(p22 ;q23) ; *MLLT3-MLL*.  
 LMA con t(6 ;9)(p23 ;q34) ; *DEK-NUP214*.  
 LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*.  
 LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*.  
*LMA con mutación NPM1.*  
*LMA con mutación CEBPA.*  
 LMA con cambios relacionados con mielodisplasia.  
 Neoplasias mieloides relacionadas con tratamientos.  
 Leucemia mieloide aguda, NOS.  
 LMA con diferenciación mínima.  
 LMA sin maduración.  
 LMA con maduración.  
 Leucemia mielomonocítica aguda.  
 Leucemia monoblástica y monocítica aguda.  
 Leucemia eritroide aguda.  
 Leucemia megacarioblástica aguda.  
 Leucemia basofílica aguda.  
 Panmielosis aguda con mielofibrosis.  
 Sarcoma mieloide.  
 Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down.  
 Mielopoyesis pasajera anormal.

Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down.  
Neoplasia de células blásticas plasmacitoides dendríticas.

La mayoría de las alteraciones son translocaciones que afectan a factores de transcripción y junto al resto de características (morfológicas, clínicas e inmunofenotípicas) forman entidades independientes y más definidas. Las alteraciones genéticas de las LMA ayudan a dilucidar la patogénesis de la misma, proporciona información pronóstica, y debería facilitar el desarrollo de terapias específicas dirigidas más exitosas que las actualmente disponibles.

**Pronóstico y factores predictivos:** Hay que tener en cuenta que el pronóstico de las leucemias agudas mieloblásticas es siempre peor que el de las linfoblásticas, sobre todo, en aquellas formas de leucemia que surgen a partir de otros procesos hematológicos previos, tales como los síndromes mielodisplásicos. La edad superior a 60 años, alteraciones citogenéticas distintas de la t (8,21) t (15;17) e inv (16) y las formas de leucemia secundaria tienen muy mal pronóstico.

54

Tabla 7: Factores predictivos favorables y desfavorables de las leucemias agudas mieloblásticas.

FACTOR	FAVORABLE	DESFAVORABLE
Edad	Niños 1-9 años. Adultos 16-35 años.	Niños <1 y >10. Adultos > 35 años.
Sexo	♀	♂
Presencia de adenopatías, masas o visceromegalias	No	Sí
Infiltración SNC	No	Sí

Leucocitos	10.000 15.000/mm <sup>3</sup> –	> 50.000/mm <sup>3</sup>
Inmunofenotipo	Pre-B, común. Existencia de CD 10	L <sub>3</sub> tipo Burkitt. Ausencia de CD 10
Citogenética	Hiperploidía > 50	Hipodiploidía, t(9;22), Cr.Philadelphia t(4;11)
Blastos en MO las dos semanas de tratamiento	< 5%	> 25%
Remisión completa en 4 – 5 semanas	Sí	No

#### 4.1 LMA CON ALTERACIONES GENÉTICAS RECURRENTES:

55 Este grupo se caracteriza por alteraciones genéticas recurrentes que tienen significación pronóstica. La mayoría de estas alteraciones son translocaciones o inversiones equilibradas: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22), t(15;17)(q22;q12) y t(9;11)(p22;q23) (Slovak 2002). Todos estos reordenamientos crean un gen de fusión que codifica para una proteína quimérica que es necesaria, pero no suficiente para la leucogénesis (Spetch 2002). Muchos de estos grupos de enfermedades presentan particularidades inmunofenotípicas y morfológicas. Las LMA con t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22), t(16;16)(p13.1;q22) ó t(15;17)(q22;q12) se consideran LMA independientemente del número de blastos, pero con las que presentan t(9;11)(p22;q23), para ser categorizadas de LMA requieren un número de blastos inferior al 20%. Muchas de las translocaciones se detectan por PCR que tiene una mayor sensibilidad que

los análisis genéticos. Los casos de LMA derivados de tratamientos deben ser clasificados en esa categoría, refiriendo la alteración genética hallada.

#### 4.2 LMA CON INVERSIÓN DEL CROMOSOMA 16

La LMA con  $\text{inv}(16)(\text{p}13.1\text{q}22)$  o  $\text{t}(16;16)(\text{p}13.3;\text{q}22)$  ;CBFB-MYH11 es una LMA en la que generalmente hay diferenciación mono y granulocítica, y de forma característica.

**Características genéticas:** La  $\text{inv}(16)(\text{p}13.1\text{q}22)$  suele estar presente en la gran mayoría de las LMA de este subtipo de leucemias y la  $\text{t}(16;16)(\text{p}13.3;\text{q}22)$  es menos frecuente, aunque ambas provocan la fusión del 16q22 del gen CBFB con la banda 16q22 del gen MYH11. El diagnóstico de estas anomalías se diagnostica por PCR o FISH. EL 40% de los pacientes presenta una segunda alteración genética, y suelen ser: +22, +8,  $\text{del}(7\text{q})$ , +21 (Marcussi 2005).

56

**Pronóstico y factores predictivos:** Estudios clínicos han demostrado que algunos pacientes con LMA con  $\text{inv}(16)(\text{p}13.1\text{q}22)$  ó  $\text{t}(16;16)(\text{p}13.3;\text{q}22)$  consiguen remisiones completas cuando se tratan con dosis altas de citarabina en la fase de consolidación, si bien los pacientes de más edad tienen menor supervivencia (Delaunauy 2003). Los pacientes en los que coexiste +22 como segunda alteración obtienen unos mejores resultados.

### 4.3 LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA (LPA) CON TRANSLOCACION (15;17); PML -RARA

La Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12);PML-RARA es una LMA en la que predominan los promielocitos anormales. Existen dos tipos, la típica “hipergranular” y la micro (hipo) granular.

**Características genéticas:** La sensibilidad al ácido retinoico (trans) de las células de LPA, además del impacto terapéutico, ha llevado a descubrir que el gen del receptor alfa del ácido retinoico (RARA) situado en 17q12 se fusiona con el gen PML (promyelocytic leukaemia) de 15q22, dando como resultado el gen de fusión PML-RARA (Dash 2001). Unos pocos casos raros considerados “cripticos” son aquellos que no tienen la clásica t(15;17)(q22;q12), pero sí poseen translocaciones complejas que involucran al cromosoma 15 y 17, con cromosomas extra o inserciones de PML-RARA, que permiten que esta se transcriba. Un 40% de los pacientes tiene otras alteraciones genéticas, siendo la más frecuente +8, en 10 a 15% de los casos.

57

**Pronóstico y factores predictivos:** La LPA es sensible al ácido retinoico trans. El pronóstico de la LPA correctamente tratada con ácido retinoico trans y antraciclina es más favorable que ningún otro subtipo de LMA.

## 5. LMA DE LINAJE AMBIGUO

Este grupo incluye las leucemias que no muestran evidencia clara de diferenciación en ninguna línea celular. Incluye las leucemias agudas indiferenciadas y las de fenotipo mixto. Entre las entidades que forman este grupo, se diferencia la LMA con FM con t(9;22) por tener con bastante frecuencia

esta alteración genética. El diagnóstico del resto de entidades es básicamente mediante inmunofenotipo.

### LMA CON FENOTIPO MIXTO CON T(9;22) (Q34;Q11.2) BCR-ABL1

Es una leucemia que reúne los criterios de las de linaje ambiguo, con la particularidad que sus blastos tienen la translocación (9;22) (q34;q11.2). Algunos pacientes con LMC pueden tener o desarrollar una fase con blastos mixtos, que pueden reunir los criterios de LMA con FM, aunque este diagnóstico no debe darse a pacientes que ya tienen diagnosticada una LMC. Es una leucemia infrecuente, y representa aproximadamente un 1% de las LMA (Killick S 1999) .

**Características genéticas:** Todos los casos tienen la t(9;22) detectable por cariotipo, PCR o FISH, muchos casos tienen cariotipos complejos (Carbonell F 1996).

**Pronóstico y factores predictivos:** Tiene un mal pronóstico, parece ser peor que en otros pacientes con LMA con FM. No hay factores conocidos que puedan predecir peor o mejor pronóstico. Se espera que Imatinib u otros inhibidores de la tirosinkinasa pudiesen ser útiles en el tratamiento (Killick S 1999), pese a que no hay datos disponibles que permitan sentencias ciertas respecto a esto.

58

### APLICACIÓN DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y CITOGENÉTICA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO ONCOHEMATOLÓGICO

Existen varias técnicas citogenéticas que permiten detectar mutaciones somáticas en las neoplasias hematológicas, cuyos resultados tienen impli-

caciones clínicas, diagnósticas, terapéuticas y pronósticas. Nosotros vamos a referirnos a las dos que utilizamos en nuestro trabajo:

## TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL. BANDEADO CROMOSÓMICO

(Bandas G con tripsina y bandas C en células de cultivo de médula ósea). En situaciones patológicas complejas, en las que se desconocen los cambios génicos subyacentes, es frecuente el empleo de técnicas genéticas que nos orienten sobre la cantidad y calidad de dichos cambios a lo largo de todo el genoma celular. Una aproximación frecuente es la realización de estudios de cariotipo. Sin embargo, esta técnica está limitada por aspectos inherentes a ella.

### ● VENTAJAS DEL CARIOTIPO CON BANDEADO CROMOSÓMICO

59

- ✓ Permite estudiar todo el genoma de una sola vez.
- ✓ Puede utilizarse en situaciones en las que se sospecha una anomalía cromosómica específica (por ejemplo, cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica) y también como herramienta de diagnóstico general para detectar otras anomalías cromosómicas distintas a la sospechada.
- ✓ En enfermedades en las que no existen anomalías específicas, como el mieloma múltiple, permite comparar los cariotipos de varios pacientes para encontrar regiones críticas asociadas a la enfermedad.

### ● DESVENTAJAS DEL CARIOTIPO CON BANDEADO CROMOSÓMICO

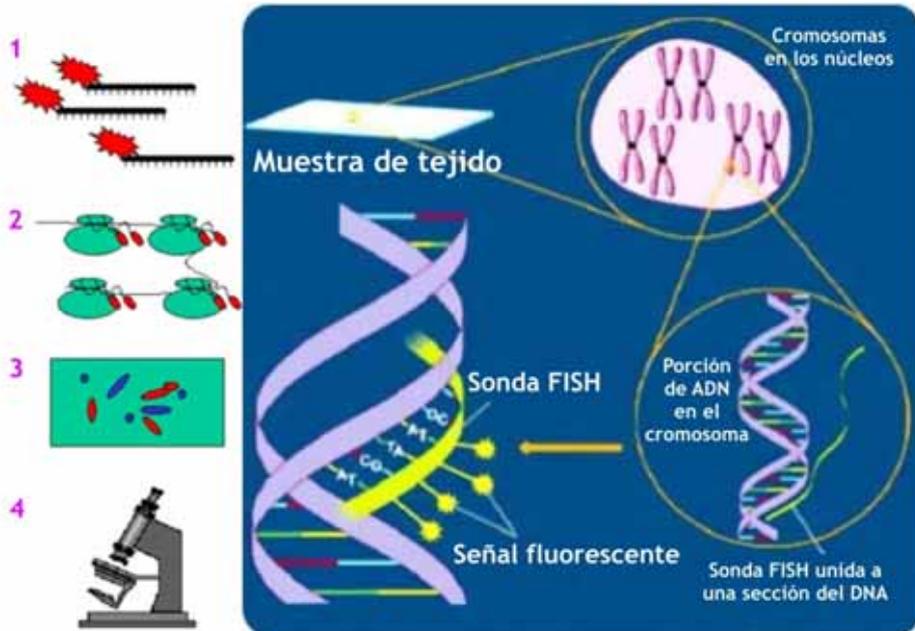
- ✓ Una banda puede contener hasta 6 megabases de ADN y unos 150 genes aproximadamente. Por tanto, las técnicas de bandeado convencionales sólo pueden detectar grandes anomalías estructurales.

- ✓ La interpretación depende mucho de la destreza y experiencia del observador.

### TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR FISH

De manera complementaria se ha desarrollado una técnica de citogenética molecular denominada hibridación in situ con fluorescencia (FISH), que ha permitido incrementar notablemente la sensibilidad, especificidad y resolución del análisis cromosómico. La simetría de las cadenas complementarias de ADN proporciona una oportunidad única para estudiar si una determinada secuencia está o no presente en una muestra biológica. Para ello se emplean oligonucleótidos o sondas marcadas con radioisótopos, fluorocromos o enzimas, cuya secuencia es conocida y complementaria a la que se quiere analizar. Si la muestra de ADN contiene la secuencia adecuada, la sonda marcada hibridará con ella de forma reconocible. Las sondas suelen ser de pequeño tamaño, sobre 100 bases.

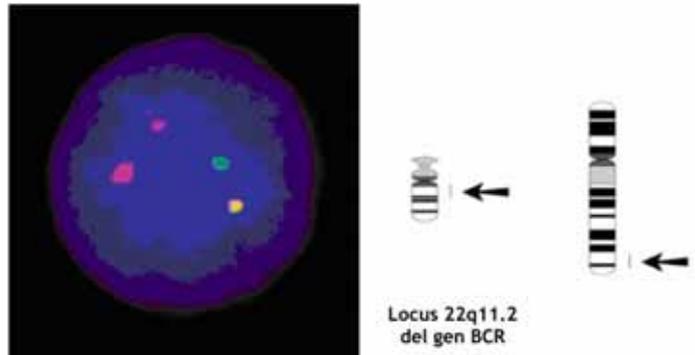
Imagen 4: Proceso de la FISH



61

- 1.-Sonda de ADN marcada con un fluorocromo sobre su secuencia complementaria del genoma
- 2.-Una vez que se dispone de la sonda marcada, se enfrenta al ADN que se quiere analizar. Para que los nucleótidos de éste queden expuestos a la sonda, hay que desnaturalizarlo, lo que se consigue aplicando calor alcalinizando el medio.
- 3.-Las muestras preparadas se colocan en un portaobjetos.
- 4.-Las imágenes se capturan utilizando un microscopio epifluorescente acoplado a una cámara digital, utilizando un programa para la captura y análisis de imágenes.

Imagen 5: Imagen de FISH, hibridación de sonda en paciente con t(9,22)



### ● VENTAJAS DE LA FISH

- ✓ La resolución es mayor que en las técnicas de bandeo cromosómico (unas 2 megabases).
- ✓ No son necesarias metafases, obteniéndose resultados de los núcleos en interfase.
- ✓ Señales específicas de alta intensidad sin necesidad de pasos adicionales de amplificación
- ✓ Puede identificar un rango de mutaciones que incluye deleciones, duplicaciones, aneuploidías y cromosomas derivativos.
- ✓ Puede utilizarse para monitorizar enfermedad residual o recurrente en pacientes con trasplante de médula ósea.
- ✓ Ensayos rápidos. Protocolos que permiten la hibridación en 4 horas utilizando el sistema HyBrite para desnaturalización e hibridación.
- ✓ Bajo ruido de fondo.
- ✓ La hibridación con múltiples sondas permite la detección de productos de translocación. Un ejemplo es la detección de la fusión BCR-ABL de la t(9;22) en la leucemia mieloide crónica.
- ✓ La mayoría de las sondas para la detección de amplificaciones incluyen una sonda control interno.

### ● DESVENTAJAS DE LA FISH

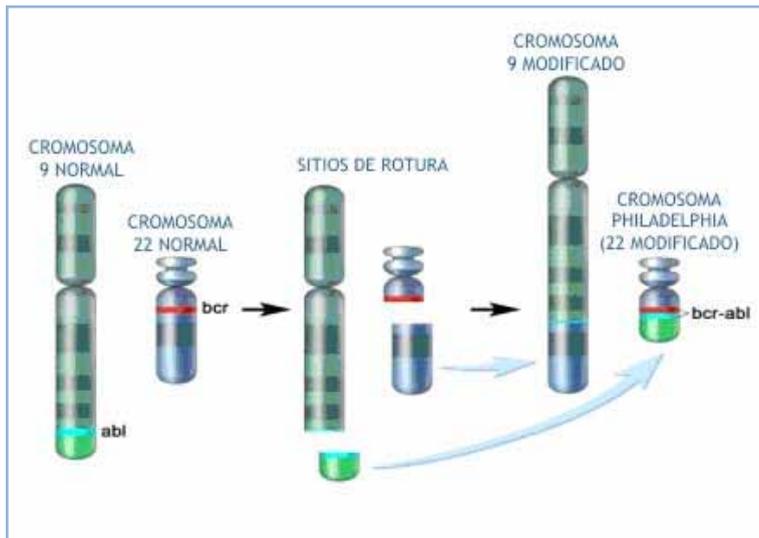
- ✓ Pequeñas mutaciones, incluyendo pequeñas deleciones e inserciones y mutaciones puntuales, no pueden ser identificadas.
- ✓ No detecta la disomía uniparental porque la sonda sólo pone de manifiesto la presencia o ausencia de un locus o una porción genómica específicos del DNA. Los pacientes con disomía uniparental tienen intactas ambas copias del mismo progenitor.
- ✓ Las inversiones pueden no ser detectadas porque la sonda sólo detecta la presencia de una secuencia específica, pero no su localización precisa.
- ✓ No existen sondas para todas las regiones cromosómicas.

### PRINCIPALES ALTERACIONES CITOGENÉTICAS DE LAS PATOLOGÍAS MIELOIDES APRECIABLES MEDIANTE FISH

#### 63 TRANSLOCACIÓN (9;22) GENES INVOLUCRADOS BCR-ABL. CROMOSOMA PHILADELPHIA

Se trata de un cromosoma derivativo 22 creado por la translocación recíproca entre la región que contiene el gen BCR en el brazo largo del cromosoma 22 (22q) con la región que contiene el gen ABL en el brazo largo del cromosoma 9 (9q).

Imagen 6: Formación del cromosoma Philadelphia (modificado de Terese Winslow)



Por lo tanto, con la  $t(9;22)(q34,q11)$  se crean dos nuevos genes funcionalmente diferentes de los originales:

64

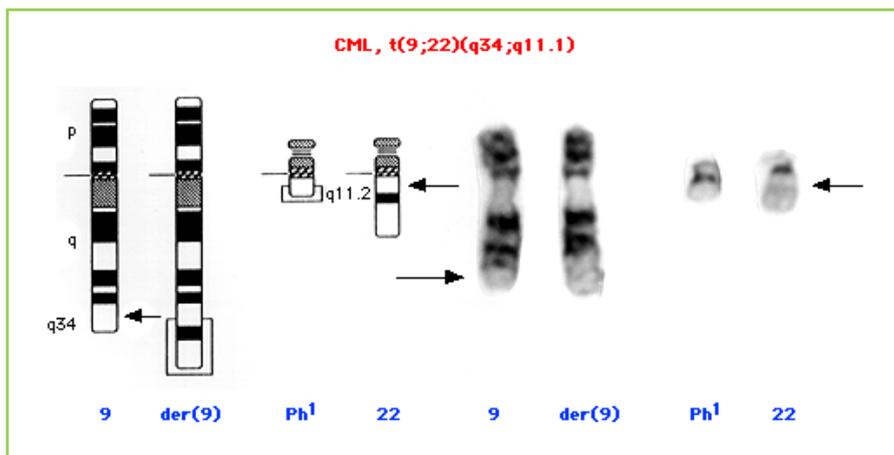
ABL-BCR (en 9q+), transcripcionalmente activo, pero no determinante en el desarrollo de la enfermedad.

BCR-ABL (en 22q-), cuyas propiedades oncogénicas son determinantes para el desarrollo de la leucemia. La proteína que origina el gen BCR-ABL actúa como transductora de señal hacia varias vías de modo autónomo. El número de sustratos sobre los que la proteína puede actuar es inmenso y la complejidad de las interrelaciones parcialmente conocida

En el siguiente esquema de la génesis del cromosoma Philadelphia se pueden ver los Ideogramas de bandas G (izquierda) y el cariotipo parcial (derecha) de la translocación  $t(9,22)(q34;q11)$ . Los puntos de ruptura están

indicados con flechas en los cromosomas homólogos normales. Como resultado de la translocación se forman los cromosomas derivados 9 y 22 (der (9) y der (22)). El der (22) es el denominado cromosoma Philadelphia.

Imagen 7: Esquema y cariotipo de de la  $t(9;22)(q34,q11)$



65

El gen ABL da lugar a una tirosina-quinasa. El gen BCR codifica una proteína con actividad serina/treonina quinasa.

El gen de fusión BCR/ABL está formado tras translocación recíproca, por la cual dos cromosomas no homólogos intercambian fragmentos. En el 60% de los pacientes con LMC ocurre que, como consecuencia de la translocación BCR-ABL, el cromosoma 9 se fusiona con el fragmento telomérico separado del cromosoma 22, apareciendo el cromosoma derivativo 9 recíproco.

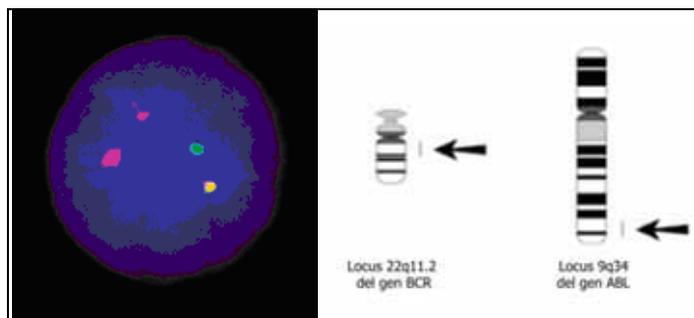
El cromosoma Philadelphia es la translocación causante de la leucemia mieloide crónica, y también puede aparecer en leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda. Un 5% de los pacientes con LMC no presenta este

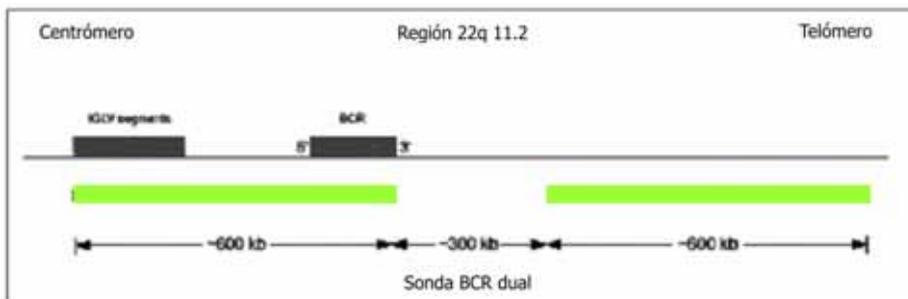
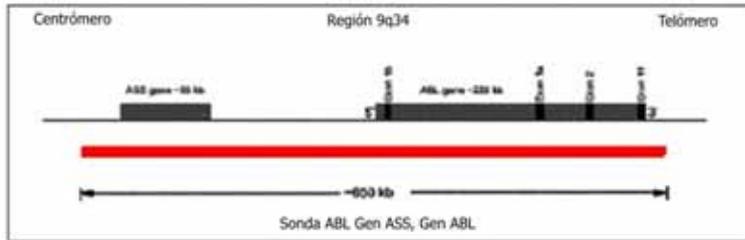
cromosoma, pero sí un reordenamiento BCR/ABL (Dewald GW 1999) (Remstein E 2000) (Sinclair PB 2000) (Dewald GW 2000) (Mahon 2000).

La imagen de la FISH inferior muestra el gen de fusión bcr/abl en metafase e interfase. Las sondas pueden usarse en la identificación de este gen de fusión en cualquiera de las regiones de ruptura, Mayor (M) y menor (m), del cromosoma 22. (Acosta TA 1999) La sonda abl está marcada con SpectrumOrange, y la sonda bcr está marcada con SpectrumGreen y la sonda LSI bcr/abl ES proporciona una señal naranja adicional cuando en el núcleo existe la translocación, lo que reduce los problemas de interpretación resultantes de la yuxtaposición aleatoria de los genes diferentemente marcados que dan señales co-localizadas.

66

Imagen 8: FISH y esquema de BCR-ABL





67

Este diseño reduce el número de núcleos que presentan un patrón de fusión anormal. Con otras sondas, la posición aleatoria de los locus ABL y BCR en el núcleo puede producir un número significativo de núcleos que presentan un patrón FISH anormal, mientras que este diseño permite la detección de un número bajo núcleos con t(9;22). Un núcleo sin translocación BCR/ABL presentará dos señales rojas y dos señales verdes (2R2G).

Los núcleos con translocación equilibrada t(9;22) presentarán una señal roja y otra verde correspondientes a los cromosomas 9 y 22 y dos señales de fusión, una en cada cromosoma derivativo, 9 y 22 (1R1G2F). En algunos núcleos la señal de fusión correspondiente al cromosoma derivativo der(9) puede parecer que tenga un gap. Esto es debido a la falta de ADN diana

correspondiente a la región telomérica del punto de ruptura BCR y este gap puede dar un patrón de hibridación 2R2G1F. En otros casos la falta de una de las señales de fusión puede ser debida a la delección de la región centromérica del punto de ruptura ABL, apareciendo un patrón 2R1V1F.

Con la utilización de la sonda LSI BCR/ABL Dual Fusion se espera la visualización una señal de fusión en der('22) [5' bcr/3' abl] y otra en der(9) [5'abl/3'bcr], lo que facilita mucho la identificación de la translocación cuando se encuentra en una baja proporción de núcleos. Pero, además, esta sonda permite detectar casos con t(9;22) desequilibrada debido a delecciones, que se encuentran en un grupo minoritario de pacientes con leucemia mieloide crónica y que se han relacionado con un mal pronóstico.

### TRANSLOCACIÓN (8;21). GENES INVOLUCRADOS ETO-AML1

68

La translocación t(8;21) produce a la fusión de ambos genes en el cromosoma derivativo 8, dando lugar a un nuevo gen quimérico: AML1/ETO, que es la yuxtaposición del gen AML1 en el cromosoma 21q22 con el gen ETO localizado en el cromosoma 8q22.

Imagen 9: Esquema de la translocación t(8;21)



La t(8;21)(q22;q22) es una de las que más se encuentran, apareciendo en el 15% de todas las LMA. Aparece más frecuentemente en pacientes jóvenes y es rara en mayores de 50 años. La detección de esta translocación es importante debido a que se asocia con un pronóstico favorable. Los pacientes con este gen quimérico responden mejor a la quimioterapia y a la intensificación de la dosis de citarabina.

Existen variantes de la translocación entre los cromosomas 8 y 21, en cariotipos complejos, y en estas situaciones es difícil confirmar la presencia de t(8;21) por análisis citogenético convencional. Sin embargo, la utilización de sondas específicas para AML1 y ETO puede elucidar la presencia del gen quimérico AML1/ETO (Harrison CJ 1999) (Mitelman F 1992) (Byrd J 1999) (Siebert R 1998) .

- 69 En una célula normal, sin gen de fusión, aparecen dos señales naranjas (dos copias normales de ETO) y dos señales verdes (dos copias normales de AML1) cuando se observa la célula con un filtro doble Green/Orange.

Imagen 10: Esquema del gen AML

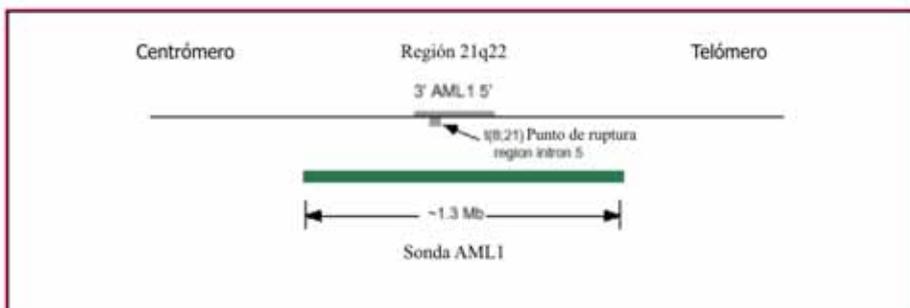
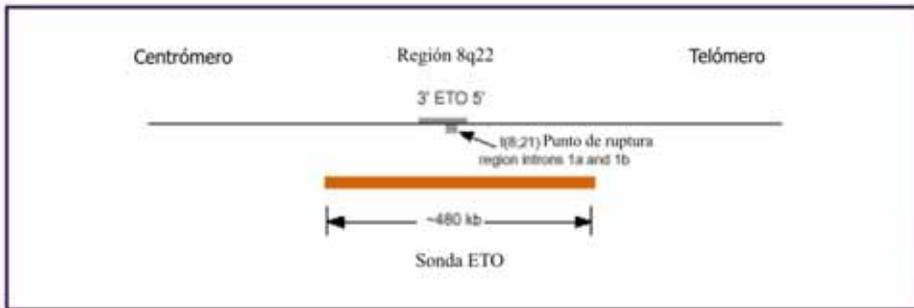


Imagen 11: Esquema del gen ETO



En una célula normal, sin fusión AML1/ETO, aparecen dos señales rojas, que representan las copias normales de ETO, y dos señales verdes, que representan las copias normales a AML1. En células con fusión AML1/ETO se observa una señal roja (ETO), una señal verde (AML1) y dos señales amarillas, resultado de la yuxtaposición de las porciones translocadas de las dos regiones en der(8) y der(21).

70

Imagen 12: FISH de fusión AML1/ETO

Núcleo en interfase con fusión AML1/ETO. Una señal verde (AML1 nativo), una señal naranja (ETOI nativo) y dos señales fusionadas naranja/verde que se observan como amarillas (AML1/ETO).



El 45% de los pacientes con Leucemia aguda mieloblástica tiene 2 ó más marcadores citogenéticos. La identificación de estos marcadores es útil

para identificar los casos dudosos, elegir un manejo clínico adecuado, detectar remisiones y averiguar la patogenia.

### TRANSLOCACIÓN (15;17) . GENES INVOLUCRADOS PML-RARA

La translocación t(15;17) implica a los genes PML (15q22) y RARA (17q21.1) dando lugar a la formación del gen de fusión PML/RARA. El punto de ruptura en el cromosoma 15 ocurre a 163 Kb del gen PML. Es frecuente en la leucemia promielocítica aguda y es específica de APL (no se ha descrito en ningún otro tipo de leucemia o tumores sólidos), enfermedad caracterizada por infiltración de la médula ósea por promielocitos en asociación con diátesis hemorrágica. . (Mitelman y Heim 1995) (Mozziconacci MJ 1999 ) (Wells RA 1997 ) (Brunel V 1995 ) (Fagioli M 1992 ) (Geng JP 1993)(Pandolfi PP 1992 ) (Yoshida H 1995 ) (Borrow J 1990 )

71

Imagen 13: Esquema del gen PML

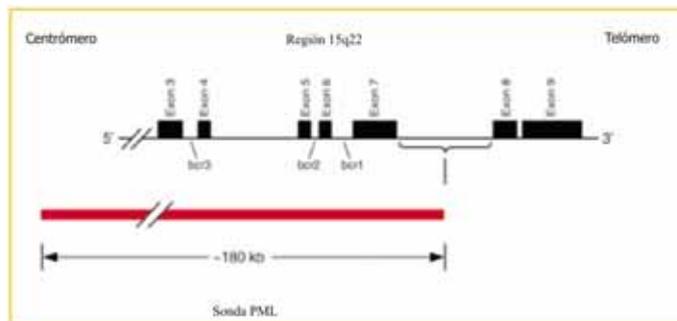


Imagen 14: Esquema del gen RARA

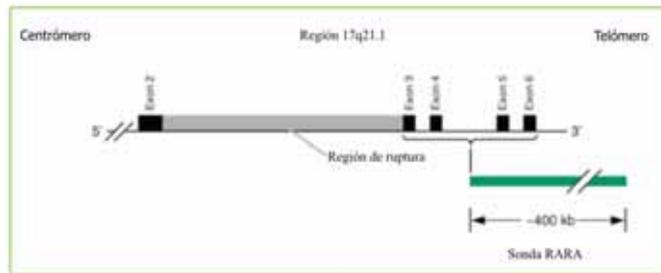
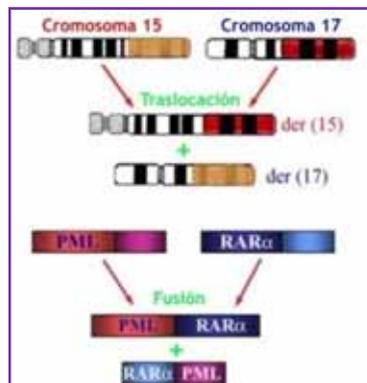


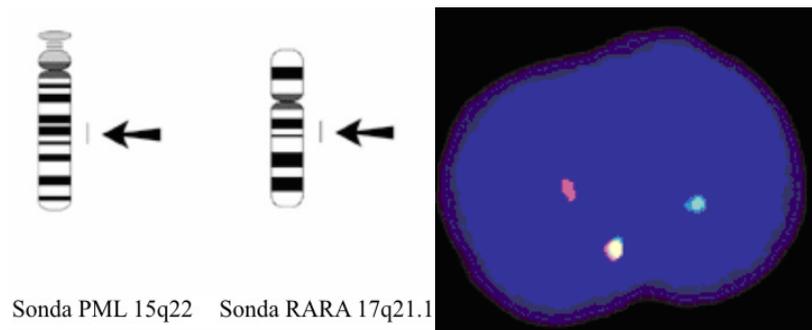
Imagen 15: Esquema de translocación (15;17)



72

La sonda LSI PML/RARA Dual Color detecta el gen de fusión PML/RARA (receptor de ácido alfa retinoico). Cuando existe translocación LSI PML/RARA se observa en la FISH como una señal amarilla que indica la fusión de los oncogenes PML y RARA, además de una señal naranja (PML normal) y una verde (RARA normal).

Imagen 16: Esquema e imagen de FISH de PML-RARA.



73

La presencia de una señal roja (PML), una señal verde (RARA) y una señal amarilla indican la fusión de *los oncogenes PML y RARA*.

### TRANSLOCACIÓN (8q 22) MYC

Sucede cuando, debido a una translocación, el gen MYC del cromosoma 8 (banda q24) queda junto al loci que codifica alguna de las cadenas que componen las inmunoglobulinas (cromosoma 14 para la cadena pesada, cromosoma 22 para la cadena ligera lambda y cromosoma 2 para la cadena ligera kappa), lo cual provoca la sobreexpresión del gen.

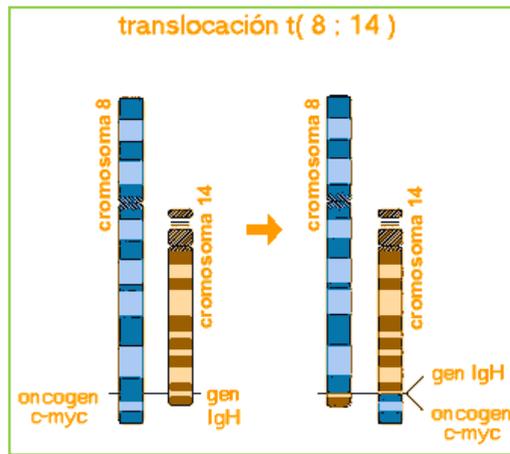
La sonda LSI IGH/MYC, CEP 8 Tri-color, Dual Fusion Translocation ha sido diseñada para detectar la yuxtaposición del locus de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgH) y la región del gen MYC tanto núcleos en metafase como en interfase. La inclusión de la sonda CEP 8 SpectrumAqua en la

mezcla de sondas sirve de control para la amplificación de MYC y la pérdida del cromosoma der(8).

De las translocaciones que afectan al gen MYC la más frecuente es la translocación t(8;14) (q24;q32), aunque también hay variantes como t(8;22)(q24;q11) o t(2;8)(p11;q24), en la que está implicado uno de los dos loci de cadenas ligeras de inmunoglobulinas (kappa en el cromosoma 2 o lambda en el 22). Estas tres translocaciones interrumpen la regulación normal del factor de transcripción c-myc, que queda bajo el control de uno de los loci de inmunoglobulinas.

Las tres translocaciones MYC tienen una alta heterogeneidad molecular. En BL esporádico, el punto de ruptura t(8;14) se localiza preferentemente en gen MYC o a pocas kilobases de su extremo. En mayor parte de casos de BL endémico el punto de ruptura t(8;14) se distribuye en un área de 340 Kb del extremo 5' de MYC: sin embargo, en un BL esporádico el punto de ruptura puede ser en esta área y en un BL endémico el punto de ruptura puede ser cercano al locus MYC. La translocación t(8;14) también es variable en cuanto al punto de ruptura en IgH, con puntos de ruptura en el segmento J más frecuentes en BL endémico y puntos de ruptura en región switch (región constante) de IgH en BL esporádico. Las variantes t(8;22) y t(2;8) también tienen una tremenda heterogeneidad molecular con el punto de ruptura 8q24 frecuentemente distribuido a lo largo de varios cientos de kilobases del extremo 3' de MYC.

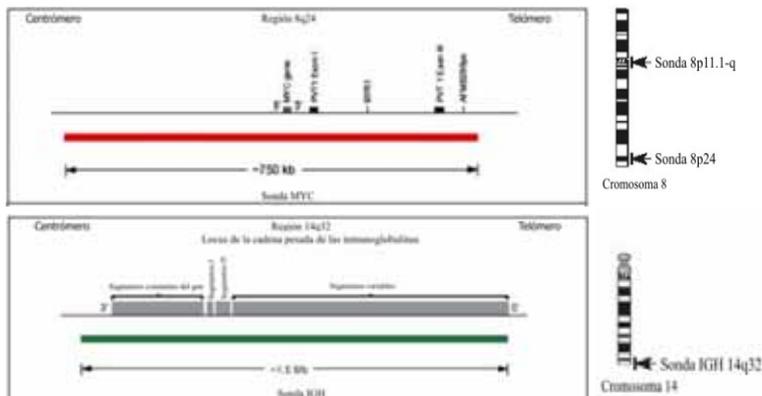
Imagen 17: Esquema de la translocación (8;14)



75

En comparación con la PCR y Southern blots, la FISH está mucho menos afectada por la variación en el punto de ruptura y ha demostrado ser un método sensible y eficaz en la detección de t(8;14) en células en interfase (Gianluca, G & Dalla-Favera, R. 1977 ), (Heim, S. & Mitelman, F. 1995), (Akasaka T 2000) , (Joss S 1992) , (Zeidler R 1994) , (Siebert 1998).

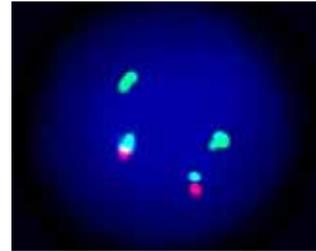
Imagen 18: Esquema del gen MYC



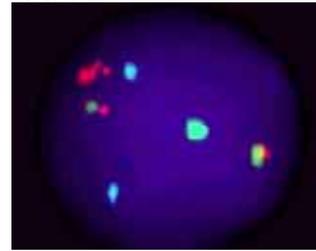
## Imagen 19: Sonda para detectar la TRANSLOCACIÓN 8q 22 (MYC)

LSI IgH/MYC, CEP 8 Tri-Color es una mezcla de tres sondas:

**LSI IgH SpectrumGreen** – Con un tamaño aproximado de 1,5 Mb cubre por completo el locus de IgH, desde el segmento constante hasta la zona donde se encuentran los genes que sintetizan los segmentos variables. **LSI MYC SpectrumOrange** – Con un tamaño de 750 Kb. **CEP 8 SpectrumAqua** – Sonda específica para la región centromérica 8p11.1-q11.1. En una muestra normal el patrón de hibridación con esta sonda es de dos señales rojas, dos señales verdes y dos señales aqua. Cuando existe translocación t(8;14) recíproca aparece un patrón de una señal roja, una señal verde, dos señales de fusión y dos señales aqua (1R1G2F2A) cuando el punto de ruptura se encuentra hacia la mitad del área marcada por LSI MYC.



LSI IGH/MYC, CEP 8 Tri-color, Dual Fusion hibridando un núcleo en interfase normal con un patrón 2R2V2A.



LSI IGH/MYC, CEP 8 Tri-color, Dual Fusion hibridando un núcleo en interfase con translocación t(8;14) y un patrón 1R1V2F2A.

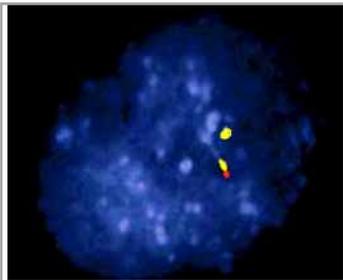
Si el punto de ruptura está muy próximo al extremo 5' de MYC, la señal de fusión del der(8) desaparece o es muy pequeña para ser visible (patrón 1R2G1F2A –desaparece la señal roja en der(8) y no se observa como señal de fusión, sólo como verde).

La sonda CEP 8 sirve de control para posibles pérdidas de der(8) o ampliificaciones de MYC. En casos esporádicos los puntos de ruptura se encuentran en medio del gen MYC o a unas pocas kilobases del extremo, pero en la mayoría de casos los puntos de ruptura de t(8;14) se encuentran distribuidos a lo largo de un área de 340 Kb del extremo 5'MYC.

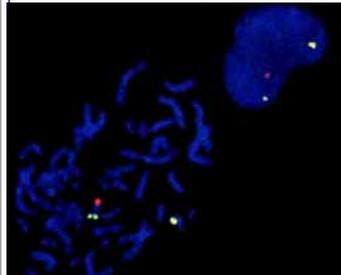
## 77 INVERSIÓN (16)

La sonda LSI CFBF (Core Binding Factor Beta-subunit) Dual Color Break Apart está diseñada para la detección de la inversión inv(16)(p13;q22) y de la translocación t(16;16)(p13;q22) en células en metafase e interfase. La inversión pericentromérica del cromosoma 16 se ha descrito en un 10% de los casos de leucemia mieloide aguda con anomalías citogenéticas y conduce a la fusión del gen CFBF en 16q22 con el gen MYH11 en 16p13, dando lugar a la producción de una proteína quimérica. La inv(16) y la t(16;16) se asocian con LMA subtipo FAB M4Eo y es un factor de pronóstico favorable (P Liu 1993), (Bloomfield 1998), (Grimwade 1998), (A Hagemeyer 1996).

## Imagen 20: Descripción de la sonda para detectar la inv 16



Núcleo sin reordenamiento CBF, con dos señales de fusión rojas/verdes que en ocasiones pueden verse como amarillas.



Metafase y núcleo con inv(16). Se observan dos señales roja y verde separadas correspondientes al crom 16 invertido y un señal de fusión en el crom. 16 normal. En la metafase puede observarse que el crom. 16 invertido presenta una señal roja en el brazo corto y una señal verde en el brazo largo.

LSI CBF B Dual Color Break Apart es una mezcla de dos sondas:

5' LSI CBF B SpectrumRed (150 Kb). Sonda complementaria al extremo proximal del gen CBF B.

3' LSI CBF B SpectrumGreen (170 Kb). Se extiende sobre el extremo distal del gen CBF B.

Cuando no existe inv(16) tras la hibridación aparecen dos señales fusionadas rojo/verde, que en ocasiones pueden observarse como amarillas.

Cuando existe inv(16) se observan una señal roja y otra verde separadas, correspondientes de la inversión, y otra señal de fusión, correspondiente al cromosoma 16 normal.

La hibridación en la translocación t(16;16)(p13;q22) da una señal de fusión roja/verde en el brazo q de un cromosoma 16 y una señal verde en el otro brazo mientras que el otro cromosoma 16 sólo contiene una señal roja en un brazo.

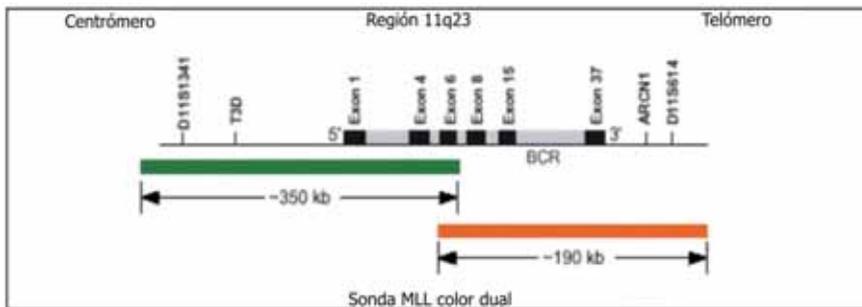
### MLL (REORDENAMIENTO 11q23)

La sonda LSI MLL Dual Color está diseñada para la detección en interfase y metafase de reordenamientos 11q23, asociados con varias translocaciones que implican al gen MLL. Translocaciones que rompen el gen MLL (ALL-1 HRX) aparecen la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica y se

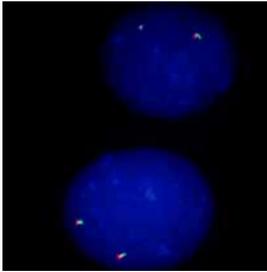
encuentran dentro de las anomalías citogenéticas más comúnmente observadas en enfermedades hematopoyéticas malignas. Se han descrito reordenamientos del gen MLL en un 5-10% de las leucemias agudas. Estas alteraciones de 11q23 son más frecuentes en pacientes con menos de 12 meses de edad (50-60% de los casos) y en leucemias secundarias en pacientes tratados con inhibidores de la topoisomerasa II (aproximadamente un 85% de los casos). Aunque se han publicado unos 30 patrones de translocaciones MLL, los más comunes son t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23) y t(11;19)(q23;p13). Las anomalías 11q23 en ALL se asocian con un mal pronóstico y respuesta a la terapia. En LMA de novo están ligas a un pronóstico intermedio o malo (Marschalek R 1997), (Rubnit JE 1996), (Cimino G 1998), (Grimwade 1998).

79

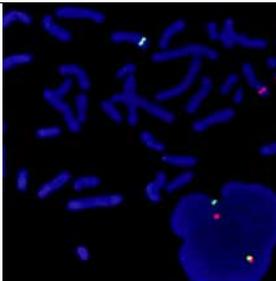
Imagen 21: Esquema de la sonda para diagnosticar el reordenamiento del gen MLL



## Imagen 22: Descripción de la sonda y FISH de reordenamiento MLL



LSI MLL Dual Color hibridando dos núcleos normales en interfase, con el patrón de fluorescencia esperado de dos señales de fusión.



LSI MLL Dual Color hibridando núcleo y metafase con  $t(9;11)(p22;q23)$ . Una señal roja se traslada al brazo p del cromosoma 9 y la señal verde permanece en el der(11). El cromosoma 11 normal muestra la señal de fusión.

LSI MLL Dual Color es una mezcla de dos sondas:

Una sonda de 350 Kb que hibrida la porción centromérica del punto de ruptura del gen MLL (bcr) marcada con SpectrumGreen.

Una sonda de 190 Kb que hibrida la región telomérica de MLL marcada con SpectrumOrange.

En aproximadamente un 25% de las translocaciones 11q23, la región que comienza en el punto de ruptura MLL y se extiende distalmente está delecionada, de forma que las sondas clásicas diseñadas en un solo color (que detectan la translocación por la aparición de tres señales en núcleos en interfase) no detectan estos casos.

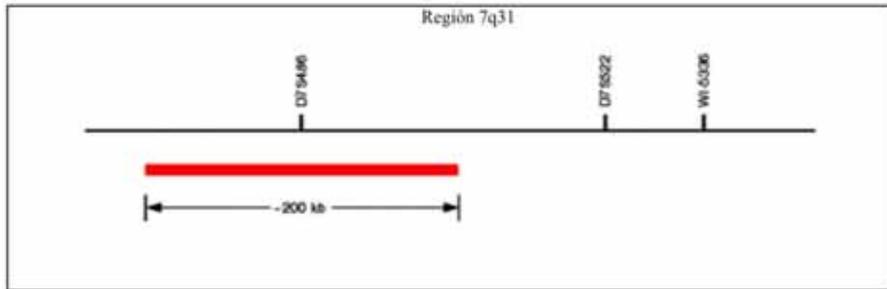
Con la sonda LSI MLL Dual Color deleciones muy grandes hacia el extremo distal del punto de ruptura pueden dar una señal roja débil o incluso inexistente, con un patrón de una señal de fusión y una señal concomitante. Las células normales muestran un patrón con dos señales de fusión y mientras que células con las translocaciones típicas presentan una señal roja, una señal verde y una señal de fusión.

### DELECIÓN 7q31

La deleción de 7q es frecuente en síndromes mielodisplásicos y otros desórdenes hematológicos. También se ha encontrado pérdida de heterocigosidad 7q31 en tumores de mama y de próstata. Se cree que esta región puede contener un gen supresor de tumor. LSI D7S486 (7q31)/CEP 7 es una mezcla de sondas. Puede usarse en la identificación de deleciones

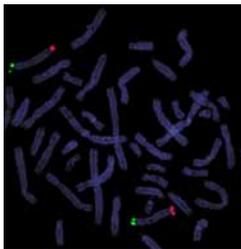
7q31 en células en interfase y en metafase y para identificar i(7q) en metafase, encontrado en ciertos tipos de leucemias. La sonda CEP 7 Spectrum-Green sirve como control interno del cromosoma 7 (Heim, S. & Mitelman, F. 1995) .

Imagen 23: Esquema de la sonda para diagnosticar la deleción 7q31



81

Imagen 24: Sonda identificando la deleción 7q31



En las células normales el patrón esperado es dos señales rojas y dos señales verdes. Cuando una célula contiene la deleción el patrón que se observa es una señal roja y dos señales verdes.

### DELECIÓN 5q31 (EGR1)

LSI EGR1 (5q31)/D5S721, D5S23 Dual Color Probe es una mezcla de dos sondas: LSI EGR1 SpectrumOrange, de aproximadamente 200 Kb, y LSI D5S721, D5S23 SpectrumGreen, de unos 450 Kb que puede detectar:

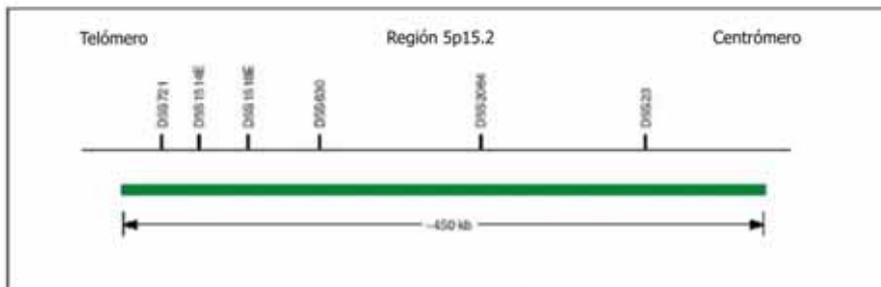
Deleciones de 5q31, que contiene el locus EGR1. La deleción de 5q31 es frecuente en desórdenes mieloides, síndrome 5q-, síndromes mielodisplási-

cos y leucemia mieloide aguda (Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, García Miranda JL, Brito Barroso ML, Hernández García MT, Hernández Nieto L 1992), así como en pacientes con síndromes mielodisplásicos y LMA relacionados con terapia y reordenamientos cromosómicos 11q23 y t(1;7). Las aberraciones cromosómicas más comunes en estos pacientes son las deleciones totales o parciales del cromosoma 5 y/o del cromosoma 7. El 5q- es una de las anormalidades cariotípicas más frecuentes en MDS y AML. En este caso la sonda LSI D5S721, D5S23 SpectrumGreen sirve como control interno para el cromosoma 5 y determina la deleción completa del cromosoma 5 versus 5q- (Heim, S. & Mitelman, F. 1995), (Church DM 1997).

Deleciones de 5p15.2, a menudo encontradas en el síndrome del “Cri-du-Chat”, usualmente diagnosticado tras el nacimiento. En este caso la sonda LSI EGR1 SpectrumOrange sirve como control interno.

82

Imagen 25: Esquema de la sonda que diagnostica la deleción 5q31



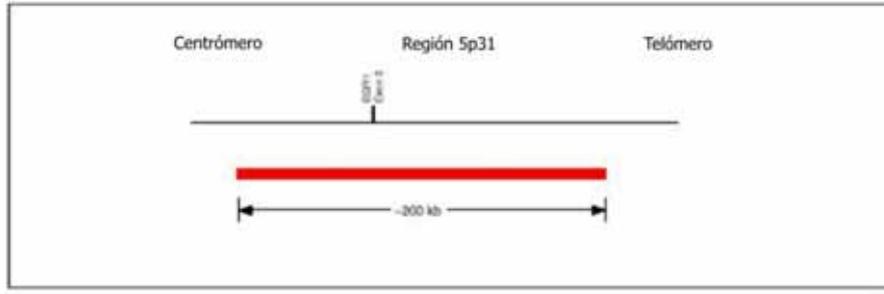
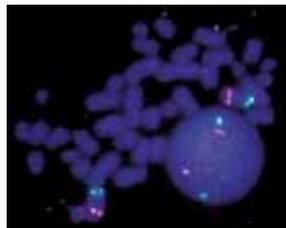


Imagen 26: Deleción de 5p15.2 en un Sdme. Cri du chat.



LSI Cri-du-Chat Dual Color hibridando metafase y núcleo con microdeleción.

83

### DELECIÓN 5q33- q34

La deleción 5q es una de las anomalías cariotípicas más frecuentes en síndromes mielodisplásicos y en leucemia mieloide aguda. (Heim, S. & Mitelman, F. 1995)

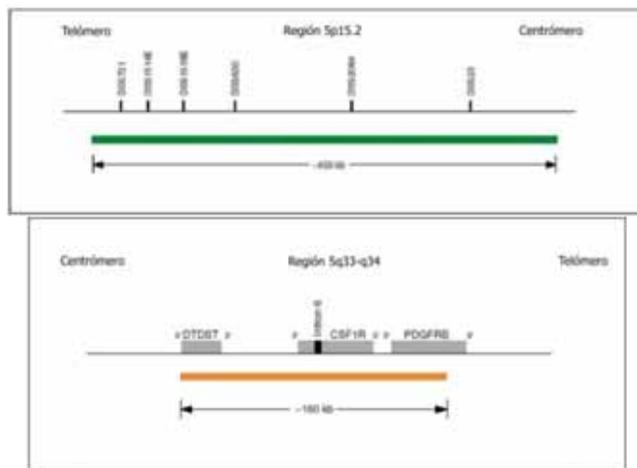
En investigación puede tener interés la detección de deleciones en 5q tanto de CSF1R como de EGR1. El locus CSF1R se localiza en el centro de la región 5q33-34 del cromosoma 5 y es telomérico al locus EGR1.

La sonda LSI CSF1R/D5S721, D5S23 es una mezcla de sondas que incluye: LSI CSF1R SpectrumOrange (150 Kb), y LSI D5S721, D5S23 SpectrumGre-

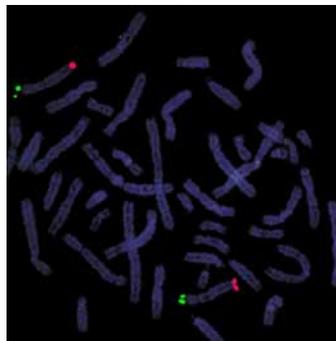
en, de unos 450 Kb. Es útil en la detección de deleciones de 5q33-q34 en células en metafase e interfase.

En las células normales el patrón esperado es dos señales rojas y dos señales verdes. Cuando una célula contiene la deleción el patrón que se observa es una señal roja y dos señales verdes.

Imagen 27: Patrón normal de sonda buscando deleción 5q 33-34



84



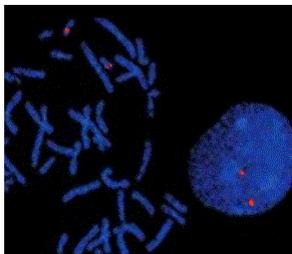
LSI 5q33-34 (CSF1R)/D5S721, D5S23 Dual Color hibridando una metafase normal.

## TRISOMÍA+ 8p11.1-q11.1

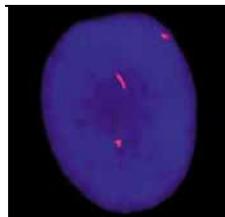
Se ha establecido una clara asociación entre trisomía 8 y crisis blástica mieloides y basofilia. La trisomía 8 es una aberración genética prevalente en enfermedades como leucemia mieloides crónica (uno de cada cuatro casos), leucemia mieloides aguda, patologías mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicos y otras enfermedades hematológicas incluyendo estados hiperproliferativos como Policitemia vera, reacción leucemioide, desórdenes linfoproliferativos o leucemia linfocítica (Byrd J 1998), (Escudier S 1993), (Heim, S. & Mitelman, F. 1995), (Jenkins R 1992), (Najfeld V 1997). Para diagnosticarla, disponemos de un kit, aprobado por la FDA y la CE para diagnóstico in Vitro, permite identificar y enumerar en tres horas o menos el número de copias del cromosoma 8 en células en interfase y en metafase obtenidas a partir de médula ósea. El Kit tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%, comparada con el análisis citogenético tradicional. CEP 8 SpectrumOrange es una sonda específica para el ADN alfa-satélite contenido en la región (centromérica) 8p11.1-q11.1. En una célula normal, el patrón esperado es de dos señales rojas (2R). En una célula con trisomía se observan tres señales rojas.

85

Imagen 28: FISH de 8p11.1-q11.1



LSI 20q12 hibridando un núcleo y metafase normal, con patrón 2R.

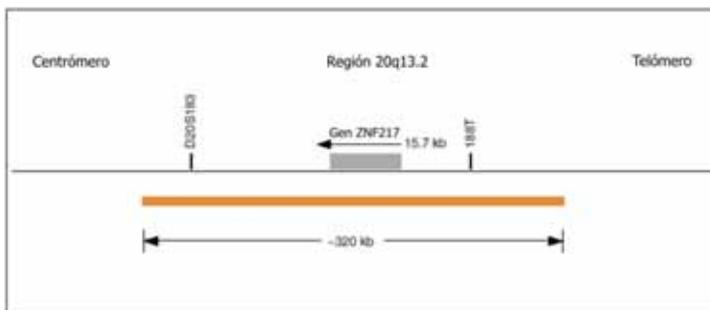


Resultados observados en una célula anormal tras la hibridación con CEP 8 SpectrumOrange. Hay tres copias de CEP 8.

## DELECIÓN 20q12

Se cree que en la región 20q12 reside un gen supresor de tumor. La sonda LSI D20S108 contiene el locus D20S108 localizado en 20q12 (Tanner M 1994 ), (Collins C 1998 ).La sonda LSI D20S108 (20q12) SpectrumOrange puede usarse para identificar deleciones el brazo largo del cromosoma 20.

Imagen 29: Esquema de la sonda que diagnostica la deleción 20q12



En núcleos normales el patrón de hibridación esperado es de dos señales rojas, correspondientes a cada una de las regiones 20q12. En células anormales con deleción se observa sólo una señal roja.



La finalidad del presente trabajo se centra fundamentalmente en los siguientes aspectos:

1.- Crear una base de datos informatizada, organizada y versátil que incluya todos los cambios génicos hallados a través de distintas técnicas, de las 4.929 muestras recibidas. Este soporte permitirá acceder fácilmente a la información disponible, para permitir posteriores estudios (de patologías linfoides, por ejemplo) considerando que el número de muestras procesadas aporta un número de resultados diagnósticos representativos.

2.-Valorar la utilidad del uso de la técnica diagnóstica de citogenética molecular (FISH) junto al uso de citogenética convencional y de la clínica, en el diagnóstico de las alteraciones genéticas más frecuentes en las neoplasias mieloides. Para esto, mediante el análisis de los datos registrados, buscaremos significación estadística en la concordancia existente entre los resultados obtenidos con citogenética convencional y con FISH, que permitan confirmar lo antes posible los pronósticos y sus estrategias terapéuticas más adecuadas.

3.-Analizar las sondas FISH utilizadas para cada entidad clínica durante estos 10 años y compararlas con los criterios de selección de las mismas convenidos por la OMS en Diciembre de 2008.

4.-Proponer consideraciones para convenir un protocolo standard argumentado de los estudios diagnósticos procedentes para cada patología, teniendo en cuenta esta clasificación actual de las distintas entidades mieloides.



## PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

El presente estudio se basa en el análisis retrospectivo de 4.929 cultivos de médula ósea procedentes de pacientes en estudio por oncohematología, realizados en la Sección de Citogenética del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias, recogidas entre el 1 de Enero de 1999 y el 31 de Diciembre de 2009. En todos se realizó el cariotipo y en 2154 se hizo la técnica de FISH.

### PASOS DEL PROCESO DE ANALISIS DE LAS MUESTRAS

- ✓ Recopilación de la información registrada en las historias de soporte papel (las abiertas de 1999 a 2007) y la de las historias informatizadas no estandarizadamente (de 2007 a 2009), generando una base de datos informatizada en formato FileMaker® para Windows®.
- ✓ Eliminación de registros duplicados, incongruentes, con datos importantes erróneos, sin diagnóstico clínico o con diagnóstico clínico ambiguo.
- ✓ Transferencia a formato excell de Windows® 2007, con eliminación de los datos personales de cada paciente acorde a la ley de protección de datos.
- ✓ Estandarización de nomenclatura del campo "diagnóstico clínico" acorde a la clasificación de la OMS de Diciembre de 2008, para lo que hubo que analizar todos los datos disponibles de cada registro, para reubicar los casos en el tipo y subtipo de neoplasias correspondientes.
- ✓ En cada historia clínica y con el fin de poder estudiar la presencia de alteraciones cromosómicas en dichos pacientes, se analizaron, en particular, los campos:

- ✓ Diagnóstico clínico (sospecha).
- ✓ Diagnóstico citogenético con técnicas convencionales (bandas G).
- ✓ Diagnóstico de citogenética molecular (FISH).
- ✓ Incorporación a la base de datos, de 2 campos adicionales y cumplimiento de los mismos, tras el análisis de cada registro, para estandarizar la nomenclatura y unificarla en:
  - ✓ Resultado bandas G: "normal, patológico o no valorable"
  - ✓ Resultado FISH: "normal, patológico o no realizado"
  - ✓ Incorporación de los detalles de las sondas de FISH utilizadas en cada caso y el resultado para cada una de ellas en cada muestra.

#### ● CARIOTIPOS:

95 Los cariotipos se realizaron siguiendo el protocolo de cultivo y bandedo de la Sección de Citogenética del Hospital Universitario de Canarias. Se analizaron 20 metafases por cada muestra, si esto no era posible, el resultado era "no valorable". Los cariotipos considerados normales fueron aquellos en los que no aparecían aberraciones clonales en ninguna de esas 20 metafases estudiadas, y los patológicos aquellos que al menos tenían una alteración. Los cariotipos se describieron de acuerdo al ISCN (S.Kargen 1995) , Sistema Internacional para la nomenclatura de citogenética humana.

#### ● FISH:

Los estudios de FISH se realizaron en células fijadas, obtenidas de cultivos de médula ósea. La hibridación se realizó de acuerdo a los protocolos de la Sección de Citogenética del Hospital Universitario de Canarias. Las imágenes se capturaron y procesaron con un microscopio de fluorescencia marca Nikon Eclipse 50i, utilizando el software Metasystems (Isis) de Vysis. Para

cada muestra se analizaron al menos 200 metafases. La línea de corte para definir un resultado como positivo se adaptó de publicaciones contemporáneas, y según el tipo de sonda, se convino en el rango  $\geq 5\%$  -  $\geq 10\%$ . Este límite, progresivamente se ha estrechado hasta el actual de  $\geq 6\%$ -  $\geq 8\%$ .

### CLASIFICACIÓN DE LOS DATOS

Una vez obtenidos los resultados, se analizan los grupos de registros que se ajustan a condiciones comunes:

- ✓ Cariotipos normales con "Diagnóstico FISH":
  - No realizado
  - Normal
  - Patológico
  
- ✓ Cariotipos patológicos con "Diagnóstico FISH":
  - No realizado
  - Normal
  - Patológico
  
- ✓ Cariotipos no valorables con "Diagnóstico FISH":
  - No realizado
  - Normal
  - Patológico

Se desagrega especificando la/s sondas aplicadas en la FISH, para analizar sus resultados respecto al cariotipo.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Primero se calcula el número de muestras necesarias para considerar válidos a nivel poblacional los hallazgos de nuestra muestra. Luego se calcula con el programa estadístico SPSS el coeficiente de concordancia Kappa. Se

usa este test porque son variables ordinales de dos niveles (acuerdo versus desacuerdo entre resultados obtenidos con cariotipo y con FISH).

Para la interpretación de coeficiente de Kappa, Landis y Koch propusieron unos intervalos para valorar el grado de acuerdo (Landis 1977) .

Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar, se define el índice de concordancia kappa.

Así pues, en caso de concordancia estadística absoluta el valor de kappa es  $\geq 1$ . Si la concordancia observada es igual a la esperada y fruto del azar, kappa vale 0 (y desde el punto de vista estadístico, diríamos que no existe concordancia). Y en el caso de que el acuerdo observado sea inferior al esperado por azar, el índice kappa es  $\leq 0$ , o lo que es lo mismo la concordancia es opuesta, o existe discrepancia.

97

Tabla 8: Intervalos de acuerdo para el coeficiente kappa según Landis y Koch

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	muy bueno

Las consecuencias de estos valores en los resultados de nuestro estudio son las siguientes:

Cuando la concordancia ( $\kappa$ ) entre los resultados de cariotipo y FISH aplicados a una misma muestra sea:

$\geq 1$ : La concordancia es absoluta, y resulta indiferente optar por uno u otro test diagnóstico.

0: No hay concordancia, habría que valorar con mas datos, respecto a que test/s utilizar.

$\leq 1$ : La concordancia es opuesta, por lo que resulta más eficaz realizar FISH directamente, aunque para afirmar que "exclusivamente" hay que tener mas datos en consideración.

98

### P VALOR

Para el nivel de significación de los resultados se ha usado un  $\alpha$  (alfa) = 0,05.

El P valor asociado a la  $\kappa$  de cada grupo de muestras de cada entidad diagnosticada puede ser:

$P < 0,05$ : En cuyo caso no hay problemas con la validez del resultado de  $\kappa$  obtenido, porque es estadísticamente representativo y existe una concordancia positiva.

$P > 0,05$ : Situación que puede deberse a dos motivos, o porque no existe concordancia, o porque la muestra es insuficiente para detectarla.



## 1.-BASE DE DATOS INFORMATIZADA

Nos propusimos crear una base de datos informatizada, organizada y versátil que incluya todos los cambios génicos hallados a través de distintas técnicas, de las 4.929 muestras recibidas. Este soporte nos ha permitido acceder fácilmente a la información disponible, y permitirá posteriores estudios (de patologías linfoides, por ejemplo) considerando que el número de muestras procesadas aporta un número de resultados diagnósticos representativos.

Esta base de aporta un número de casos representativos, para avanzar en la protocolización de los estudios diagnósticos de esta patología.

A partir de los datos registrados en las Historias Clínicas de los pacientes oncohematológicos, se obtuvieron 4.929 registros de los que 3.990 permanecen en soporte papel y 939 están informatizados de modo no estandarizado.

Con estos, tras descartar 1359 muestras con posibles errores o datos ambiguos, quedaron 3.570. Dentro de estas muestras, 107 contenían diagnósticos inespecíficos y 54 no tenían ningún tipo de diagnostico. A estas alturas, nos habían quedado 3.409 muestras, un 69,16% de las 4.929 originales.

En las tablas siguientes se resume la distribución de las muestras obtenidas durante el periodo enero de 1999 a diciembre de 2009:

Tabla 9: Características de la muestra para diagnóstico de patología onco-hematológica obtenida entre enero de 1999 y diciembre de 2009

Nº de muestras	Tipo de muestras
4.929	recogidas (de H <sup>a</sup> C <sup>a</sup> N <sup>o</sup> 1.950 a H <sup>a</sup> C <sup>a</sup> N <sup>o</sup> 6.880)
1.359	con posibles errores de registro
107	con diagnósticos inespecíficos
54	sin diagnóstico
<b>3.409</b>	<b>para analizar tras depuración de datos</b>

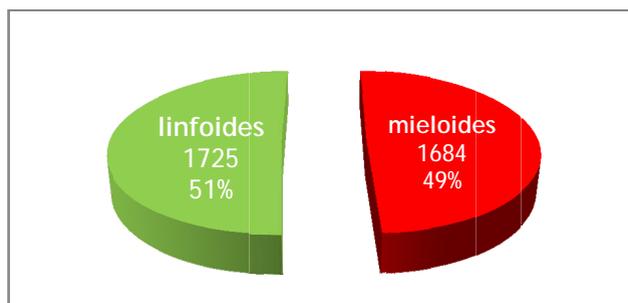
Una vez obtenidos los datos, separamos las muestras que solicitaban estudios de patología linfóide de las que sospechaban etiología mielóide, que son objeto de nuestro estudio. Y en las tablas siguientes se puede ver la distribución de nuestras 3.409 muestras:

Tabla 10: Distribución mielóide – linfóide de la muestra obtenida entre 01/1999 y 12/2009

103

Nº de muestras	Tipo de muestras	De las cuales tenían FISH + CARIOTIPO valorables
1.684	Mielóides	603
1.725	Linfóides	574

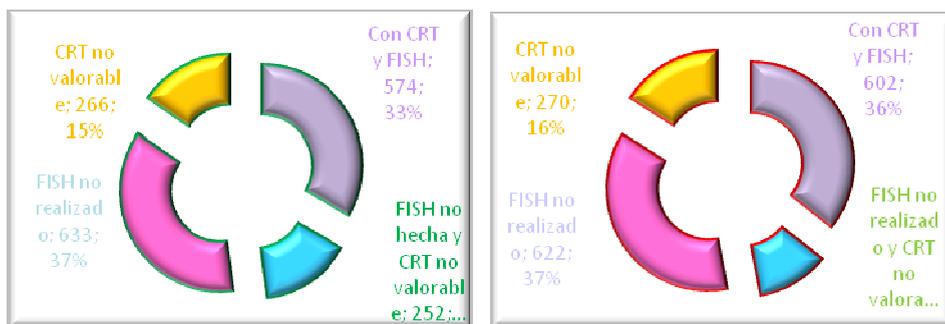
Imagen 30: Distribución mieloides- linfoide de la muestra, tras purificarla



No todas las muestras tenían cariotipo y FISH que permitiera comparar los resultados de una y otra técnica. En la tabla siguiente se desagregan los grupos con los resultados de las pruebas realizadas:

### LINFOIDES

### MIELOIDES



104

Las 1.725 muestras linfoides se distribuían del siguiente modo:

Tabla 11: Distribución de las 1.725 muestras linfoides

Nº de muestras	Resultados de las pruebas diagnósticas
633	FISH no realizada
266	CRT no valorable
252	FISH no realizado y con CRT no valorable
574	FISH y CARIOTIPO realizados

Las 1684 muestras mieloides se distribuían del siguiente modo:

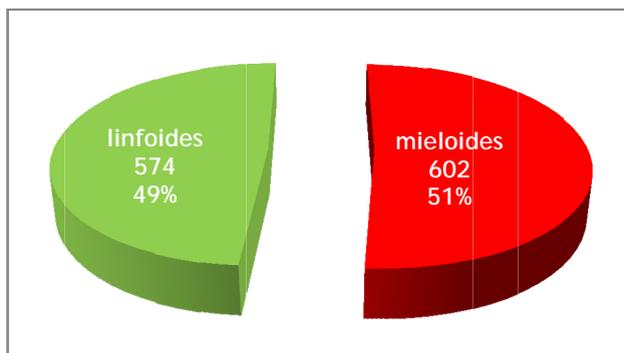
Tabla 12: Distribución de las 1.684 muestras mieloides

Nº de muestras	Resultados de pruebas diagnósticas
622	FISH no realizada
270	CRT no valorable
190	FISH no realizado y CRT no valorable
<b>602</b>	<b>FISH y CARIOTIPO realizados</b>

Y nos quedamos con las muestras que tienen resultados válidos para FISH y cariotipo, esto es 574 muestras linfoides (49%) y 602 muestras mieloides (51%), que son las que utilizaremos en el presente trabajo, para poder comparar los resultados obtenidos con ambas pruebas.

105

Imagen 31: Distribución de muestra con FISH y cariotipo realizado



Con las patologías mieloides, se actualizó el nombre utilizado en el diagnóstico clínico según las directrices de la clasificación de neoplasias de los tejidos linfoides y hematopoyéticos de la OMS de Diciembre de 2008. (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The

2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008).

En el anexo final se pueden ver las tablas que recogen toda la información sobre los resultados obtenidos en las distintas muestras mieloides, en valores absolutos y porcentuales. Desagregadas para cada entidad en función de los resultados de cariotipo y FISH. A continuación la tabla 13 muestra los valores de las 602 FISH obtenidas para cada resultado de cariotipo, omitiendo los no valorables, en las entidades estudiadas.

Tabla 13: Valores absolutos y relativos de las 602 muestras a las que se realizó cariotipo y FISH (tras quitar cariotipos no valorables y FISH no realizados) desagregados para cada entidad.

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
<b>Mieloproliferativas S/E</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>11</b>
Normal	82%		82%
Patológico		18%	18%
<b>LMC</b>		<b>58</b>	<b>58</b>
Normal		33%	33%
Patológico		67%	67%
<b>Mielofibrosis primaria</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
Normal	100%		100%
<b>Policitemia Vera</b>	<b>3</b>		<b>3</b>
Normal	100%		100%
<b>Trombocitemia esencial</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>23</b>
Normal	87%		87%

	Resultados de FISH		
Resultados de CARIOTIPO	NORMAL	PATOLÓ- GICO	Total ge- neral
Patológico	9%	4%	13%
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
Normal	8%	69%	77%
Patológico	8%	15%	23%
<b>LMC a</b>	<b>116</b>		<b>116</b>
Normal	95%		95%
Patológico	5%		5%
<b>LMMC</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
Normal	100%		100%
<b>SMD S/E</b>	<b>139</b>	<b>11</b>	<b>150</b>
Normal	88%	1%	89%
Patológico	5%	6%	11%
<b>CRDM</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
Normal	75%		75%
Patológico		25%	25%
<b>Anemias refractarias</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
Patológico	1		1
<b>LMA y NPR S/E</b>	<b>125</b>	<b>36</b>	<b>161</b>
Normal	70%	19%	89%
Patológico	8%	3%	11%
<b>LMA con t (8,21)</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
Normal		100%	100%
<b>LMA con inv 16</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
Normal	100%		100%

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓ- GICO	Total ge- neral
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>
Normal	42%	30%	72%
Patológico	8%	20%	28%
<b>LMA FM con t (9,22)</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
Normal	33%	8%	42%
Patológico		58%	58%

## 2.-CITOGÉNÉTICA COVENCIONAL (CARIOTIPO) VERSUS MOLECULAR (FISH)

Nos propusimos valorar la utilidad del uso de la técnica diagnóstica de citogenética molecular (FISH) junto al uso de citogenética convencional y de la clínica, en el diagnóstico de las alteraciones genéticas más frecuentes en las neoplasias mieloides. Para esto, mediante el análisis de los datos registrados, buscamos significación estadística en la concordancia existente entre los resultados obtenidos con citogenética convencional y con FISH, buscando establecer pronósticos y estrategias terapéuticas más rápidas y adecuadas. A continuación exponemos los resultados.

108

### 2.1. ESTUDIOS DE LAS 1684 MUESTRAS MIELOIDES TOTALES

En las 1684 muestras mieloides, que incluyen algunas a las que no se les realizó FISH, los cariotipos se agruparon en patológicos, normales y no valorables.

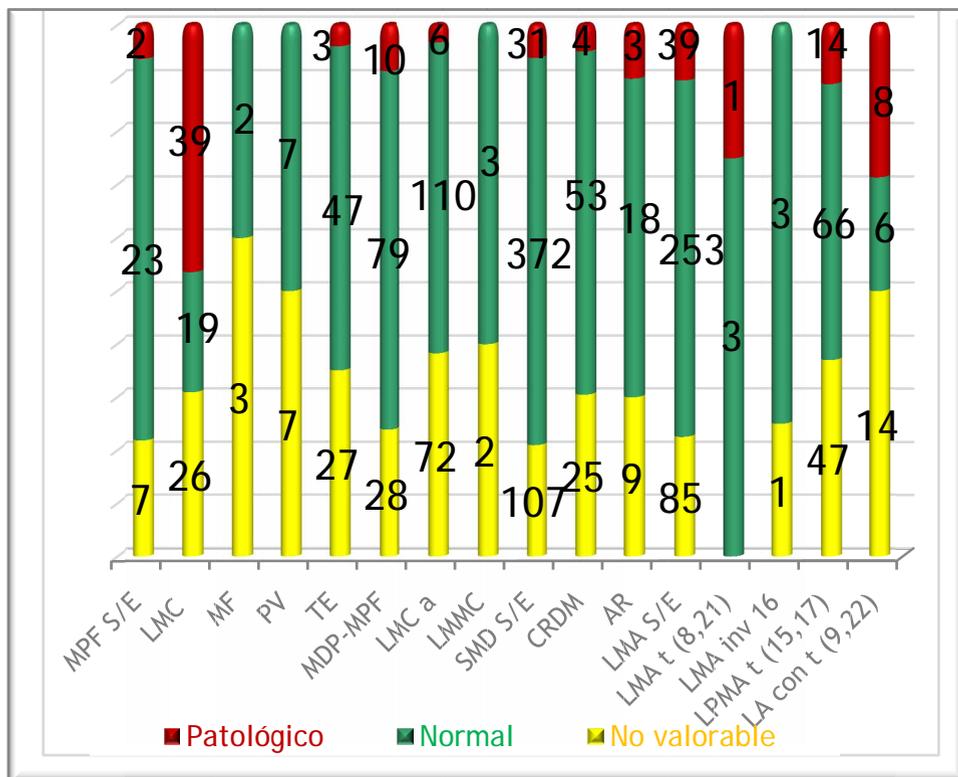
Como se observa en la imagen 32, en amarillo aparecen las muestras cuyo resultado de cariotipo fue "no valorable", en verde aquellas cuyos resulta-

dos fueron normales y en rojo los resultados patológicos. Interesa tener en cuenta que los volúmenes de cada color en una misma barra vertical representan el porcentaje correspondiente para la patología en cuestión. Pero las muestras totales analizadas en las distintas entidades no son las mismas, por ello se escribe el número del valor absoluto de las muestras valoradas en cada caso, sobre cada trozo de barra.

### 2.1.1 Resultados de cariotipo

Imagen 32: resultado de cariotipo de las 1.684 muestras mieloides

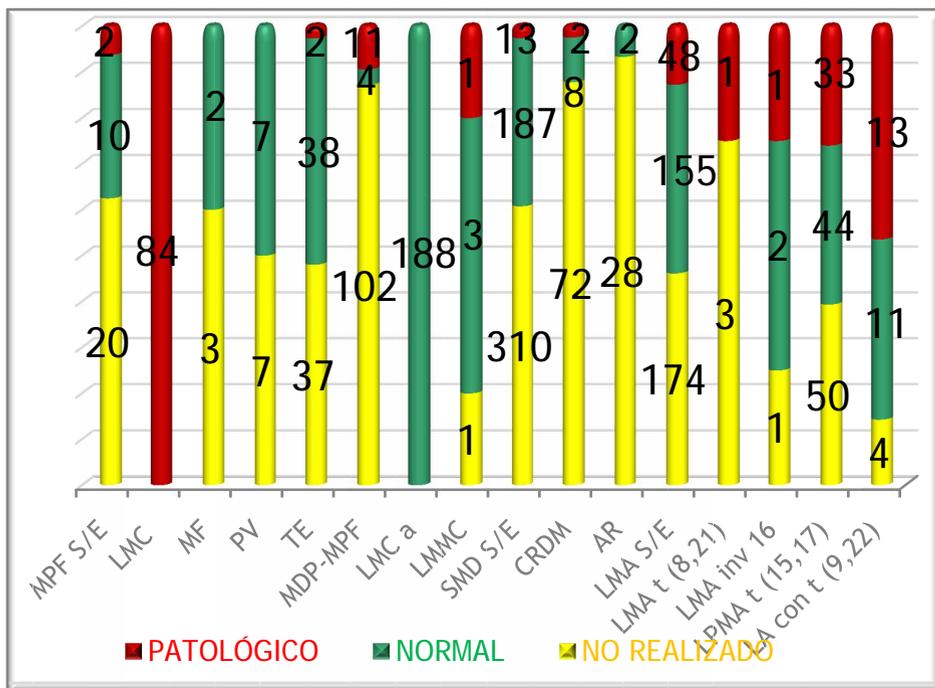
109



2.1.2 Resultados de la FISH

En la imagen 33, con los mismos criterios, se muestran los resultados de la FISH.

Imagen 33: resultado de FISH de las 1.684 muestras mieloides



En las tabla 31 del anexo se puede ver el detalle de la información obtenida, con la cual se realizaron las imágenes 32 y 33.

A continuación se muestra en la tabla 14 los resultados del cariotipo y la FISH, desagregado según diagnóstico clínico, para las 1684 muestras.

Tabla 14: Resultados de la FISH (incluidos los “no realizados”) para las 1.684 muestras mieloides desagregados según resultado de cariotipo.

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
NMP	67	57	88	212
Mieloproliferativas S/E	20	10	2	32
No valorable	6	1		7
Normal	14	9		23
Patológico			2	2
LMC			84	84
No valorable			26	26
Normal			19	19
Patológico			39	39

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
Mielofibrosis primaria	3	2		5
No valorable	2	1		3
Normal	1	1		2
Policitemia Vera	7	7		14
No valorable	3	4		7
Normal	4	3		7
Trombocitemia esencial	37	38	2	77
No valorable	10	16	1	27
Normal	27	20		47
Patológico		2	1	3
<b>NMD-NMP</b>	<b>103</b>	<b>195</b>	<b>12</b>	<b>310</b>
NMD-NMP S/E	102	4	11	117

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo
No valorable	26	2		28
Normal	69	1	9	79
Patológico	7	1	2	10
LMC a		188		188
No valorable		72		72
Normal		110		110
Patológico		6		6
Mielomonocítica crónica	1	3	1	5
No valorable		1	1	2
Normal	1	2		3
<b>SMD</b>	<b>410</b>	<b>197</b>	<b>15</b>	<b>622</b>
SMD S/E	310	187	13	510

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo
No valorable	57	48	2	107
Normal	238	132	2	372
Patológico	15	7	9	31
CRDM	72	8	2	82
No valorable	23	2		25
Normal	47	6		53
Patológico	2		2	4
Anemias refractarias	28	2		30
No valorable	8	1		9
Normal	18			18
Patológico	2	1		3
<b>LMA Y NPR</b>	<b>228</b>	<b>201</b>	<b>83</b>	<b>512</b>

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo
LMA y NPR S/E	174	155	48	377
No valorable	43	30	12	85
Normal	110	112	31	253
Patológico	21	13	5	39
LMA con t (8,21)	3		1	4
Normal	2		1	3
Patológico	1			1
LMA con inv 16	1	2	1	4
No valorable			1	1
Normal	1	2		3
LPMA con t (15,17)	50	44	33	127
No valorable	10	24	13	47

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			
	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	Resultados de cariotipo
Normal	37	17	12	66
Patológico	3	3	8	14
LMA FM con t (9,22)	4	11	13	28
No valorable	2	7	5	14
Normal	1	4	1	6
Patológico	1		7	8

### 2.1.3 Concordancia de diagnósticos FISH para los distintos resultados de cariotipo en las 1648 muestras mieloides.

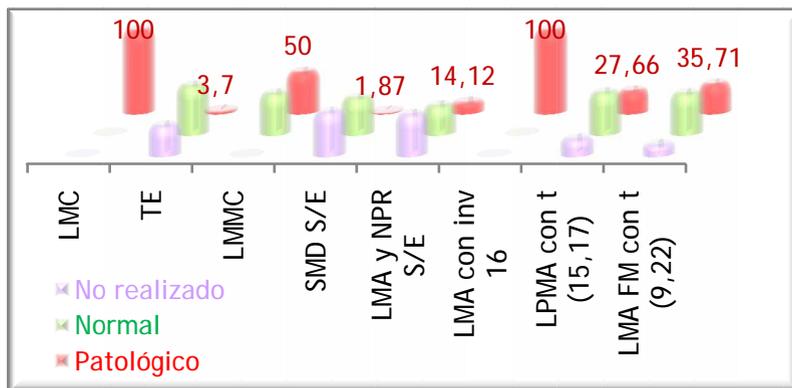
#### FISH EN CARIOTIPOS NO VALORABLES

Entre los cariotipos no valorables, las FISH que se realizan confirman patología en el 100% de las leucemias mieloides crónicas bcr abl, el mismo porcentaje en la única muestra de leucemias con inversión del 16, seguidas con un 35,71% de patología en las LA de fenotipo mixto con t (9,22) y un 27,66% de leucemias promielocíticas agudas con translocación t(15;17).

En la tabla 50 del anexo pueden ver el detalle de la concordancia entre los resultados de las muestras con cariotipo no valorable y su correspondiente resultado de FISH.

En la imagen 34 se describe el porcentaje de resultados de FISH patológicos para las muestras con cariotipo no valorables en distintas entidades, y su relación con los FISH que coincidían en el diagnóstico del cariotipo y los que no se realizaron.

Imagen 34: FISH patológicos en cariotipos no valorables, en entidades donde había discrepancias que implicaban cambios terapéuticos.



117

La FISH aportó información relevante para los cariotipos no valorables en el 12,27% de la muestra total (107 de 872), en las patologías descritas en la siguiente tabla:

Tabla 15: Entidades en las que FISH aportó información relevante en muestras con cariotipos no valorables.

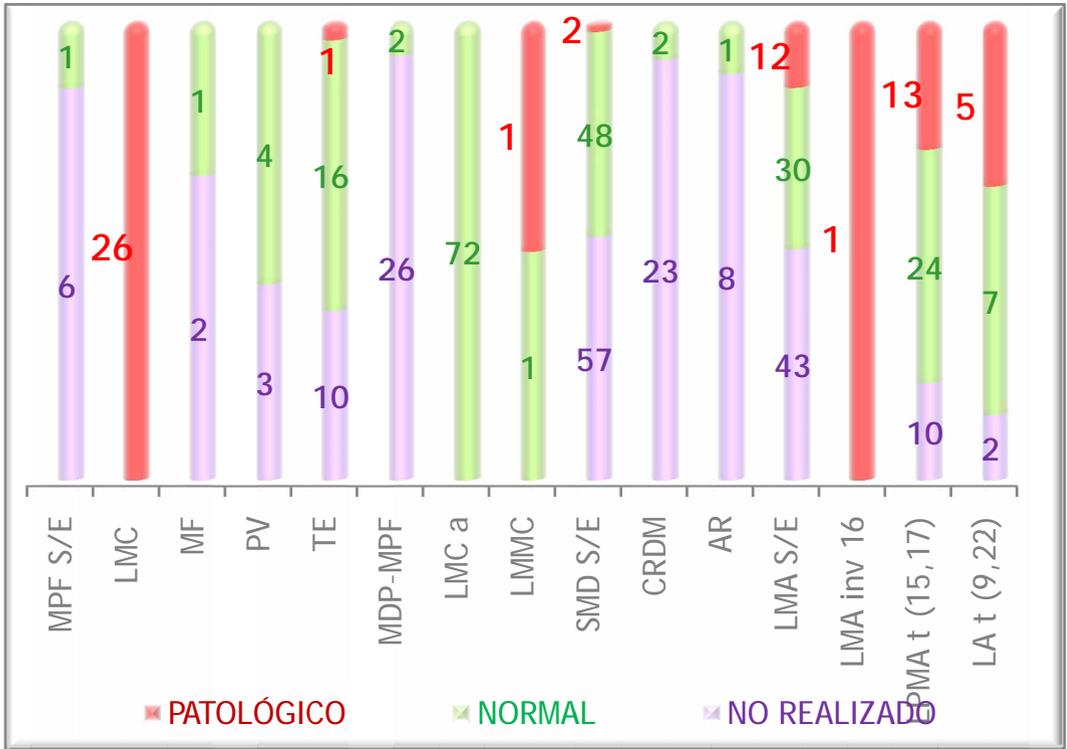
Cariotipos no valorables	RESULTADOS DE FISH	
	NORMAL	PATOLÓGICO
LMC		26
LMA y PR. S/E	30	12
LPMA con t (15,17)	24	13
LMA FM con t (9,22)	7	5

Junto a estos datos interesa considerar que las alteraciones cromosómicas son un factor predictivo independiente en el pronóstico de la supervivencia y en la cuantificación de las posibilidades de progresión hacia leucemia mieloide aguda. (Bernasconi P 2006).

Partiendo de las muestras cuyo cariotipo resultó no valorable, mostramos en 3 colores las barras de los resultados de la FISH. Las barras violetas indican las muestras a las que no se realizó FISH, las rojas indican las muestras que obtuvieron una FISH patológica y las verdes aquellas muestras con una FISH sin patología.

Imagen 35: Concordancia de los resultados de la FISH con los cariotipos no valorables.

119



## FISH EN CARIOTIPOS NORMALES

Entre los cariotipos que resultaron normales, y a los que se les aplicó FISH, destacan diagnósticos patológicos en el 100% de las leucemias mieloides crónicas bcr abl y en el 33,33 % de LMA con t(8;21), cuya muestra sólo se reduce a 3 pacientes.

En la tabla 51 del anexo pueden ver el detalle de la concordancia entre los resultados de las muestras con cariotipo normal y su correspondiente resultado de FISH.

En la imagen 36 se describe el porcentaje de resultados de FISH patológicos en las muestras con cariotipo normales en distintas entidades y su relación con los FISH que coincidían en el diagnóstico del cariotipo y los que no se realizaron.

120

Imagen 36: FISH patológicos en cariotipos normales, en entidades donde había discrepancias que implicaban cambios terapéuticos.

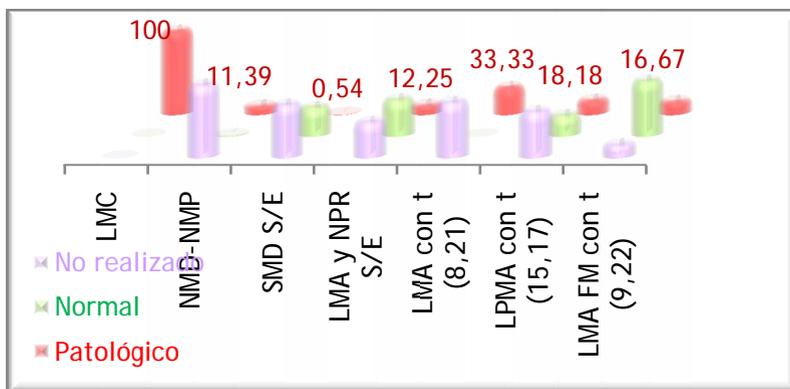
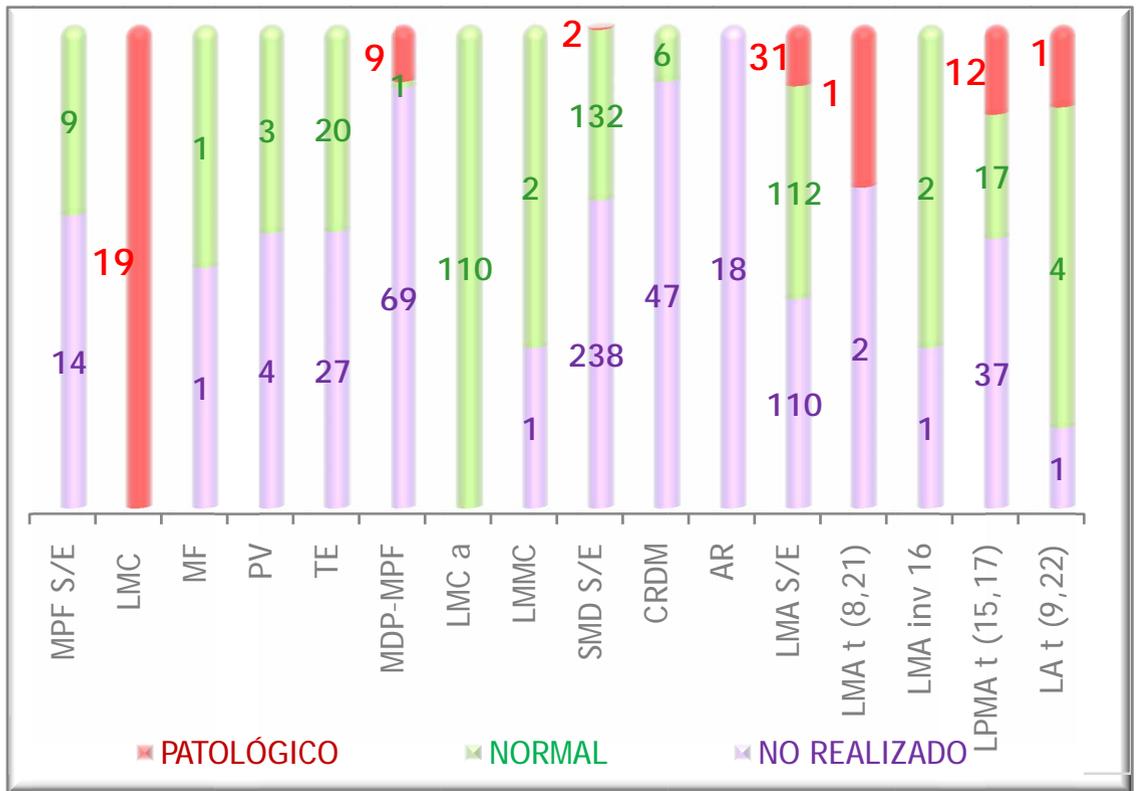


Imagen 37: Concordancia de los resultados de la FISH con los cariotipos normales.

121



### FISH EN CARIOTIPOS PATOLÓGICOS

Pese a tener un cariotipo patológico, la FISH demostró que el 66,67% de las sospechas clínicas de trombocitemias no tenían alteraciones genéticas, lo mismo con el 33,33% de las anemias refractarias (aunque la muestra de ambas no es representativa) y de las LMA S/E, y con el 21,43 % de las leucemias promielocíticas agudas con t (15,17). Por otro lado, ambas técnicas coinciden 100% en diagnósticos patológicos en las mieloproliferativas

S/E (tampoco hay muestra suficiente para validar conclusiones), las leucemias mieloide crónicas bcr-abl + y con un 87,50% de las LA fenotipo mixto con t (9;22).

En la tabla 52 del anexo pueden ver el detalle de la concordancia entre los resultados de las muestras con cariotipo patológico y su correspondiente resultado de FISH.

En la imagen 38 se describe el porcentaje de resultados de FISH normales en las muestras con cariotipo patológicos en distintas entidades y su relación con los FISH que coincidían en el diagnóstico del cariotipo y los que no se realizaron.

Imagen 38: FISH normales en cariotipos patológicos, en entidades donde había discrepancias que implicaban cambios terapéuticos.

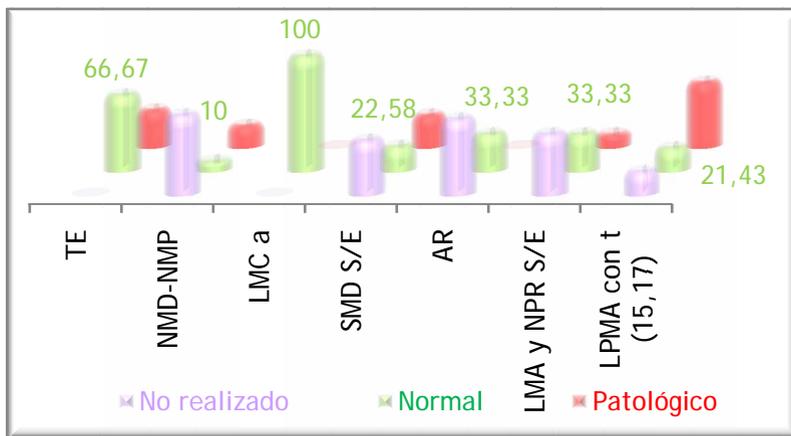
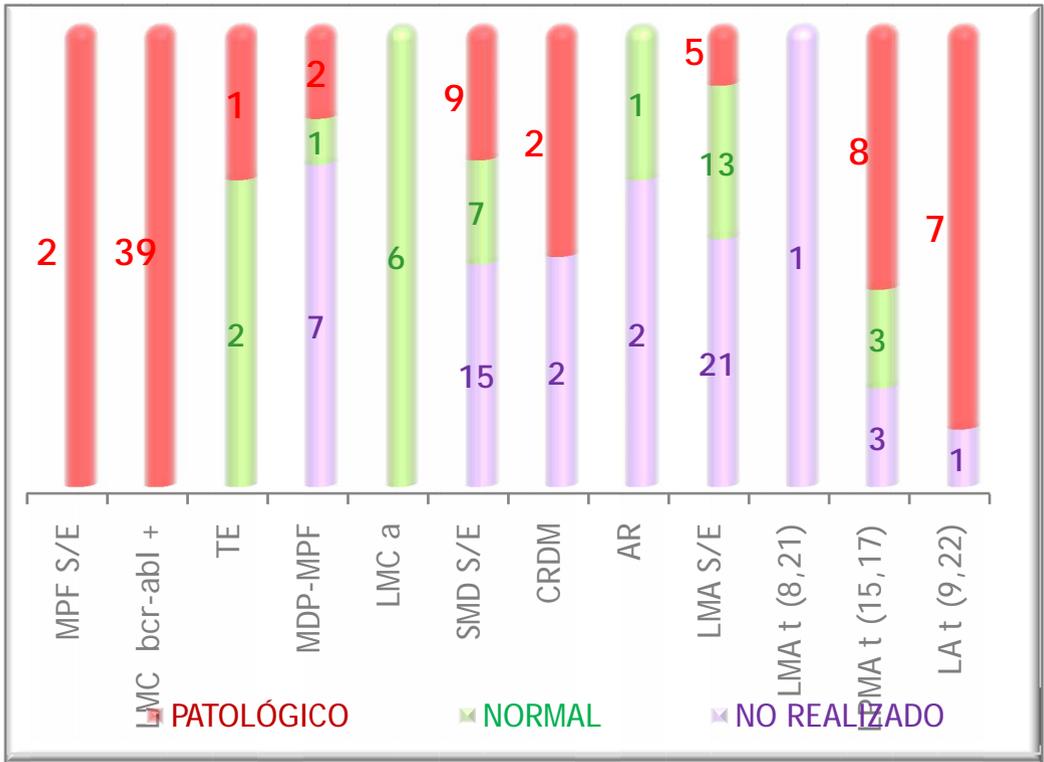


Imagen 39: Concordancia de los resultados de la FISH con los cariotipos patológicos.



#### 2.1.4 CORRELACION SOSPECHA CLINICA Y CONFIRMACIÓN CON CARIO-TIPO

Existen diferencias importantes entre el grado de sospecha clínica y la confirmación con técnica de bandas G.

La sospecha clínica que mas confirma el cariotipo es la leucemia mieloide crónica BCR ABL (46,43%), seguida por la leucemia aguda con fenotipo mixto con translocación 9,22 (25%).

Las mayores diferencias se encuentran en Policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis primaria y LMA con inv 16, todas con 0% de confirmación de sospecha clínica.

El detalle de los porcentajes la concordancia entre la sospecha clínica y los resultados de cariotipo para cada entidad se pueden ver en el anexo de tablas, en la tabla 48.

124

#### 2.1.5 CORRELACION SOSPECHA CLINICA Y CONFIRMACIÓN CON FISH

Existen diferencias entre el grado de sospecha clínica y la confirmación con técnica de FISH, aunque menos importantes que las existentes con el cariotipo.

Las sospechas clínicas que mas confirma la FISH son las mismas que con cariotipo, pero en distinto porcentaje: La leucemia mieloide crónica BCR ABL se confirma en el 100% de los casos, seguida por la leucemia aguda con fenotipo mixto con translocación (9;22) que se confirma en un 46,43% de los casos.

Las mayores diferencias se encuentran también en Policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis primaria. Difiere con el cariotipo en confirmar diagnóstico en 25% de las LMA con inv 16, y no confirma ninguna anemia refractaria.

En la Tabla 49 del anexo, se muestra en porcentaje, la concordancia entre la sospecha clínica y los resultados de FISH para cada entidad.

## 2.2 ESTUDIOS DE LAS 872 MUESTRAS MIELOIDES (OMITIENDO LAS QUE NO TENIAN FISH)

Una vez eliminadas las muestras a las que no se les había realizado la técnica de FISH, la muestra quedó reducida a 872 casos. En las distintas entidades clínicas, hay gran diversidad en el porcentaje de muestras las que se le solicita FISH. Contrasta el 100% de las LMC vs el 10% de las CRDM. A continuación se analizan las causas por las que se pidió la FISH.

125

## 2.3 CAUSAS POR LA QUE SE REALIZÓ LA FISH

Las razones para realizar FISH variaron en función del resultado obtenido en el cariotipo. Así de las 1684 muestras mieloides, entre los 1064 cariotipos normales, a 494 (46,42%) se les realizó FISH buscando una alteración vinculada con la sospecha diagnóstica. Para confirmar patología hallada en el cariotipo (160 cariotipos patológicos) se realizó FISH al 67,5% (108) de las muestras y tras no haber obtenido resultado alguno en 460 cariotipos, se estudiaron mediante FISH 270 de éstas muestras, el 58,69% de ellas, siendo 61 (22,59%) patológicas.

Tabla 16: Causas de realización de FISH

Pacientes	Cariotipo	FISH solicitada	%
1064	CRT Normales	494	46,42
160	CRT Patológicos	108	67,5
460	CRT No valorable	270	58,69
1684	Total	872	51,78

Como se verá a continuación en la imagen 40:

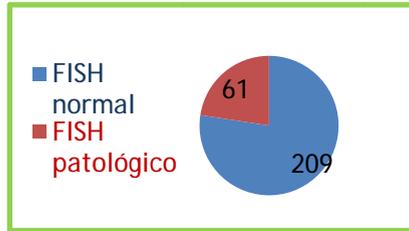
- ✓ De los 270 CRT no valorables, 61 tuvieron una FISH patológica
- ✓ De entre los 494 CRT normales, 75 tuvieron FISH patológica
- ✓ De los 108 CRT patológicos, 33 tuvieron una FISH normal.

Dependiendo del resultado citogenético, se hizo el estudio de FISH:

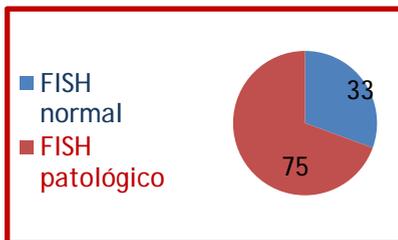
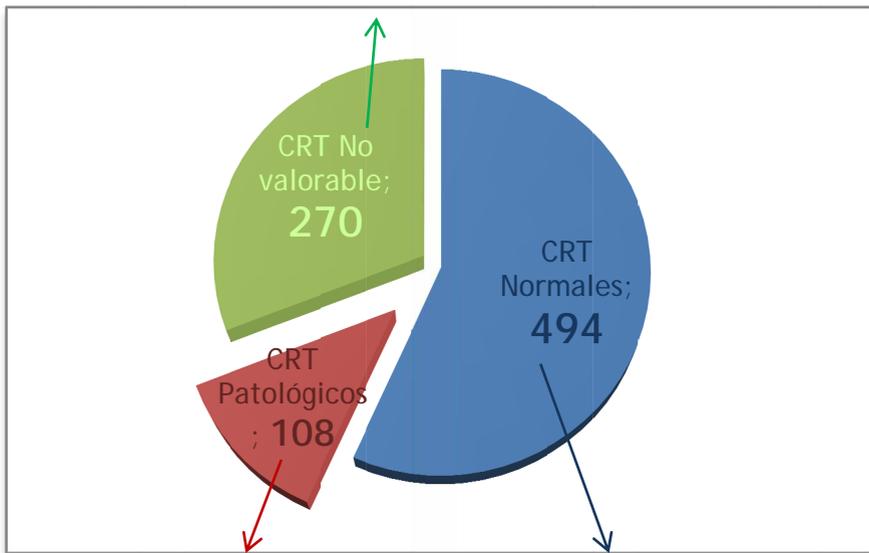
- ✓ Al 46,42% (n=1064) de los cariotipos normales.
- ✓ Al 67,5% (n=160) de los cariotipos patológicos.
- ✓ Al 58,69% (n=460) de los cariotipo no valorables.

Imagen 40: Causas de la realización de FISH y resultados en cada caso

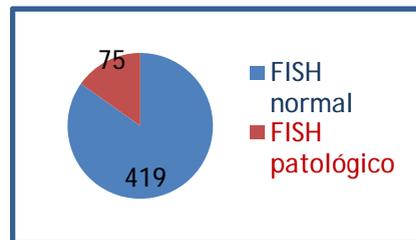
FISH en cariotipos no valorables



127



FISH en cariotipos patológicos



FISH en cariotipos normales

En la siguiente tabla, se observan los resultados de la FISH para cada resultado de cariotipo.

Tabla 17: Resultados de la FISH aplicada a las 872 muestras mieloides, desagregadas según los distintos resultados de cariotipo (valores absolutos)

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	PA-TOLÓGICO	Total eneral
<b>Mieloproliferativas S/E</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>12</b>
No valorable	1		1
Normal	9		9
Patológico		2	2
<b>LMC</b>		<b>84</b>	<b>84</b>
No valorable		26	26
Normal		19	19
Patológico		39	39
<b>Mielofibrosis primaria</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
No valorable	1		1
Normal	1		1
<b>Policitemia Vera</b>	<b>7</b>		<b>7</b>
No valorable	4		4
Normal	3		3
<b>Trombocitemia esencial</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>40</b>
No valorable	16	1	17
Normal	20		20
Patológico	2	1	3

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	Resultados de cariotipo	NORMAL
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
No valorable	2		2
Normal	1	9	10
Patológico	1	2	3
<b>LMC a</b>	<b>188</b>		<b>188</b>
No valorable	72		72
Normal	110		110
Patológico	6		6
<b>Mielomonocítica crónica</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
No valorable	1	1	2
Normal	2		2
<b>SMD S/E</b>	<b>187</b>	<b>13</b>	<b>200</b>
No valorable	48	2	50
Normal	132	2	134
Patológico	7	9	16
<b>CRDM</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>10</b>
No valorable	2		2
Normal	6		6
Patológico		2	2
<b>Anemias refractarias</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
No valorable	1		1
Patológico	1		1
<b>LMA y NPR. S/E</b>	<b>155</b>	<b>48</b>	<b>203</b>
No valorable	30	12	42
Normal	112	31	143

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	Resul- os de iotipo	NOR- MAL
Patológico	13	5	18
<b>LMA con t (8,21)</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
Normal		1	1
<b>LMA con inv 16</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
No valorable		1	1
Normal	2		2
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>44</b>	<b>33</b>	<b>77</b>
No valorable	24	13	37
Normal	17	12	29
Patológico	3	8	11
<b>LMA FM con t (9,22)</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>24</b>
No valorable	7	5	12
Normal	4	1	5
Patológico		7	7

130

En la tabla 33 del anexo se expresan estos mismos resultados en porcentaje.

#### 2.4 ESTUDIO DE LAS 602 MUESTRAS DE NEOPLASIAS MIELOIDES QUE POSEEN RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH

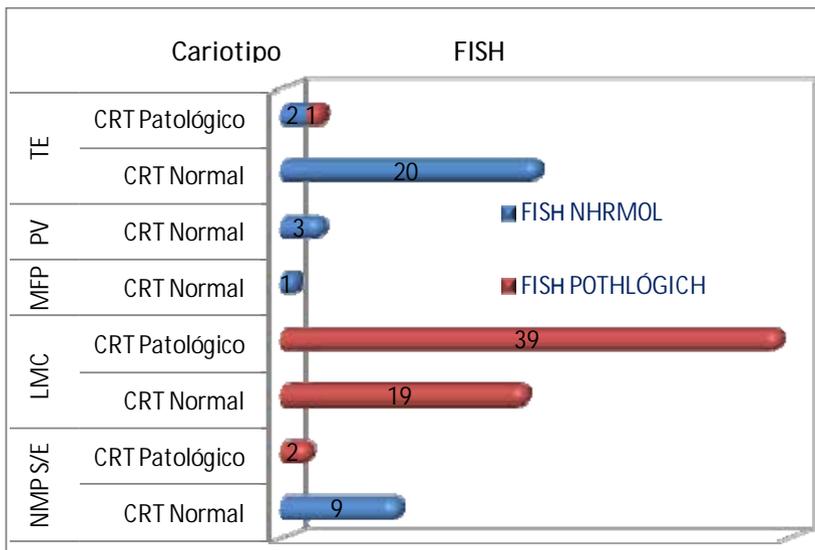
Tal y como vimos en la tabla 13, nos quedaron 602 muestras que disponían de resultados válidos para ambas pruebas diagnósticas. A continuación se muestran los gráficos de los resultados obtenidos para cada entidad, agregadas por grupos diagnósticos según la clasificación actual. El cariotipo

está en el lado izquierdo de los gráficos, y las barras rojas y azules horizontales de la derecha, indican sus correspondientes resultados de FISH.

### 2.4.1 NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

En la imagen 41 se muestra que para el grupo NMP, dentro del grupo de muestras que disponen de resultados válidos de cariotipo y FISH, la única entidad con 2 “falsos positivos” es una TE, y la LMC tiene 19 “falsos negativos”.

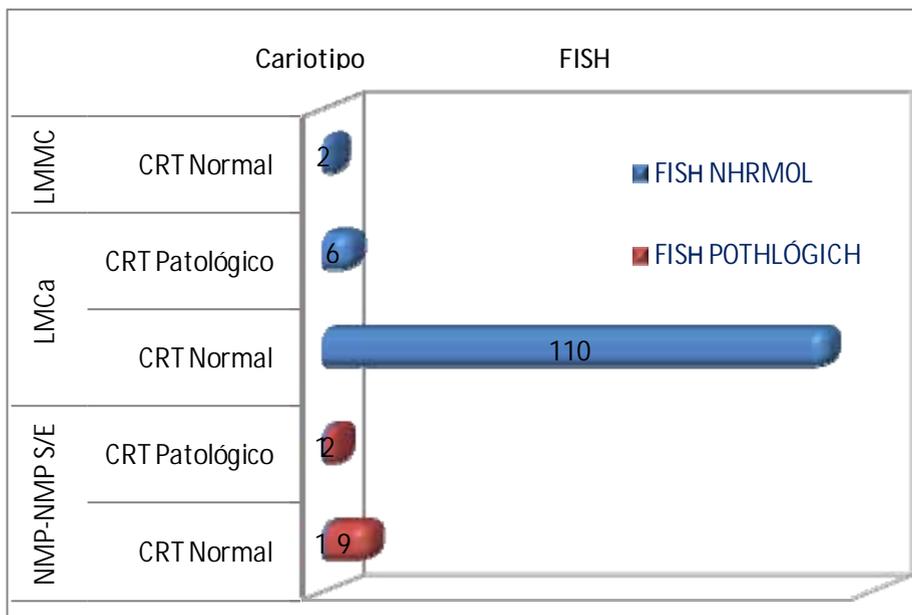
Imagen 41: Comparativa de los resultados de cariotipo y FISH de las NMP.



### 2.4.2 NEOPLASIAS MIELODISPLASICAS/ MIELOPROLIFERATIVAS

Dentro de este grupo hay seis “falsos positivos” entre los cariotipos de las LMCa y uno dentro de las NMDP/NMP S/E, a la vez que nueve “falsos negativos” en este mismo subgrupo tal como muestra la imagen 42.

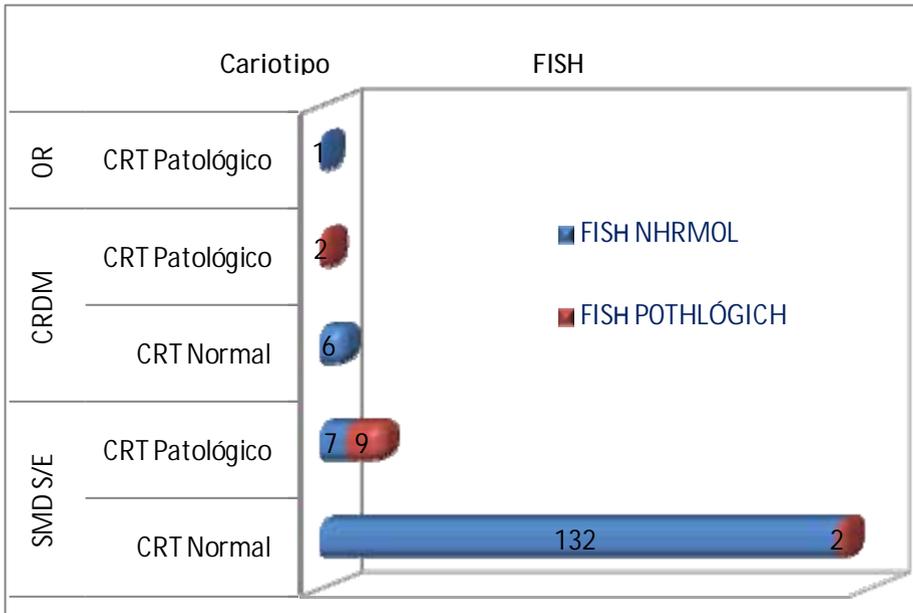
Imagen 42: Comparativa de los resultados de cariotipo y FISH de las neoplasias mielodisplásicas / mieloproliferativas.



### 2.4.3 SINDROMES MIELODISPLASICOS

El subgrupo de SMD/SE es el que tiene la muestra mas abundante de todas, y en él encontramos 7 cariotipos “falsos positivos” y 2 “falsos negativos”, como podemos ver en la imagen 43.

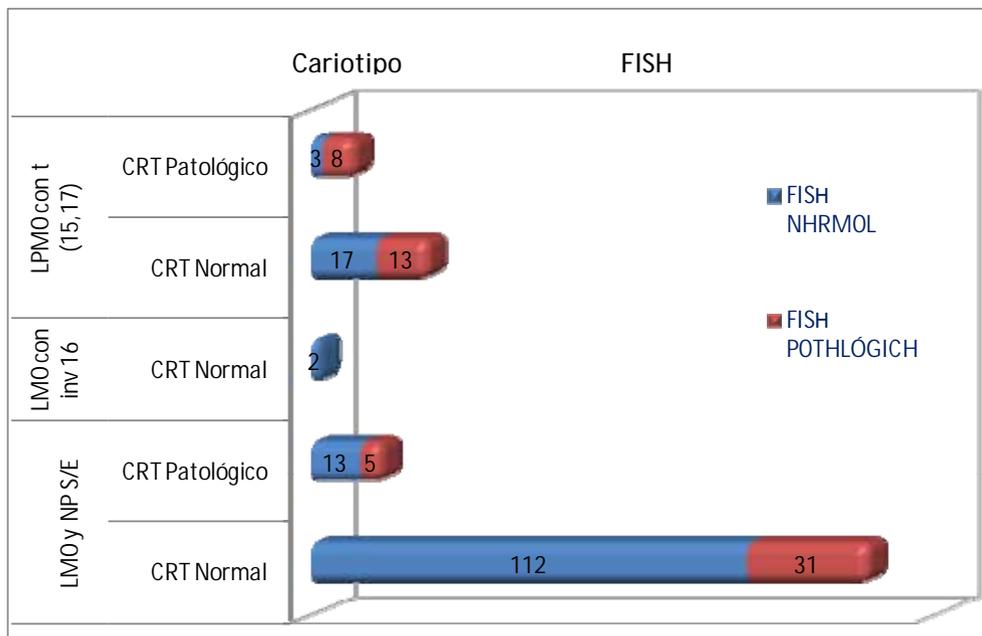
Imagen 43: Comparativa de los resultados de cariotipo y FISH de los Síndromes Mielodisplásicos.



#### 2.4.4 LMA Y NEOPLASIAS DE PRECURSORES RELACIONADOS

Este grupo es el que presenta mayores discrepancias entre los resultados de cariotipo y los de FISH, como podemos ver en la imagen 44. Esto se correlaciona con una mayor valoración por parte de la clasificación de la OMS de la aportación de las técnicas de diagnóstico genético a la clasificación correcta de las mismas.

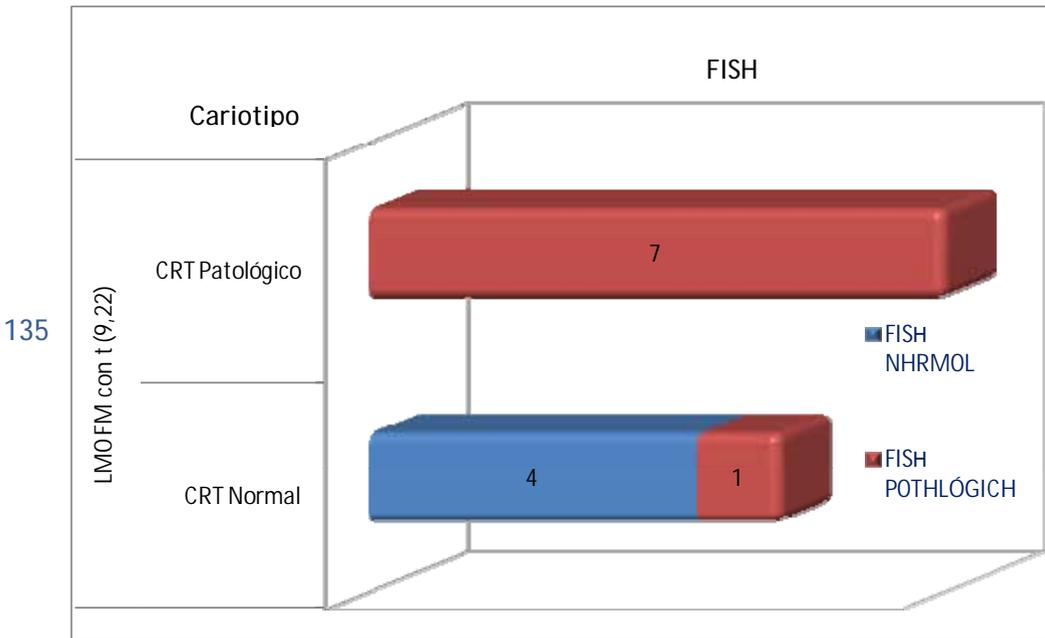
Imagen 44: Comparativa de los resultados de cariotipo y FISH de las LMA y de precursores relacionados.



### 2.4.5 LMA CON FENOTIPO MIXTO Y T (9;22) (Q34;Q11.2)

De este grupo, solo hemos estudiado una entidad, pues el resto se diagnostican con inmunohistoquímicas.

Imagen 45: Comparativa de los resultados de cariotipo y FISH de las LMA con fenotipo mixto y t(9;22) (q34;q11.2)



## 2.5 CARIOTIPOS PATOLOGICOS EN PACIENTES CON FISH NORMALES Y CARIOTIPOS NORMALES EN PACIENTES CON FISH PATOLOGICO

Interesa aclarar que una muestra puede tener un cariotipo patológico y una FISH normal o viceversa, y en rigor, no podemos hablar de que haya un falso positivo en el resultado del cariotipo. Pero la idea es, que si la FISH es patológica, el paciente porta la enfermedad, y un cariotipo normal que podría considerar al individuo en cuestión como "sano", se equivoca.

Tras comparar los resultados de cariotipo y FISH, ponemos en la tabla siguiente la información sobre los resultados discrepantes entre ambas técnicas. En esta tabla se ha incluido en la columna de falsos positivos, aquellas muestras con cariotipo patológico y FISH compatible con paciente sano. Por el contrario, en la columna de falsos negativos se incluyen las muestras con cariotipo normal y FISH patológica.

136

Tabla 18: % discrepancia de resultados CRT vs FISH en las distintas entidades

ENTIDAD (n)	"Falsos Positivos" (CRT patológicos y FISH normales)	"Falsos Negativos" (CRT normales y FISH patológicos)
LMC (58)		100%
TE (23)	67%	
NMD NMP S/E (13)	33%	90%
LMC a (116)	100%	
SMD S/E (150)	44%	1%
LMA y NPR S/E (161)	72%	22%
LPMA con t (15,17) (41)	27%	41%
LMA FM con t (9,22) (12)		20%

Una particularidad es que las leucemias mieloides crónicas se decantan por típicas o atípicas una vez que se obtiene el resultado genético. Por otro lado, esta división de entidades es posterior a la recogida de muestras, por tanto, los valores de falsos resultados para estas dos entidades hay que ponderarlos considerando esto. Es importante valorar el resultado porcentual en el contexto del número de casos de cada patología, escrito entre paréntesis al lado del nombre de la patología de sospecha clínica, motivo por el cual, podemos dar valor al resultado obtenido entre los 150 casos de SMD S/E, pero no al de las NMD NMP S/E

## 2.6 ANALISIS ESTADISTICO

Al disponer de variables ordinales de dos niveles, calculamos con el programa informático SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) el coeficiente de concordancia kappa, que nos arroja los datos que exponemos en la tabla 18 siguiente.

137

Tabla 19: Resumen del análisis con SPSS de la concordancia del total de la muestra

		<b>FISH</b>		Total	
		normal	patológico		
<b>Cariotipo</b>	<b>normal</b>	Recuento	419	75	494
		% dentro de cariotipo	84,8%	15,2%	100,0%
		% dentro de fish	92,7%	50,0%	82,1%
		% del total (de 602)	69,6%	12,5%	82,1%
	<b>patológico</b>	Recuento	33	75	108
		<b>CARIOTIPO</b>	<b>FISH</b>		

	patológico	normal	patológico	Total
Total	% dentro de cariotipo	30,6%	69,4%	100,0%
	% dentro de fish	7,3%	50,0%	17,9%
	% del total (de 602)	5,5%	12,5%	17,9%
	Recuento	452	150	602
	% dentro de cariotipo	75,1%	24,9%	100,0%
	% dentro de fish	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	75,1%	24,9%	100,0%

<b>Medidas simétricas del conjunto total de la muestra (n=602)</b>				
	Valor	Error típico asintótico. <sup>a</sup>	T aprox. <sup>b</sup>	P valor ó Sig. aprox. <sup>b</sup>
Medida de acuerdo	<b>Kappa 0,471</b>	0,043	11,810	<b>0,000 (P&lt;0,05)</b>
	Casos válidos 602			
a. Asumiendo la hipótesis alternativa.				
b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.				

138

Si tomásemos los 602 casos como una única muestra, pretendiendo analizar la concordancia de los resultados de FISH y cariotipo en el conjunto de las neoplasias mieloides, resulta que si hay concordancia, según se ve en la tabla siguiente.

Tabla 20: Distribución de frecuencias bivariado del cariotipo y del FISH en los 602 casos de la muestra.

		FISH		*P valor
		NORMAL	PATOLÓGICO	<0,001
CARIOTIPO	NORMAL	<b>419(84,8)</b>	75 (15,20)	
	PATOLÓGICO	33 (30,6)	<b>75 (69.4)</b>	

\* Valor de probabilidad para el coeficiente de concordancia de Kappa.

La tabla 18 muestra el acuerdo significativo ( $\kappa= 0,4711$ ;  $p=0,001$ ), moderado, existente entre los resultados de la FISH y del CARIOTIPO al considerar la totalidad de las entidades neoplásicas mieloides ( $n=602$ ). Las celdas representan a las frecuencias absolutas y entre paréntesis están los porcentajes. Los valores en negritas son los concordantes. El P valor de la muestra es menor que 0,05, esto significa que los datos son válidos.

139

Como sabemos el comportamiento de cada entidad es bastante distinto entre sí, motivo por el que a continuación desagregamos los resultados obtenidos para cada grupo.

Como al desagregarlas, se reduce el número de muestras, hay entidades cuyo número de casos resulta insuficiente para conclusiones generalizables. En todo caso a continuación se describe los resultados obtenidos para cada entidad, y en rojo se destacan aquellas concordancias (kappa) válidas.

Tabla 21: Coeficiente de concordancia Kappa para las distintas sospechas clínicas

Sospecha clínica			Valor	Error típico Asintótico <sup>a</sup>
NMP S/E	Medida de acuerdo	Kappa	1,000	,000
LMC	Medida de acuerdo	N de casos válidos	11	
		Kappa	. <sup>c</sup>	
		N de casos válidos	58	
MF	Medida de acuerdo	Kappa	. <sup>d</sup>	
PV	Medida de acuerdo	N de casos válidos	1	
		Kappa	. <sup>d</sup>	
TE	Medida de acuerdo	N de casos válidos	3	
		Kappa	,465	,305
		N de casos válidos	23	
NMD NMP S/E	Medida de acuerdo	Kappa	-,121	,164
LMC a	Medida de acuerdo	N de casos válidos	13	
		Kappa	. <sup>c</sup>	
		N de casos válidos	116	

		Sospecha clínica	Valor	Error típico Asintótico <sup>a</sup>
	LMMC	Medida de acuerdo	Kappa . <sup>d</sup>	
		N de casos válidos	2	
	SMD S/E	Medida de acuerdo	Kappa ,635	,111
		N de casos válidos	150	
	CRDM	Medida de acuerdo	Kappa 1,000	,000
		N de casos válidos	8	
	AR	Medida de acuerdo	Kappa . <sup>d</sup>	
		N de casos válidos	1	
141	LMA y NPR	Medida de acuerdo	Kappa ,042	,077
		N de casos válidos	161	
	LMA con inv 16	Medida de acuerdo	Kappa . <sup>d</sup>	
		N de casos válidos	2	
	LPMA con t (15,17)	Medida de acuerdo	Kappa ,228	,133
		N de casos válidos	41	
	LMA FM con t (9,22)	Medida de acuerdo	Kappa ,824	,166
		N de casos válidos	12	

- a. Asumiendo la hipótesis alternativa.
- c. No se calcula ningún estadístico porque la FISH es una constante.
- d. No se calcula ningún estadístico porque el cariotipo y la FISH son constantes.

Tal como dicen Landis y Koch en relación a los valores posibles de kappa y el grado de acuerdo que implica que hay entre las dos determinaciones que se comparan, vemos que cuanto mas se acerque kappa a cero, mas diferencia hay entre ambos resultados, y por el contrario, cuando mas se acerque kappa al valor uno, mas indiferente es hacer una u otra prueba diagnóstica.

Tabla 22: Intervalos de acuerdo para kappa según Landis y Koch

kappa	grado de acuerdo
< 0	sin acuerdo
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 - 1	muy bueno

En el rango de concordancias "bueno", con valor de kappa entre 0,6 y 0,8; habría que valorar el riesgo inherente al pronóstico de cada entidad, para afirmar si se justifica o no aceptar el CRT como única prueba diagnóstica.

Las entidades con un valor de kappa "moderado", entre 0,4 y 0,6 están en situación "border line" y habría que profundizar en la sospecha clínica inicial y en el pronóstico posible antes de decantarse en exclusiva por una técnica diagnóstica.

Sin duda, las patologías con una concordancia "baja" ( $k=0,2$  a  $0,4$ ), "insignificante" ( $k=0$  a  $0,2$ ) o "sin concordancia" ( $k<0$ ), son candidatas a realizarse FISH como gold standard en su diagnóstico.

- 143 Para facilitar la interpretación de los resultados válidos, la tabla siguiente pone en **negrita** las entidades con un número de muestras representativa (mas de 20), y con un acuerdo significativo (de concordancia o discrepancia) , estadísticamente representativa, mas alta que la esperada por simple azar:

Tabla 23: Coeficiente de concordancia Kappa encontrado en nuestro estudio para las distintas sospechas clínicas

Dx clínico	Kappa	Error típico	Número de casos	P valor (si $p > 0,05$ muestra es insuficiente o no hay concordancia)
NMP	1	0,000	11 (muestra insuficiente)	0,001
<b>TE</b>	<b>0,465 (concordancia moderada)</b>	<b>0,305</b>	<b>23</b>	<b>0,008</b>
NMD NMP S/E	-0,121	0,164	13 (muestra insuficiente)	0,326
<b>SMD S/E</b>	<b>0,635 (concordancia buena)</b>	<b>0,111</b>	<b>150</b>	<b>0,000</b>
CRDM	1	0,000	8 (muestra insuficiente)	0,005
<b>LMA y NPR</b>	<b>0,042 (no existe concordancia)</b>	<b>0,077</b>	<b>161</b>	<b>0,558</b>
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>0,228 (no existe concordancia)</b>	<b>0,133</b>	<b>41</b>	<b>0,095</b>
<b>LMA FM con t (9,22)</b>	<b>0,824</b>	<b>0,166</b>	<b>12 (muestra insuficiente)</b>	<b>0,004</b>

### 3.-SONDAS FISH UTILIZADAS EN CADA ENTIDAD

A continuación se resumen los datos más relevantes encontrados y se añade un gráfico comparativo para cada entidad, incluyendo los resultados de los cariotipos válidos (omitiendo los cariotipos no valorables) y las FISH para cada grupo. Para cada resultado de las distintas sondas de FISH (co-

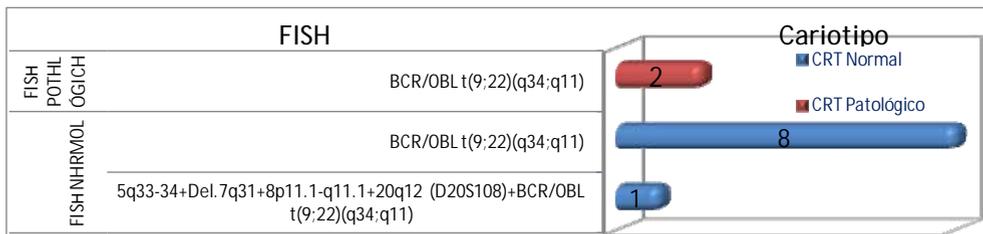
lumna vertical de la izquierda) se muestra el resultado del cariotipo (columnas horizontales rojas y azules).

## NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS SIN ESPECIFICAR

A la mayoría de las muestras con cariotipo no valorable (6/7) o normal (14/23), luego no se les realiza FISH.

Considerando sólo las muestras a las que se aplicó ambas técnicas (11): El 75% tiene cariotipo y FISH normales. De entre las muestras con ambas técnicas omitiendo aquellas cuyos cariotipos resultaron no valorables: El 82% de la muestra resultó normal y el resto patológica. La imagen 46 incluye los resultados de las muestras con resultados para ambas pruebas.

145 Imagen 46: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las neoplasias mieloproliferativas sin especificar, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).

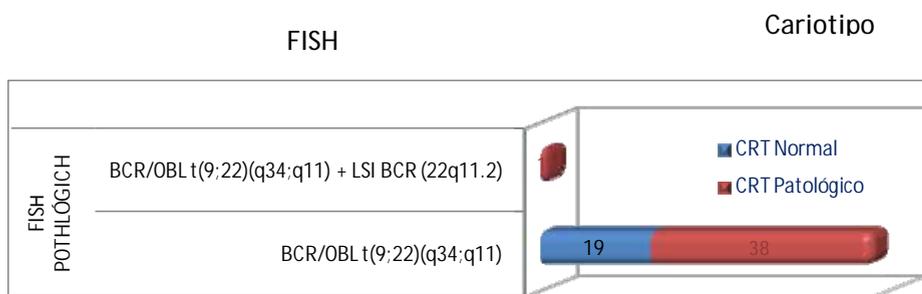


## LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

El 100% de los resultados no valorables de LMC bcr-abl+ mediante cariotipo, pudieron realizarse y dieron patológicos con la técnica de FISH. El 100% de las presunciones diagnosticas clínicas se confirmaron con FISH, pese a que 45 de las 84 muestras patológicas según FISH, no dieron este resultado con la técnica de cariotipo. Considerando sólo las muestras a las que se aplicó ambas técnicas: El 31% de las muestras patológicas tenían

cariotipos no valorables. De entre las muestras con ambas técnicas omitiendo aquellas cuyos cariotipos resultaron no valorables, el 67% resultaron patológicas para una y otra técnica (imagen 47).

Imagen 47: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las Leucemias mieloides crónicas bcr abl+, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).

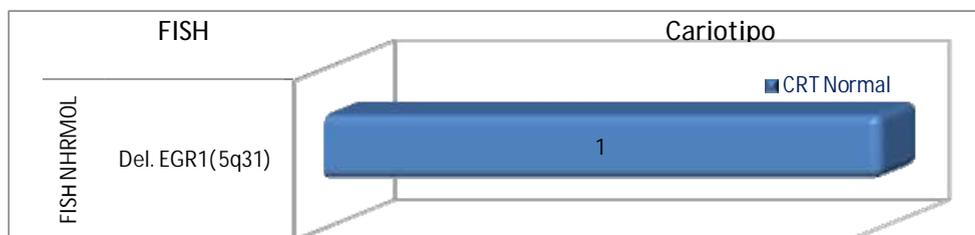


## MIELOFIBROSIS

146

La muestra total no es representativa como para sacar conclusiones, y tampoco lo es la única FISH realizada en el único cariotipo válido (imagen 48).

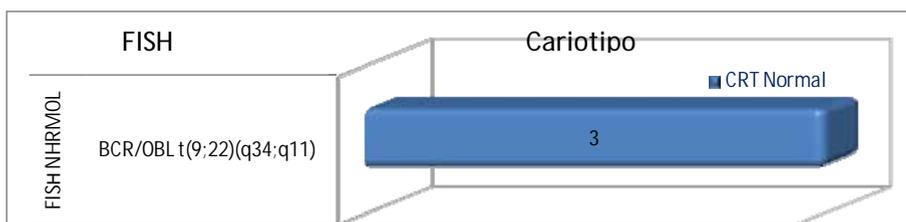
Imagen 48: Resultados de la sonda utilizada en la FISH en las mielofibrosis primarias, para el único resultado válido de cariotipo.



## POLICITEMIA VERA

De un total de 14 muestras, solo 7 tienen aplicadas ambas técnicas y, de entre éstas, el 57% de los cariotipos son no valorables, teniendo éstos una FISH normal. En la imagen 49 se comparan los resultados obtenidos en la FISH realizada en los 3 cariotipos válidos (normales).

Imagen 49: Resultados de la sonda utilizada en la FISH en las Policitemias vera, para los 3 cariotipos válidos obtenidos en muestras con esta sospecha clínica.

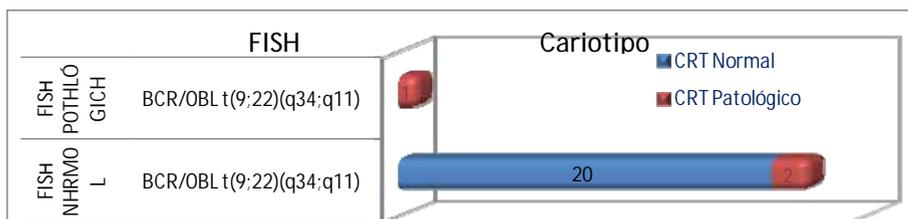


147

## TROMBOCITEMIA ESENCIAL

Sólo se aplicó FISH a 40 de las 77 muestras. De entre las 47 que tenían cariotipo normal, a 20 se le aplicó FISH confirmando el diagnóstico (imagen 50) y entre las otras 3 con cariotipo patológico, dos de éstos eran falso positivo de cariotipo. Dentro de los cariotipos no valorables, un 3% de las muestras son patológicas y un 40% son normales.

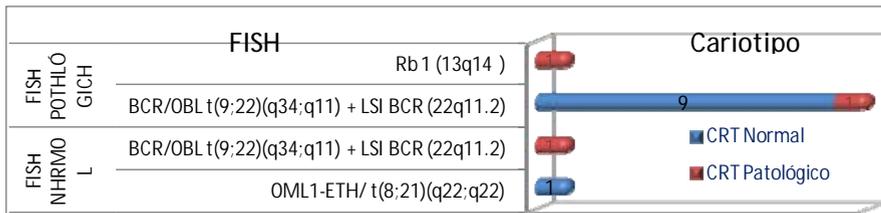
Imagen 50: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las trombocitemias esenciales, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



## NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS MIELOPROLIFERATIVAS S/E

La tendencia, al igual que en otras patologías, es que ante cariotipos normales (79), a la mayoría (69) no se realiza FISH. Pese a que de entre las 10 muestras a las que si se les realiza, 9 dieron patológica la FISH pese al cariotipo normal (imagen 51).

Imagen 51: Resultados de la sonda utilizada en la FISH en las neoplasias mielodisplásicas - mieloproliferativas sin especificar, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).

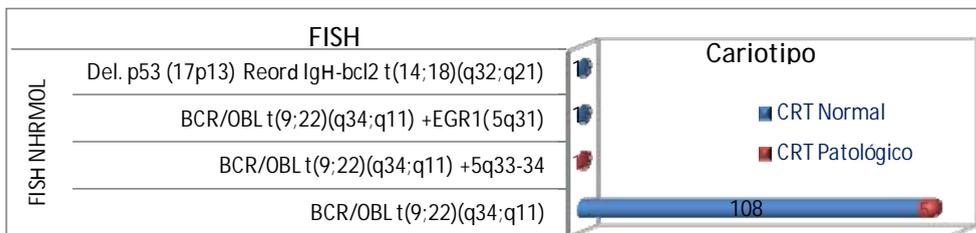


## LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA ATÍPICA

148

El 100% de las presunciones diagnósticas clínicas se confirmaron con la FISH. Del total de 188 muestras, 116 tenían ambas pruebas y con una FISH normal había 6 cariotipos patológicos (imagen 52).

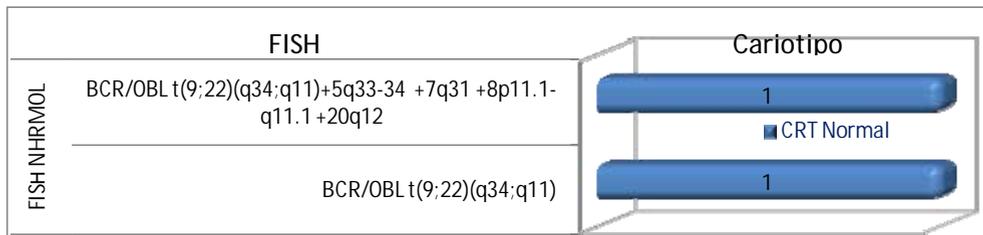
Imagen 52: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las leucemias mieloides crónicas atípicas bcr abl -, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



## LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA

La muestra total (5 pacientes) no es representativa como para sacar conclusiones. Y sólo hubo 2 cariotipos válidos que permitan comparar con FISH el resultado (imagen 53).

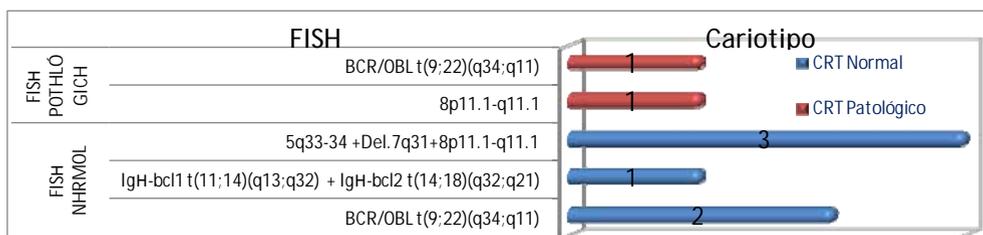
Imagen 53: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las Leucemias Mielomonocíticas crónicas, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



## CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILINAJE

149 Se realizó FISH exclusivamente a un 10% de la muestra (8 de 82) confirmando la FISH el diagnóstico de los cariotipos, como muestra la imagen 54.

Imagen 54: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en la citopenia refractaria con displasia multilineaje, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



## SINDROMES MIELODISPLASICOS S/E

Es la entidad con muestra mayor (510 casos), probablemente por depender la clasificación definitiva de "subentidad" del resultado de las pruebas obje-

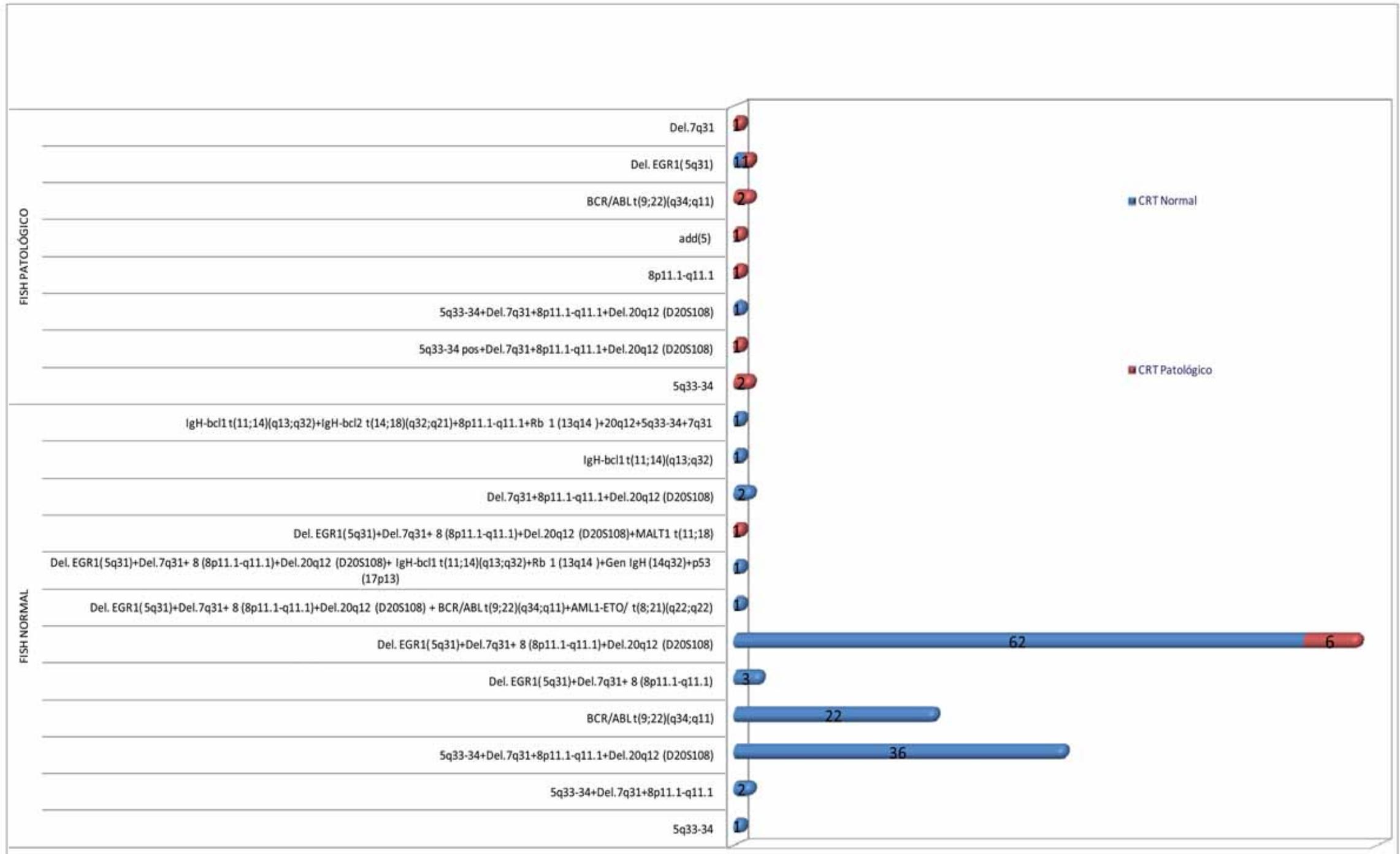
to de estudio, y por ser actualmente la entidad para la cual los estudios genéticos resultan más útiles en su clasificación, pronóstico y tratamiento.

De los 107 cariotipos no valorables, a 57 no se les aplicó FISH, 48 fueron normales según ésta y sólo 2 fueron patológicos. También hubo 7 cariotipos patológicos que tuvieron una FISH normal. (Imagen 55)

Ante los resultados de cariotipo normales (372), a casi dos tercios (238) no se les aplicó FISH y el resto, 132 tuvieron una FISH normal.

Imagen 55: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en los Síndromes Mielodisplásicos sin especificar, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).

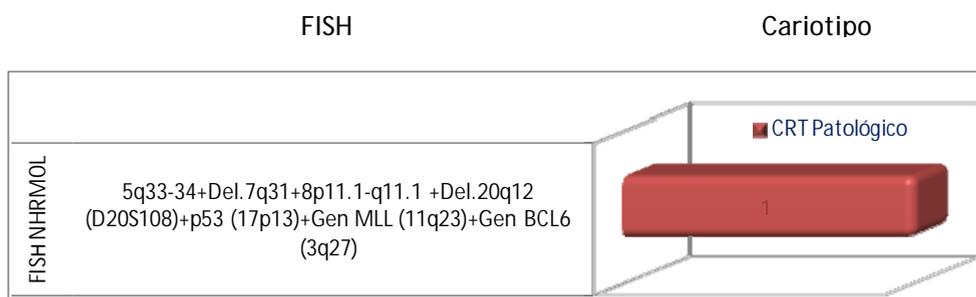
Imagen 55: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en los Síndromes Mielodisplásicos sin especificar, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



## ANEMIA REFRACTARIA

Se realizó FISH exclusivamente a uno de los 3 cariotipos patológicos (3 de 30), y éste resultó ser normal (imagen 47) pese a que se aplicaron 7 sondas distintas.

Imagen 56: Resultados de las sondas utilizadas en la única FISH solicitada en sospecha de anemia refractaria, tras obtener un resultado de cariotipo patológico.



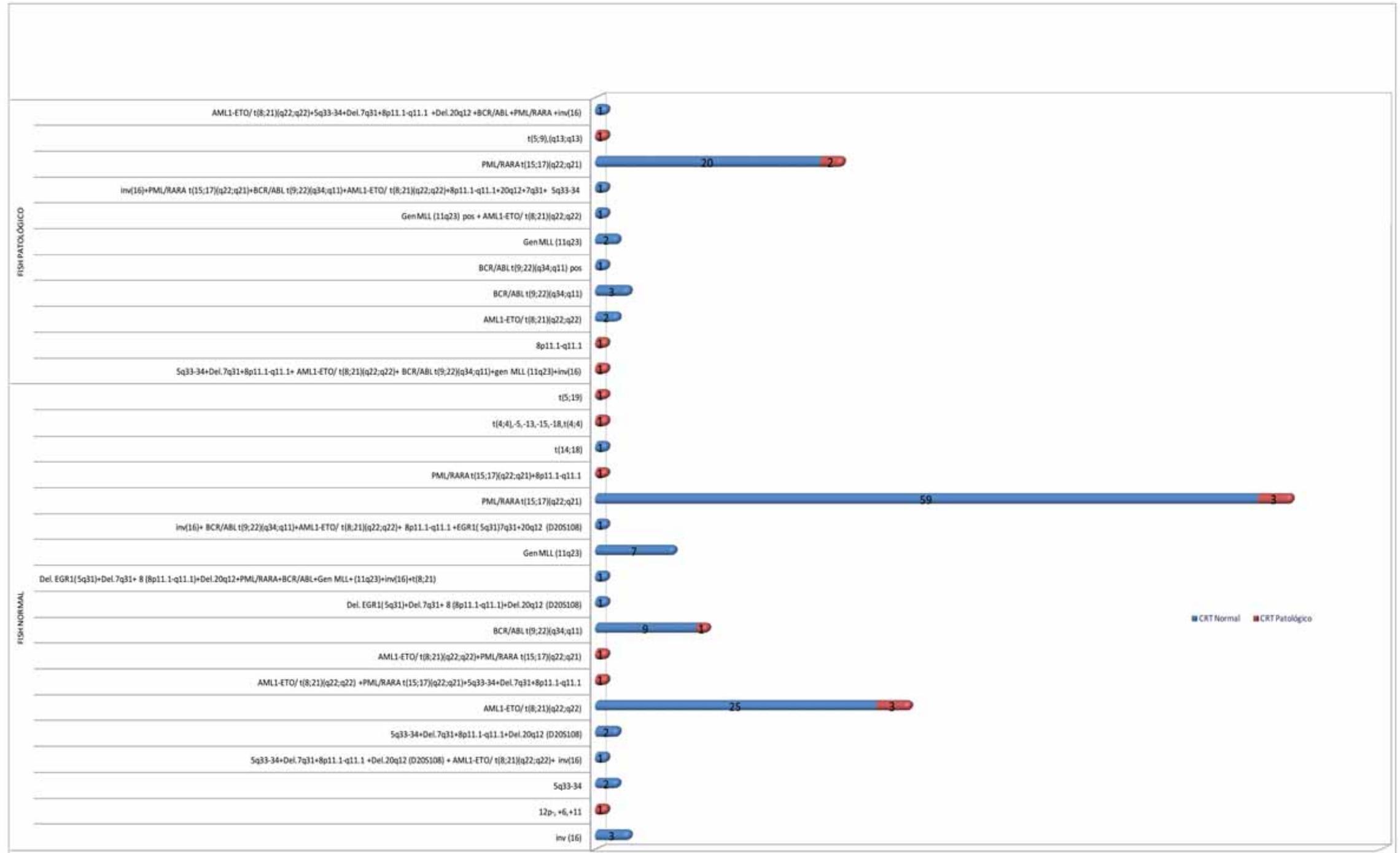
## LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y NEOPLASIAS DE PRECURSORES RELACIONADOS S/E

152

Debido a la nueva definición de esta entidad, es difícil sacar conclusiones generales de este grupo inespecífico porque hasta ahora era inexistente. Aunque si comentaremos sobre algunas entidades claramente definidas e incluidas en este grupo, y que vienen a continuación.

Se puede apreciar en la imagen 57, que abundan los cariotipos falsos negativos.

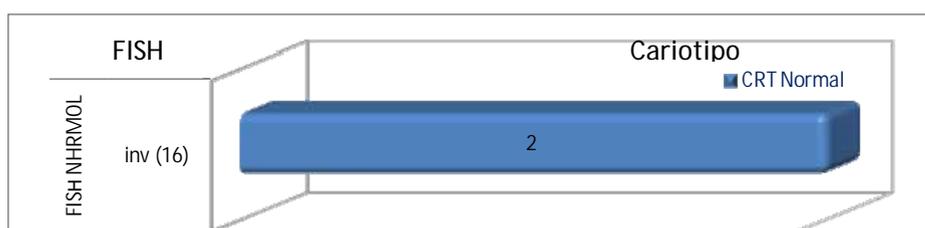
Imagen 57: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las LMA y NPR sin especificar, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



### LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON INVERSION 16

Esta entidad tiene pocas muestras (4), de los cuales, los dos cariotipos normales, también tuvieron una FISH normal. El único cariotipo no valorable resultó tener una FISH patológica. Y la única muestra con ambas pruebas resultó ser normal para ambas.

Imagen 58: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las LMA con inv 16, entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



154

### LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA CON t (15,17)

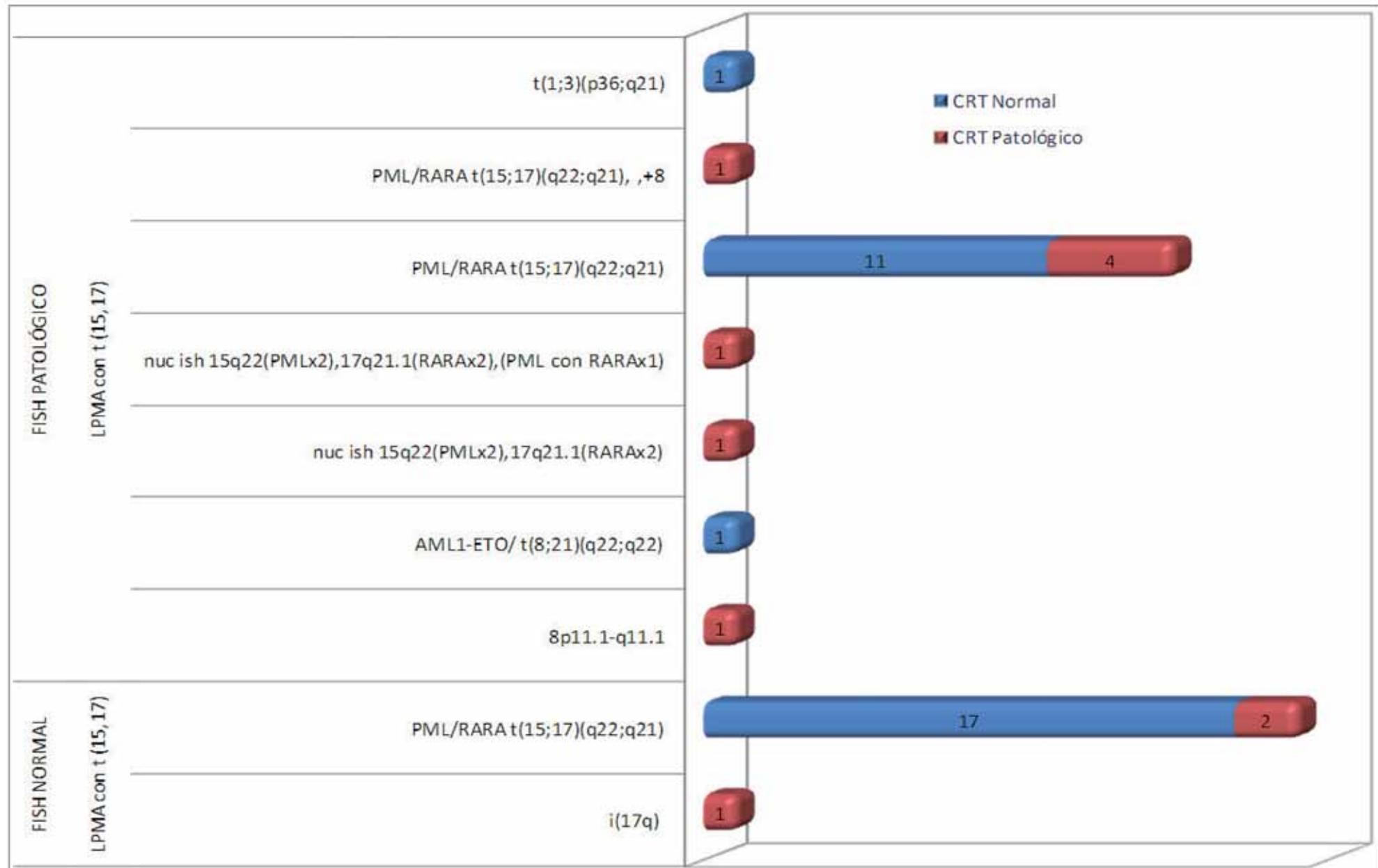
En esta entidad se concentra una importante demanda de FISH, de los 127 casos totales, 77 solicitan FISH. De entre los 47 cariotipos no valorables, se aplica FISH a 37, de entre los que 13 resultaron patológicos. De los 66 cariotipos normales a 37 se realiza FISH, obteniendo 12 patológicos. Y de los 14 cariotipos patológicos, a 11 se realiza FISH, resultando 3 normales (imagen 59).

En datos porcentuales, valorando solo las muestras con ambas pruebas realizadas, resulta que: un 38% de los resultados de cariotipo resultan normales, y de ellos, se realiza FISH solo al 43%. Cuando el cariotipo resul-

ta patológico, se aplica FISH al 78% (obteniéndose 72% patológicos y 28% normales).

Un 37% de los cariotipos no son valorables, y de estos, se aplica FISH al 78% (obteniéndose 35% patológicos y 65% normales)

Imagen 59: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las Leucemias promielocíticas agudas con t(15;17), entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).

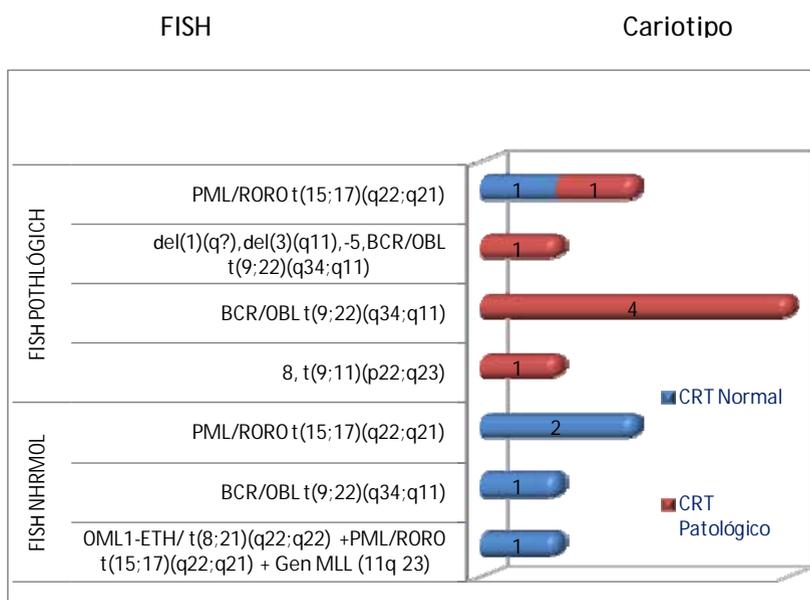


## LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA CON FENOTIPO MIXTO CON t (9,22)

Los cariotipos patológicos se corroboran como tales en el 100% de los casos a los que se le aplica FISH (imagen 60). Como se ve, se buscaron alteraciones extras respecto a la habitual t(9;22) presente en todas ellas por definición.

De la muestra total, un 50% de los cariotipos no son valorables. Dentro de este grupo de "no valorables", se aplica FISH al 85% y los resultados son: 58 % normales y 42% patológicos.

Imagen 60: Resultados de las sondas utilizadas en la FISH en las Leucemias agudas con fenotipo mixto con t(9;22), entre los cariotipos válidos (normales o patológicos).



### 3.2 VISIÓN GLOBAL DEL SONDAS

La cantidad de veces que se aplicó una sonda o combinación de ellas, de una a once sondas por muestra, se describe en las tablas 37, y 38, que muestran el detalle de todas las sondas aplicadas para cada diagnóstico de cariotipo en las 602 muestras que disponen de resultados validos de FISH y cariotipo.

A continuación, en la imagen 61 se aprecia la cantidad de veces que se utilizó una sonda o combinación de sondas.

Imagen 61: Valores de las selecciones de sondas más utilizadas.



157

sonda/s aplicadas	nn de pruebas
BCR/OBL t(9;22)(q34;q11)	252
PML/RORO t(15;17)(q22;q21)	122
Del. EGR1(5q31)+Del.7q31+8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	69
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	39
OML1-ETH/ t(8;21)(q22;q22)	32

BCR/OBL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)	12
Gen MLL (11q23)	9
inv (16)	5
5q33-34	5
5q33-34 +Del.7q31+8p11.1-q11.1	5
8p11.1-q11.1	4
Del. EGR1( 5q31)	3
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)	3
Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	2
40 muestras con 40 combinaciones distintas de sondas	1

De las 602 muestras a las que se aplicó 1 o más sondas de FISH, 452 obtuvieron resultados normales y 150 patológicos.

419 muestras tenían **cariotipo y FISH normales**. En la Tabla 40 del anexo se verá el detalle de las sondas aplicadas a las muestras con cariotipo y FISH normales. Y en la tabla 41 se desagregan los resultados para cada sospecha clínica.

158

75 muestras tenían **cariotipo normal y FISH patológico**, datos que se pueden ver con detalle en las tablas 42 y 43 del anexo. En este grupo cabe destacar los altos porcentajes patológicos de FISH entre las LMC, NMD-NMP S/E, las LMA y PR S/E y las LPMA con t(15,17).

75 muestras tenían **cariotipo y FISH patológicos** y se pueden ver en las tablas del anexo 44 y 45, estando en esta última el detalle desglosado para cada sonda y entidad.

33 muestras tenían **cariotipo patológico y FISH normal**, el detalle de las sondas aplicadas para obtener estos resultados se aprecia en las tablas 46 y 47 en el anexo final.



## 1.-COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH

Las discrepancias en los resultados de los distintos estudios que comparan los resultados de ambas técnicas, pueden explicarse por las diferencias en los porcentajes de núcleos patológicos que se consideran necesarios para diagnosticar una muestra como patológica, por las diferencias técnicas de los protocolos de los distintos laboratorios y/o de los equipos y por las diferencias en la selección de la muestra. Los estudios que analizan la concordancia entre cariotipos normales respecto a los resultados de la FISH, parten de una muestra sesgada que no se corresponde con la realidad de disponer de cariotipos normales y cariotipos patológicos. Ningún estudio incorpora la kappa como variable a considerar. Y pocos minimizan los sesgos de muestras, puesto que no se aplica en todos ellos la FISH “sistemáticamente”, como para comparaciones más válidas estadísticamente.

162

### 1.1 DISCREPANCIAS FISH – CARIOTIPO EN NEOPLASIAS MIELOIDES

Hay estudios (Cuneo A., et al 1998) que señalan que las líneas celulares anormales poseen un menor índice mitótico, motivo que justificaría algunas discrepancias entre los resultados de FISH y cariotipo.

El grupo de FISH patológicas incluía 75 muestras con cariotipos normales y 71 con cariotipos no valorables, distribuyéndose ambos grupos de forma similar para cada entidad, tal como se ve en la tabla siguiente.

Tabla 24: Esta tabla indica lo que aportó la FISH en las distintas entidades, en los casos en que el cariotipo resultó ser normal o no valorable.

<b>Cariotipos no valorables y normales por entidades</b>	<b>FISH PATOLÓGICOS HALLAHOS EN ESTOS CARIOTIPOS</b>
<b>LL C</b>	<b>45</b>
No valorable	26
Normal	19
<b>TE</b>	<b>1</b>
No valorable	1
<b>NL H/ NL P S/E</b>	<b>9</b>
Normal	9
<b>LL L C</b>	<b>1</b>
No valorable	1
<b>SL H S/E</b>	<b>4</b>
No valorable	2
Normal	2
<b>LL A y NPR S/E</b>	<b>43</b>
No valorable	12
Normal	31
<b>LL A con t (8,21)</b>	<b>1</b>
Normal	1
<b>LL A con inv 16</b>	<b>1</b>
No valorable	1
<b>LPL A con t (15,17)</b>	<b>25</b>
No valorable	13
Normal	12
<b>LA con FL con t (9,22)</b>	<b>6</b>
No valorable	5
Normal	1
<b>Total FISH Tue aportaron información</b>	<b>136</b>

Bernasconi y su equipo (Bernasconi P 2006) indican que la citogenética convencional muestra que la mayoría de los SMD tienen alteraciones cro-

mosómicas, y las probabilidades de diagnosticarlas se han incrementado con la FISH, de modo que, un 15% de pacientes con cariotipos diagnosticados como normales, tienen alteraciones cromosómicas crípticas que las revela la FISH. Cai (Cai Y 2007) también valora la sensibilidad de la FISH como un valor añadido y útil para detectar alteraciones miniclinales que pasan desapercibidas con el cariotipo convencional.

Otros autores (Makishima H 2010) aumentan la tasa de detección de patología con la FISH a muestras de cariotipos normales hasta un 35% , y lo adjudican a la posibilidad de esa técnica de valorar también células en interfase. En concreto en la detección de del(5q), monosomía del 7, del(7q), trisomía del 8 y del (20q).

La presencia de alteraciones en la FISH de pacientes con SMD y cariotipos normales se corresponde con un peor pronóstico, y se ha visto que si bien en el momento del diagnóstico un 50% de los SMD tienen un cariotipo normal, la mayor sensibilidad de la FISH permite el diagnóstico de lesiones sub microscópicas que pasan desapercibidas en el análisis citogenético convencional, y que juegan un papel fundamental en el estadiaje pronóstico (Rigolin GM, et al 2001) .

En sentido opuesto, Pitchford (Pitchford CW 2010) considera que dentro de los SMD, los resultados de la FISH se correlacionan adecuadamente con los resultados del cariotipo, sin aumentar la sensibilidad, tal que recomienda no realizar la FISH en los SMD en con cariotipo satisfactorio.

La discrepancia entre ambas técnicas para el conjunto de todas las neoplasias mieloides en nuestra muestra incluye un 12,45% de cariotipos falsos

negativos (75/602) y un 5,48% de cariotipos falsos positivos (33/602), para las sondas especificadas en las tablas 42 y 46 respectivamente. No hay trabajos que abarquen una muestra suficientemente representativa, esto es que incluya pacientes con cariotipos patológicos y normales, y en número suficiente para sacar conclusiones con relevancia estadística para todo el grupo de neoplasias mieloides, con quienes podamos comparar nuestro estudio.

Dado que las neoplasias mieloides tienen una gran heterogeneidad, tanto desde el punto de vista clínico como para su clasificación, la estratificación del riesgo es difícil de establecer, y esto es importante para adecuar los tratamientos con los cuales, los pronósticos, sobretodo en los SMD, se modifican sustancialmente. Este dato ha promocionado que se desarrollen muchos estudios en esta entidad en particular, donde si disponemos de análisis similares al nuestro, con quienes compararnos.

165

La mayoría de las publicaciones que analizan los SMD, incluyen muestras pequeñas, y concluyen resultados discrepantes respecto a la utilidad de la FISH como estudio complementario al cariotipo (Yang W 2010).

Tabla 25: Discrepancias (CRT normal y FISH patológicos) en los SMD en nuestro trabajo.

CARIOTIPO	FISH		Total
	PATOLÓGICA	NORMAL	
<b>SMD sin especificar</b>	<b>6</b>	<b>113</b>	<b>119</b>
Normal	<b>2</b>	106	108
Patológico	4	<b>7</b>	11

CARIOTIPO	FISH		Total
	PATOLÓGICA	NORMAL	
<b>Citopenia refractaria con displasia multilineal</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Normal		3	3
Patológico	0	0	0
<b>Anemias refractarias</b>		<b>1</b>	<b>1</b>
Normal	0	1	1
Patológico	0	0	0
<b>Total discrepancias SMD (9/123)= 7,31%</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>123</b>

Nosotros registramos un porcentaje de discrepancia diagnóstica para los SMD de un 7,31% [SMD (9/123)]. Otros autores (Zou YS, Fink SR et al 2007) (Mallo M, Arenillas L et al 2008) concluyen en que la sensibilidad de ambas técnicas dentro de los SMD es similar. Ketterling (Ketterling RP, Wyatt WA et al 2002) llega a calificar de “excelente” a la técnica de cariotipo convencional, en la identificación de las alteraciones cromosómicas habituales asociadas a los SMD, y sugiere por ello que la utilidad de la FISH es limitada. Y Douet-Guilbert indica que la FISH aporta poca o ninguna mejora a la detección de las deleciones Del(5q) y Del (20q), si bien las aconseja para pacientes con cultivos celulares infructuosos o con menos de 20 metafases para analizar mediante cariotipo. Distintos estudios [(Rigolin GM, et al 2001), (Ketterling RP, Wyatt WA et al 2002), (Cherry AM, Brockman Sr et al 2003), (Bernasconi P, Cavigliano PM et al 2003) (Zou YS, Fink SR et al 2007), (Mallo M, Arenillas L et al 2008), (Romeo M, Chauffaille ML et al 2002), (Yilmaz Z, Sahin F et al 2005) (Costa D, Valera S et al 2010)] tienen

datos en común que permiten una tabla comparativa que documenta los rangos de discrepancias entre ambas técnicas diagnósticas en los SMD que varían entre 0,6% y 24% (Tabla 24).

Tabla 26: Resultados de distintos grupos de trabajo similares a tesis

Autor y año	Número de pacientes y tipo de muestra <sup>1</sup>	Líneas de corte para Dx patológico <sup>2</sup>	% de discrepancia <sup>3</sup>
(Rigolin GM, et al 2001)	101 CN	>3 - 5 %	17,8%
(Ketterling RP, Wyatt WA et al 2002)	32 CN	>4 - 11,5%	3,1%
167 (Romeo M, Chauffaille ML et al 2002)	40 CN + CP	>3,5 - 6%	23%
(Cherry AM, Brockman Sr et al 2003)	48 CN + CP	>4 - 11,5%	3,3%
(Bernasconi P, Cavigliano PM et al 2003)	57 CN	>3 - 14%	15%

---

<sup>1</sup> CN= cariotipo normal / CN+CP=cariotipo normal y cariotipo patológico

<sup>2</sup> Promedio de % núcleos patológicos necesarios para diagnosticar una muestra patológica, de entre los considerados para cada tipo de sonda.

<sup>3</sup> Muestras con cariotipos normales y FISH patológicos

Autor y año	Número de pacientes y tipo de muestra <sup>4</sup>	Líneas de corte para Dx patológico <sup>5</sup>	% de discrepancia <sup>6</sup>
(Yilmaz Z, Sahin F et al 2005)	26 CN + CP	>2,46 - 2,96%	24%
(Zou YS, Fink SR et al 2007)	145 CP	>6%	0,7%
(Mallo M, Arenillas L et al 2008)	637 CN + CP	>3 - 10%	6%
(Costa D, Valera S et al 2010)	174 CN + CP	>5-10%	0,6%
Nuestro estudio SMD	123 CN + CP	>5-10 %	7,31%
Nuestro estudio SMD	112 CN	>5-10 %	1,78%
Nuestro estudio TODAS LAS NEOPLASIAS MIELOIDES (NM)	602 CN + CP	>5-10 %	12,45%
Nuestro estudio TODAS LAS NM	494 CN	>5-10 %	15,18%

168

<sup>4</sup> CN= cariotipo normal / CN+CP=cariotipo normal y cariotipo patológico

<sup>5</sup> Promedio de % núcleos patológicos necesarios para diagnosticar una muestra patológica, de entre los considerados para cada tipo de sonda.

<sup>6</sup> Muestras con cariotipos normales y FISH patológicos

A la hora de comparar nuestros resultados entre los distintos grupos de trabajo, interesa considerar que las líneas de corte para diagnósticos patológicos no son las mismas porque no hay consenso al respecto, y no todos los estudios trabajan con los mismos proveedores de sondas y equipos ópticos. Además, las muestras de las que parten los distintos estudios, y con las que buscan concordancias o discrepancias con los resultados de FISH son distintas: solo cariotipos normales, solo cariotipos patológicos o mezcla de ambos. Con estas diferencias, es de esperar que los resultados discrepen como lo hacen. Para simplificar las comparaciones con los demás estudios hemos puesto en la tabla los datos relativos a nuestra muestra tanto si consideramos todos los cariotipos, como si consideramos sólo los cariotipos normales. De este modo se ve como este sesgo de muestreo en las comparativas, en nuestro caso, al pasar de considerar los cariotipos normales y patológicos a tener en cuenta sólo los patológicos, la muestra se reduce tan sólo 11 casos (de 123 a 112), mientras que el porcentaje de discrepancia que obtenemos, se modifica un 6,13% (de 7,31% a 1,78%).

La muestra mayor de todas las publicadas, y la única que nos supera en número de pacientes analizados es la que estudia Mallo (Mallo M, Arenillas L et al 2008), que incluye 637 pacientes con cariotipos normales y patológicos, y tiene un 6% de discrepancia entre el cariotipo y la FISH (muy próximo al 7,31% que discrepa nuestra muestra), con una línea de corte para número de núcleos patológicos necesarios para diagnosticar la muestra como tal, entre el 3 y 10%, algo más amplio que nuestro margen, que abarca del 5 a 10%.

Luego el escalón al siguiente trabajo con mayor número de muestras es bastante grande, pues incluye 174 y siguen bajando las muestras hasta las 26 que describe Yilmaz (Yilmaz Z, Sahin F et al 2005). La ausencia del análisis de la concordancia estadística, por ejemplo con el coeficiente kappa, que solo fue mencionado en el artículo de Vance (Vance GH 2007), no permite dar valor a muchos de los resultados que incluyen la mayoría de estos estudios, puesto que las muestras son muy pequeñas, haciendo difícil llegar a conclusiones clínicas informativas válidas. Por ejemplo, Bernasconi y su equipo (Bernasconi P, Cavigliano PM et al 2003), indican que los SMD tienen un cariotipo normal en un 40-60% de los casos, y que tras estudiar 57 muestras de pacientes con SMD y cariotipos normales, aparecieron 9 con FISH patológica, y en 5 de estos pacientes este resultado modificó el índice pronóstico. Es tan perjudicial para un correcto análisis estadístico el hecho de sesgar la muestra inicial (considera sólo las de cariotipos normales), como el hecho de concluir con supuesta validez un resultado que procede de sólo 9 muestras, en las que no se determinó cuantas de esas discrepancias no se deben exclusivamente al azar.

170

Otro estudio, de Beyer (Beyer V 2004), aplica de forma sistemática las sondas FISH -5/del(5)(q31), -7 y -8 a 110 muestras de LMA o con alto riesgo de SMD, encontrando discrepancias en 8 de esas 110 muestras (7,3%, igual que nuestros valores de discrepancia FISH-CRT para SMD)

Aunque ordenásemos los resultados basándonos en la representatividad de la muestra, seguimos encontrando una disparidad importante en la discrepancia de los resultados obtenidos con FISH y con cariotipo, tal que el vo-

lumen de muestra similar no se corresponde con discrepancias similares entre las dos pruebas.

Hay autores que defienden claramente el uso conjunto de ambas pruebas diagnósticas, por ejemplo en los SMD (Yilmaz Z, Sahin F et al 2005)

Y hay algunos casos en que se dispone de más datos para optar con preferencia por la FISH. Por ejemplo en las leucemias en remisión, considerando la trascendencia pronóstico-terapéutica de un diagnóstico correcto y las posibilidades técnicas de la FISH de informarnos a partir de células en interfase, se mantiene la tendencia de promover en estos casos el uso de la FISH para cuantificar las células leucémicas residuales (El Rifai W 1997). También es muy útil en los SMD y LMA secundarios a tratamientos médicos, en los que el cariotipo convencional subestima las translocaciones asociadas, donde se asocian con frecuencia deleciones y cromosomas derivativos (Shali W 2006)-

171

Como podemos ver, pese a las discrepancias, no impresiona que a corto plazo podamos prescindir del cariotipo, pues ambos métodos aportan datos importantes para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

## 1.2 CONCORDANCIAS FISH-CARIOTIPO

La concordancia entre ambos resultados es un dato fundamental a buscar para poder decidir que prueba resulta mas eficiente. Por esto, todo lo comentado en este apartado se referirá a la muestra de 602 pacientes que disponen de resultados válidos de FISH y cariotipo, tal que podemos compararlos. La tabla 26 muestra en porcentaje la concordancia entre los resultados de FISH y cariotipo para cada entidad, en negrita el valor absoluto de

la muestra de cada entidad y dentro de las llamadas los comentarios que tienen en cuenta el valor de kappa, el p valor y el número de casos de cada entidad.

Convengamos que con la diferencia de precio de ambas técnicas (177€ un cariotipo vs 319€ una sonda de FISH), en los casos en que la concordancia fuese absoluta y la muestra representativa suficiente, deberíamos decantarnos por hacer el CRT en vez del FISH.

Por el contrario, teniendo en cuenta las consecuencias derivadas de un diagnóstico erróneo en una mielopatía, no parece admisible realizar CRT como única prueba, salvo en los casos de patologías cuyos resultados de CRT y FISH tengan una concordancia muy buena (es decir un valor de kappa >0,8)

Si además de kappa analizamos el P valor, y éste es >0.05, debemos ver si tenemos suficiente muestra o realmente no existe concordancia. En el caso de que el Kappa sea significativo ( $P < 0.05$ ), existe concordancia estadística pero si son muy pocos casos (menos de 20) clínicamente el resultado es cuestionable. En el caso de que el Kappa sea no significativo ( $P \geq 0.05$ ), hay que valorar si nuestro tamaño muestral es suficiente con lo que podemos concluir que realmente no existe concordancia o si lo que sucede es que disponemos de poca muestra como para detectar la concordancia.

Tabla 27: Concordancia de resultados normales y patológicos de las 602 muestras con cariotipo y FISH realizados

Concordancias de resultados de muestras con CARIOTIPO Y FISH realizado	Resultado FISH	
	NORMAL	PATOLOGICO
<b>RESULTADO CARIOTIPO</b>		
<b>NMP S/E (n=11)</b>	<b>9</b>	<b>2</b>
Normal	100%	0%
Patológico	0%	100%
<b>LMC (n=58)</b>		<b>58</b>
Normal	0%	(19)100%
Patológico	0%	(39)100%
<b>MF (n=1)</b>	<b>1</b>	
Normal	100%	0%
<b>PV (n=3)</b>	<b>3</b>	
Normal	100%	0%
<b>TE (n=23)</b>	<b>22</b>	<b>1</b>
Normal	100%	0%
Patológico	67(2)%	33(1)%
<b>NMD-NMP S/E (n=13)</b>	<b>2</b>	<b>11</b>
Normal	10%	90%
Patológico	33%	67%
<b>LMC a (n=116)</b>	<b>116</b>	
Normal	100%	0%
Patológico	(6)100%	0%
<b>LMMC (n=2)</b>	<b>2</b>	
Normal	100%	0%
<b>SMD S/E (n=150 y buena concordancia k=0,635)</b>	<b>139</b>	<b>11</b>
Normal	(132)99%	(2) 1%

Hagamos **solo FISH**. Considerar que hay sesgo de muestra

Hay concordancia buena ( $k=0,465$ ), tomamos dato con prudencia por muestra reducida, podríamos elegir una u otra prueba diagnóstica.

Hay sesgo de muestra, hace falta ampliarla para sacar conclusiones validas, pero por la trascendencia de la clasificación correcta, eliminamos FISH

Concordancias de resultados de muestras con CARIOTIPO Y FISH realizado		Resultado FISH	
		NORMAL	PATOLOGICO
<b>RESULTADO CARIOTIPO</b>			
Patológico		(7) 44%	(9) 56%
<b>CRDM (n=8)</b>		6	2
Normal		100%	0%
Patológico		0%	100%
<b>AR (n=1)</b>		1	
Patológico		100%	0%
<b>LMA y NPR S/E (n=161) insignificante concordancia k=0,042</b>		125	36
Normal		(112) 78%	(31) 22%
Patológico		(13) 72%	(5) 28%
<b>LMA con t (8,21) (n=1)</b>			1
Normal		0%	100%
<b>LMA con inv 16 (n=2)</b>		2	
Normal		100%	0%
Patológico		0%	0%
<b>LPMA con t (15,17) (n=40) y baja concordancia K=0,228</b>		20	20
Normal		(17) 59%	(13) 41%
Patológico		(3) 27%	(8) 73%
<b>LMA FM con t (9,22) (n=12)</b>		4	8
Normal		80%	20%
Patológico		0%	100%

La concordancia es buena y la muestra significativa. Justificada FISH según situación clínica (evolutivos...) y factores de riesgo.

La discrepancia entre FISH y cariotipo es tal que procedería hacer **FISH**

La discrepancia entre FISH y cariotipo es tal que procedería hacer **FISH siempre**

En el **conjunto de todas las neoplasias mieloides** se observó un acuerdo significativo ( $\kappa = 0,4711$ ;  $p = 0,001$ ), moderado (Landis 1977), entre los resultados de la FISH y del CARIOTIPO. En este resultado global dispo-

nemos de suficiente tamaño muestral y el kappa es significativo, existiendo concordancia.

Si desagregamos por entidades resulta que:

En las **NMP S/E** la concordancia entre el CRT y la FISH es absoluta ( $k=1$ ), por lo que en principio podría ser indistinto realizar una u otra prueba diagnóstica, y quizá podríamos sugerir realizar sólo el cariotipo, pero disponemos sólo de 11 muestras, dentro de las que un 18% de los casos estudiados tiene una alteración genética, tal que hace falta ampliar la muestra para afirmar esta conclusión.

175

Considerando que la incidencia del conjunto de las NMP en la población mundial asciende a como mucho 0,001 enfermos cada 10 habitantes (Johansson 2004), del análisis de nuestros resultados vemos que pese a la incertidumbre clínica que generan los pacientes de este grupo, es obvio que en nuestra muestra hay criterios clínicos adecuados orientando la búsqueda diagnóstica, puesto que multiplican la incidencia de patología mieloide hallada unas 2000 veces respecto a la incidencia definida para población mundial.

**LMC bcr abl+:** En este grupo la FISH encuentra a todos los pacientes patológicos mientras el cariotipo discrimina 19 normales y 39 patológicos. Si consideramos como gold standard el FISH significaría que todos los pacientes son realmente patológicos y la citología no pudo diagnosticar bien al 32,7% de los pacientes. Para tomar una decisión con esta prueba deberíamos tener la muestra mejor distribuida teniendo todo tipo de pacientes (normales y patológicos). Pero puesto que la inclusión de estos pacientes

en esta subentidad fue realizada a posteriori, siguiendo los criterios de la clasificación vigente, existe un sesgo importante en la muestra. Con estos pacientes no existe concordancia, el kappa es cero, su error estándar es cero y el P-valor 1. Pero esto no tiene sentido, no podemos sacar conclusiones acerca de la concordancia de estas dos pruebas cuando la FISH que diagnosticó a todos los pacientes como patológicos, fue la que sirvió para incluir a los pacientes en este subgrupo.

En la **TE** la concordancia de los resultados diagnósticos valorados es moderada (Landis 1977)( $k=0,465$ ), el p valor = $0,0083$ , y la muestra abarca 23 casos. Existe concordancia y hay que tomar el dato con prudencia pero es significativo, tal que en principio parece indiferente optar por FISH o cariotipo para su diagnóstico. Jensen (Jensen 2000) refiere que la existencia de BCR-ABL1 excluye el diagnóstico de TE, y la presencia de la mutación JAK2 V617F -que existe en un 40-50% de los casos- aún siendo inespecífica, descarta la trombocitosis reactiva. Puesto que ésta última determinación diagnóstica no la hacemos hasta el momento en nuestro departamento, pero si se realiza en el Hospital Universitario, disponer de este resultado, y/o unificar las bases de datos de ambos equipos de trabajo, resultaría de utilidad en el manejo y correcto diagnóstico de estos pacientes, sin entrar a valorar lo que pueda o no aportar puesto que en esta entidad no es específica como dijimos antes.

El resultado de los cariotipos patológicos hallados (4%) es algo menor que el descrito (5-10%) en los pacientes con TE (cuyas alteraciones pueden ser 9q, +8, y la del (20q)).

**NMD NMP S/E:** La concordancia es negativa en los 13 casos que tuvimos. Que el kappa sea negativo significa que lo que una prueba ve como patológico la otra lo ve como normal. En concreto 11 muestras con cariotipo normal tenían FISH patológica. En este caso aunque sea el kappa negativo como el P valor es  $>0.05$ , no hay concordancia de ningún tipo, sería como decir que la  $K=0$ . Esta discrepancia nos orienta en la conveniencia de realizar FISH como primera opción, aunque aquí también la muestra es escasa para generalizaciones.

Esto podría implicar que en esta entidad inespecífica, la FISH juega un papel más importante que en las entidades claramente diferenciadas, siendo probablemente más útil para descartar otros diagnósticos que para confirmar este, sobretodo teniendo en cuenta que la clasificación actual (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008), indica la inexistencia de mutaciones específicas en las NMD NMP S/E. Muchos de estos casos que Szpurka ha estudiado presentan la mutación JAK2 V617 (Szpurka 2006), pero esta determinación no se hace actualmente en nuestro Servicio.

**LMC a:** En este caso pasa lo mismo que en las LMC, el kappa es 0, su desviación típica es 0 y el  $P=1$ , porque no hay ningún paciente con hallazgo de FISH patológica. También aquí la inclusión de estos pacientes en este grupo fue realizada a posteriori, siguiendo los criterios de la clasificación vigente, tal que existe un sesgo importante en la muestra. Para tomar una decisión con esta prueba deberíamos tener la muestra mejor distribuida teniendo todo tipo de pacientes (normales y patológicos). No se sabe la inci-

dencia exacta de la LMCa, pero se considera que existen 1-2 casos por cada 100 casos de LMC BCR-ABL1 positivas (Shepherd 1987). Nuestra muestra tiene 58 LMC y 116 LMCa. La única explicación válida para justificar resultados tan distantes de los teóricos, es que considerando que la sospecha diagnóstica de todas las LMC (típicas y atípicas) incluye pacientes con éstas, con otras patologías y pacientes sanos. Es posible que dentro de las 116 LMC consideradas "atípicas" por no poseer el gen de fusión BCR-ABL1 este subgrupo incluya erróneamente pacientes que o bien son sanos o bien tienen otras patologías.

En los **SMD S/E** el kappa es significativo ( $k=0,635$ ), existiendo concordancia "buena" (Landis 1977). El p valor es  $<0.0001$  y la muestra es suficiente ( $n=150$ ) para hacer generalizaciones. Existe una concordancia estadística "buena" entre ambas pruebas, y sólo un 1% de los cariotipos normales tenían una FISH patológica. Es llamativo que en nuestra muestra un 44% de cariotipos patológicos tienen una FISH normal. La revisión epidemiológica de los SMD (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008) indica que en los SMD se detectan anomalías clonales en aproximadamente el 50% de los casos. En nuestra muestra, que incluía 159 casos (150 con sospecha clínica de SMD S/E, 8 CRDM y 1 AR), estas alteraciones se encuentran en solo el 8,18% de los casos, 6 veces menor incidencia que la esperada. ¿Deberíamos estandarizar criterios para la indicación de solicitar estudios citogenéticos para sospechas clínicas de esta entidad?

**LMA y NPR S/E:** La concordancia de estas 161 muestras tiene un valor de kappa de 0,042, que está en el rango de concordancia "insignificante" (Landis 1977), y un p valor  $P=0$ . El error estándar es  $EE=0.0774$ . Considerando esta discrepancia, que el 72% de cariotipos normales tuvo una FISH patológica, resulta conveniente valorar la FISH como primera opción diagnóstica. Este grupo, igual que en otros "sin especificar" son especialmente tributarios de FISH por el déficit de información clínica suficiente que permita una correcta clasificación. Se puede diagnosticar LMA con valores por debajo de este umbral, si concurre alguna de las siguientes alteraciones cromosómicas:  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $inv(16)(p13.1q22)$ ,  $t(16;16)(p13.1;q22)$  o  $t(15;17)(q22;q12)$ . La vigente clasificación de la WHO (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008) es posterior a la incorporación de los algoritmos diagnósticos que consideran las alteraciones genéticas, por eso, incorpora muchas novedades respecto a las clasificaciones previas, y faltan datos epidemiológicos para poder comparar nuestros resultados con los publicados hasta el momento.

179

Las 40 muestras con sospecha de **LPMA con t (15,17)** tuvieron una "baja" concordancia diagnóstica entre ambas pruebas con un valor de  $K=0,228$ , un  $P=0.095$  y  $EE=0.1326$ . La discrepancia existente, y un 41% de cariotipos normales con una FISH patológica orientan claramente hacia la conveniencia de realizar la FISH como primer prueba diagnóstica. Según Dash, Unos pocos casos raros considerados "crípticos" no tienen la clásica  $t(15;17)(q22;q12)$ , pero sí poseen translocaciones complejas que involucran al cromosoma 15 y 17, con cromosomas extra o inserciones de PML-

RARA, que permiten que esta se transcriba. Nuestra muestra encontró 18 FISH patológicos para PML rara, que tuvieron CRT normal, de entre 38 muestras a las que se estudiaron estas cromosomas. Esto representa un 47,36% de falsos negativos. Y un 40% de los pacientes tiene otras alteraciones genéticas, siendo la más frecuente +8, en 10 a 15% de los casos (Dash 2001). Sólo se estudió el cromosoma 8 en una muestra que resultó normal tanto con cariotipo como con FISH.

Las 12 muestras de **LMA FM con t (9,22)** presentan una concordancia diagnóstica muy buena entre los resultados de FISH y de cariotipo, pero son escasas las 12 muestras para permitirnos afirmaciones generalizadoras. El 58% de las muestras tuvo hallazgos patológicos, siendo este un requisito para incluir el paciente en este diagnóstico. Es sabido que además de la t(9,22), muchos casos tienen cariotipos complejos (Carbonell F 1996). No haber encontrado ninguna alteración genética en el restante 42% implica la necesidad de encontrar otro diagnóstico para esos pacientes. Es una leucemia infrecuente, que representa aproximadamente un 1% de las LMA (Killick S 1999). Dentro de las 12 muestras que solicitaron diagnóstico con esta sospecha clínica, sólo 2 confirmaron la translocación. Estas dos muestras representan un 0,93% de las 216 LMA totales, por lo que la incidencia en nuestro estudio se aproxima bastante a la epidemiológica de la entidad.

El índice de concordancia de las **CRDM** es absoluto ( $K=1$ ), lo que significaría que es indiferente realizar CRT o FISH, pero disponiendo de sólo 8 casos no podemos analizar ni hacer generalizaciones.

Los resultados del resto de entidades (**LMMC, LMA con inv(16), MF, PV, AR, LMA con t (8,21)**) también tienen un resultado de kappa inválido,

pero debido a muestra insuficiente, que no aporta datos informativos clínicamente, por lo que no podemos tomar decisiones con tan poca muestra, sólo podemos interpretar los datos desde la estadística descriptiva.

Destaca que ante resultados de cariotipos normales (79) en el total de la muestra con ambas pruebas diagnósticas (602) , incluyendo todas las entidades mieloides, a la mayoría (69) no se les realiza FISH, pese a que de entre las 10 muestras a las que si se les realizó, el 90% fueron patológicas, teniendo un cariotipo normal.

## 2.-CRITERIO DE SELECCIÓN DE SONDAS

### DIFERENCIAS ENTRE LOS RESULTADOS DE NUESTRAS SONDAS Y LAS DE OTROS ESTUDIOS

181 Si comparamos los resultados de las sondas aplicadas en nuestro estudio respecto a los referidos en la bibliografía actual tenemos que:

En las **NMP S/E** sólo obtuvimos 2 muestras patológicas (de las 11 estudiadas) con BCR-ABL positivo, e impresiona que la sonda BCR-ABL podría servir como screening eficiente cuando no hay datos clínicos que permitan clasificar en la entidad mieloproliferativa específica.

En las **LMC** La alteración BCR-ABL 1 se encuentra en todas las células mieloides (Carrasco Juan JL, Hernández García MT, Otero A, Vilar MC, Marsá L, González Brito G, García Miranda JL, Hernández Nieto L 1992) (Cotta 2007). En el 95% de los casos está presente el cromosoma Philadelphia (Cigudosa JC, Acosta Almeida MT, Carrasco V, Bello T, Carrasco JL, Otero Gómez A, García Talavera J, García Miranda JL. 1995) En el 5% de los ca-

sos se cuentan otras translocaciones adicionales que afectan a un tercer o cuarto cromosoma. Se han descrito también dos translocaciones crípticas t(9q34) y t(22q11.2) Pueden aparecer anomalías citogenéticas adicionales meses antes del desarrollo de la fase blástica (FB) y las más frecuentes son +8, +Ph, i(17q), +19, -Y, +21 y -7 (Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, García Miranda JL, Trujillo González M, Herrera Fernández M, Bello Hernández T 1992), con diferente frecuencia dependiendo del linaje de la transformación blástica. En nuestra muestra, de las 58 muestras estudiadas, encontramos 57 patológicas debida al gen BCR ABL positivo, y 1 que era positiva para LSI BCR (22q 11.2). Recordamos que el sesgo en la muestra de esta entidad, es lo que explica que no aparezca ningún paciente sin hallazgos patológicos.

En las **trombocitemias esenciales**, considerando que no posee marcadores citogenéticos o moleculares específicos, y que su diagnóstico es por exclusión respecto al resto de las NMP, que la existencia de BCR-ABL1 excluye su diagnóstico, y la presencia de la mutación JAK2 V617F -que existe en un 40-50% de los casos y no es específica- descarta la trombocitosis reactiva (Jensen 2000), no podemos menos que proponer se incluya esta determinación en el protocolo actual. En las 23 muestras de TE que estudiamos, sólo encontramos 1 FISH con BCR ABL positivo, y quizás conocer si había mutación de JAK2 V617F hubiera ayudado a descartar trombocitosis reactivas.

De las 13 solicitudes diagnósticas a pacientes con sospecha clínica de **NMD-NMP S/E** obtuvimos 11 resultados patológicos, 10 para BCL ABR /LSI BCR y uno para Rb 1 (13q14). La particularidad de las NMD-NMP es

que incluye neoplasias clonales caracterizadas por hiper celularidad en la MO a cargo de la proliferación de una o más líneas celulares mieloides, a la vez que se manifiesta citopenia de una o más líneas celulares por proliferación ineficaz, lo que la hace especialmente candidata a la FISH, sobre todo si dentro del grupo de las NMD-NMP no se dispone de información clínica suficiente que permita una especificación de que subgrupo diagnóstico se sospecha. De hecho, posiblemente por falta de células suficientes, la incidencia de cariotipos falsos negativos es bastante alta, en nuestro caso 9 cariotipos falsos negativos de 13 pruebas realizadas. Por otro lado mayoría de los casos de Anemias refractaria con sideroblastos anillos y trombocitosis presentan la mutación JAK2 V617 (Szpurka 2006), lo cual es otro motivo que justificaría implantar esta determinación en el protocolo actual de estas patologías, al igual que de las LMCa y las LMMC.

183

Las **LMC a**, pese al sesgo de muestra ya explicado, sabemos que el 80% de los pacientes con LMCa presenta anomalías genéticas, de entre las cuales las más frecuentes son: +8, del(20 q), y también se han informado anormalidades en los cromosomas 12,13, 14, 17 y 19 (Brescia 2006). La mayoría de los pacientes a los que se les diagnostica un isocromosoma 17q, pese a que reúnan los criterios diagnósticos para LMMC, presentan una LMCa (McClure 2005). La hipocelularidad de esta entidad, la clasificación en este grupo por descarte (que no presenten el gen de fusión BCR-ABL1) y que un 30% de los casos (Vardiman 2006) presente la mutación de JAK 2 V617F, hacen candidata a esta entidad a incluir en su protocolo la determinación de ésta mutación. No se sabe la incidencia exacta, pero se considera que existen 1-2 LMCa / 100 LMC BCR-ABL1 positivas (Shepherd 1987) y con nuestros resultados, tras aplicar a 108 muestras la sonda

BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) y al resto combinaciones que incluían además de esa sonda del p53 (17p13), reordenamiento IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21) y EGR1( 5q31) 5q33-34, la existencia de la relación entre ambas fue 116 LMCa / 58 LMC BCR-ABL1. En anexo final de tablas se puede ver el detalle de cada sonda aplicada a cada muestra. Y visto los resultados parece procedente ante esta sospecha aplicar exclusivamente la sonda BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) y ponderar la inclusión de determinar la existencia de JAK 2 V617F.

Dentro de los 159 **SMD** (que incluían 150 S/E, 8 CRDM y 1 AR) encontramos tan sólo una incidencia de 4 casos ( 2,521%) de patología diagnosticada por las sondas del(7q) y EGR, mas del doble del 1% descrito por Brunning (Brunning RD 1994) como frecuencia habitual de estas alteraciones genéticas en los SMD. Por otro lado, los hallazgos de patología en BCR-ABL, ad 5, 8p11 y 5 33-34 hallados en nuestra muestra no se mencionan en la última revisión de esta patología (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008) que si incluye otras alteraciones genéticas que nosotros no estudiamos y que mostramos en la tabla 4.

Las **LMA y NPR** son un grupo de patologías interesantes en particular, puesto que desde 2008 se definen sus entidades con criterios genéticos (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008). Esta particularidad es responsable en parte de que la mayoría de nuestros casos figuren bajo la sospecha de LMA y NPR SIN ES-

PECIFICAR. De la muestra inicial de 1684 casos, de este grupo había 377 sin especificar de las 512 del grupo. De las 602 muestras con ambas pruebas diagnosticas fueron 161 sin especificar y 44 con especificación del grupo.

Si analizamos las entidades que pudieron clasificarse en los subgrupos de esta patología, vemos lo siguiente:

En el grupo de las **LMA con FM**, analizamos 12 muestras de la única entidad estudiada de este grupo: La **LMA con FM con t (9,22)**, de entre cuyas muestras el 58% tuvo una FISH patológica.

En el conjunto de **todas las neoplasias mieloides**, las posibilidades de sondas a utilizar son muchas, como se puede ver en la tabla 37 del anexo final, pero resulta inevitable proponer un consenso respecto a la rentabilidad económica y práctica de estandarizar las sondas a utilizar en cada entidad, además de unificar los puntos de corte en el número de núcleos patológicos para definir una muestra como tal.

185

Como vimos entre las 602 muestras con resultados válidos de FISH y cariotipo, dentro de los 75 cariotipos informados como normales, con una FISH patológica, las mayores discrepancias surgen tras utilizar las sondas BCR/ABL y PML RARA, como se muestra a continuación. Entre paréntesis, para tener una referencia porcentual, se refiere el número total de muestras de cada entidad. En rojo se destacan las sondas que fueron mas informativas.

Tabla 28: Detalle de las sondas de FISH que dieron positivas en las 75 muestras que tenían cariotipo normal y FISH patológico.

Sondas utilizadas en muestras de cariotipos normales (n total)	FISH patológicos
<b>LMC (n=58)</b>	<b>19</b>
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	19
<b>NMD-NMP S/E (n=13)</b>	<b>9</b>
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+LSI BCR (22q11.2)	9
<b>SMD S/E (n=150)</b>	<b>2</b>
5q33-34	1
Del. EGR1( 5q31)	1
<b>LMA y NPR (n=161)</b>	<b>31</b>
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	2
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	3
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1
Gen MLL (11q23)	2
Gen MLL (11q23)+AML1-ETO/t(8;21)(q22;q22)	1
inv(16)	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	20
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	1
<b>LPMA con t (15,17) (n=41)</b>	<b>13</b>
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	11
t(1;3)(p36;q21)	1
<b>LMA FM con t (9,22) (n=12)</b>	<b>1</b>
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	1
Total de cariotipos "Falsos negativos"	<b>75</b>

De la vista de estos datos surge la necesidad de protocolizar las sondas a utilizar en cada patología y/o situación clínica. Como se ve en las tablas del

anexo, hay muchas combinaciones posibles de hasta 11 sondas distintas repetidas en muy pocas muestras, y ninguna de estas opciones aportó datos con significación estadística. Las sondas escritas en rojo son las que sin duda deberían continuar aplicándose, a la vez que, como veremos en el siguiente punto sobre valoración del protocolo, para cada entidad y situación clínica (diagnóstico inicial, remisión ,recidivas..) habría que acotar las opciones de sondas a utilizar, basándonos en la evidencia clínica disponible para cada caso en particular, restringiendo las opciones "posibles" en el formulario de petición de estudio diagnóstico.

### ¿CUANTO DEBERÍAMOS ACOTAR LAS SONDAS A UTILIZAR?

187 ¿Deberíamos plantearnos la indicación protocolizada de realizar FISH en pacientes cuyas muestras presentan insuficientes mitosis para realizar cariotipo, y en pacientes con diagnósticos clínicos inespecíficos?. Puesto que la determinación de alteraciones clínicas puede ser relevante para una correcta categorización del índice pronóstico, y un tratamiento más eficaz, parecería que sí. En el anexo final, la tabla 46 muestra las sondas utilizadas en las 33 (n=602) muestras cuyo cariotipo era patológico y su FISH normal. Tras intentar analizar si fueron estudiadas con las sondas adecuadas o no, resulta imposible llegar a conclusiones representativas, porque hay una gran desagregación y variabilidad, siendo casi 33 opciones distintas, esto es grupos con 1 muestra por cada entidad. Si separamos los datos valorados para cada sonda tenemos los siguientes:

Del (5)

Algunos estudios (Zou YS, Fink SR et al 2007) señalan la alteración del (5) implica una proliferación celular menor a la normal, motivo que justificaba que esta patología se diagnosticase más utilizando la FISH que el cariotipo convencional. También se ha documentado que muchas deleciones en 5q, apreciables como similares mediante cariotipo tienen una gran variabilidad según lo manifiestan sus resultados de FISH (Royer-Pokora B 2006)

Otros autores (Mallo M, Arenillas L et al 2008) indican que la alteración del (5) (q31) discrepaba entre los resultados obtenidos mediante FISH o cariotipo, por el hecho de que se habían estudiado menos células en este estudio respecto a aquel. En nuestro estudio las discrepancias para las anomalías antes mencionadas fueron las mencionadas en la tabla 47 incorporada al anexo de tablas, donde se describen las sondas utilizadas en muestras con cariotipos patológicos y FISH normales.

El equipo de Mallo (Mallo M, Arenillas L et al 2008) ha determinado que un 20% de pacientes con SMD y -5q, fueron diagnosticados exclusivamente por FISH, tras un cariotipo no valorable por insuficientes mitosis para realizar ésta prueba.

En pacientes con del 5q y los SMD con esta alteración, el IPSS (Sistema Internacional de graduación pronóstica) (Malcovati 2005) orienta en la progresión y permite un pronóstico individualizado e incluye clínica, factores citogenéticos e inmunofenotípicos, tal que el resultado del cariotipo es decisivo para el tratamiento con terapias dirigidas (Haase D, et al 2008)

Un aspecto no desarrollado en la clasificación de la WHO (Tefferi, Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008

World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. 2008) es el factor racial como modulador de las diferencias del impacto de los hallazgos genéticos patológicos en la estratificación del riesgo convenida. El IPSS tampoco incluye diferencias de pronóstico en función de la etnia del paciente. Según publicaciones recientes, por ejemplo, los estudios realizados por Lee (Lee HR 2010) indican que las características biológicas de los SMD en Korea se relacionan con pronósticos distintos que los conocidos para los pacientes caucásicos, tal que en pacientes coreanos los SMD se presentan a menor edad, con menor frecuencia de 5q-, mayor porcentaje de alteraciones genéticas complejas como por ejemplo del(5q) y peores pronósticos. También Cai (Cai Y 2007) expone que existen diferencias entre los cariotipos patológicos de pacientes con SMD en China y en los países occidentales.

189

Estudios realizados en la Clínica Mayo (Zou YS 2007) consideran que la FISH es útil para detectar la delección de 5q, pero no sustituye el cariotipo.

En nuestro estudio, la FISH de la sonda **5q** no obtuvo información discrepante respecto a los hallazgos del cariotipo. Sólo resultaron 2 FISH patológicas de 2 muestras con cariotipos normales, de entre los 123 SMD estudiados.

### Cromosomas 7 y 8

Se ha demostrado (Rigolin GM, et al 2001) y (Bernasconi P, Cavigliano PM et al 2003) que las alteraciones cromosómicas **-7 y +8** están involucradas en cultivos con menos metafases, tal que sería apropiado utilizar FISH para diagnosticar estas patologías cromosómicas las tales entidades con esa

casuística (LMA NPR y LMA con FM) En nuestra muestra hubo 3 cariotipos falsos negativos para muestras con esta alteración genética hallada mediante FISH, en 3 en LMA y NPR S/E y en 1 LPMA con t (15,17).

Gen BCR-ABL

Puesto que la FISH puede detectar la reorganización de este gen y su localización, su utilización es fundamental, además de permitir un seguimiento cuantitativo en la evolución de estos pacientes (Costa D 2003). Tuvimos 32 falsos negativos para esta alteración genética entre nuestros cariotipos: 4 en LMA y NPR S/E, 19 en LMC y 9 NMD NMP S/E.

PML/RARA t(15,17)(q22;q21)

Nuestra muestra tiene 32 falsos negativos entre los cariotipos, 11 pertenecen a las LPMA con (15,17), 20 a las LMA y NPR S/E y 1 LMA con FM con t(9;22) .

190

### 3.-VALORACIÓN DEL PROTOCOLO UTILIZADO

Los criterios genéticos consensuados por la OMS en Diciembre de 2008 para el diagnóstico de oncohematología, llegaron 10 años mas tarde de haber comenzado los estudios de diagnóstico genético en nuestro Departamento.

Desde la nueva clasificación de la OMS, no ha habido tiempo material suficiente para estudios estadísticos prospectivos de comportamiento de estas entidades, tal y como están definidas y divididas actualmente, pero sí para otros retrospectivos como el nuestro. Creemos que nuestra muestra es

numerosa y específica suficiente, y la dejamos disponible para formar parte de estudios posteriores. A continuación comparamos las sondas solicitadas en nuestro servicio con las sondas que la OMS considera útiles o necesarias para una correcta clasificación, pronóstico y/o tratamiento. Como se observa en ella, la concordancia es muy alta y en todo caso hay determinaciones que hacíamos de las que podríamos prescindir, pero no falta ninguna de las consideradas convenientes.

Tabla 29: Comparación de Sondas utilizadas por nuestro servicio y las consideradas por OMS en la última clasificación de entidades oncológicas mieloides.

<b>Sondas que aplicá- bamos en las distintas entidades</b>	<b><u>Nuevas entidades</u> según OMS</b>	<b><u>Sondas</u> referidas en consenso OMS</b>
Leucemia Mieloide Crónica: (9;22) (BCR- ABL)	Leucemia Mieloide Crónica (9;22) (BCR- ABL)+	t(9;22) (BCR-ABL)+
JAK2 V617F se determina en laboratorio central del Hospital Universitario de Canarias	Leucemia Mieloide Crónica atípica (9;22) (BCR-ABL)-	t(9;22) (BCR-ABL)- Además: 80% con +8, del (20q), alt cr. 12 13 14 17 o 19+ alt. JAK2 V617F
Leucemia Mieloide Agu- da : 11q23 (gen MLL), t(8;21), t(15;17) PML- RARA, inv(16), t(9;22) (BCR-ABL) , 7q31, 5q33-34, 8p11.1- q11.1,20q12	LMA y de precursores relacionados	Se diagnostica si reúne criterios de blastos + alguna de las siguientes : t(8;21), t(15;17) PML-RARA, inv(16), t(16;16)

<p>No estaban clasificadas como ahora y admitíamos hasta la solicitud de 11 distintas sondas por muestra.</p>	<p>Subtipos de entidad anterior: LMA con alteraciones genéticas recurrentes: 1-LMA con inv (16) 2-LPMA con t(15;17)</p>	<p>1.-LMA con inv (16) ó t(16;16) [ esta última menos frecuente, e igual que inv(16) provoca fusión del 16q22] y 40% con +22,+8,del(7q) ó +21 2.- t(15;17) y 12% con +8</p>
	<p>Subtipo de LMA de linaje ambiguo 1.-LMA FM con t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL1</p>	<p>1.-LMA FM con t(9;22) (q34;q11.2); BCR-ABL1</p>
<p>Síndromes Mielodisplásicos 5q33.34, 7q31, 8p11.1-q11.1, 20q12</p>	<p>SMD (donde hasta ahora más importante son los estudios genéticos)</p>	<p>Las alteraciones más frecuentes y usadas para determinar el riesgo según IPSS son 5q33.34 (10%), 7q31 (10%), 8p11.1-q11.1 (10%),y 20q12 (5a8%).También considera -Y aislada.</p>

Del análisis de la tabla se desprende que:

- 1.-Sería útil y conveniente disponer del resultado de la JAK2 V617F para estudiar las leucemias mieloides crónicas atípicas y las trombocitemias esenciales. Este estudio se realiza en el laboratorio del Hospital Universitario de Canarias, por lo que habría que convenir unificar determinaciones o compartir resultados.
- 2.- En las LMA y de PR es suficiente con determinar t(8;21), t(15;17) PML-RARA, inv(16) y, t(16;16).Las demás podrían obviarse.

3.-El grupo de las LMA con alteraciones genéticas recurrentes requiere la determinación de inv (16), t(15;17) y t(9;22)

4.-Las sondas a aplicar en los SMD deberían ser las mismas que hemos propuesto y aplicamos desde 1999.

193 Interesa convenir un protocolo standard para el diagnóstico genético de las neoplasias mieloides, teniendo en cuenta esta clasificación actual de las distintas entidades mieloides y para esto debemos empezar por consensuar de modo eficaz los criterios y prioridades en la recepción de las muestras. En concreto, tras analizar las causas del elevado número de resultados de cariotipo "no validos", nos encontramos que las muestras de los viernes o entregadas a últimas horas se procesan en condiciones sub óptimas, los medios de transporte no siempre son los adecuados y esto también perjudica la calidad de la muestra aumentando la posibilidad de resultados inválidos; la "primera" gota de las punciones medulares son ávidamente demandadas por hematólogos y por el laboratorio, sumado al dato de que incluso físicamente nos encontramos más alejados de la muestra original, nos llega "lo que nos han dejado" para procesar. Si valorásemos esto objetivamente, hay algunos diagnósticos para los que nuestro resultado será más determinante que para otros usos, además que el gasto generado posiblemente sea superior, y quizás sin resultado útil.

Tras haber analizado las solicitudes diagnósticas para aplicar a cada muestra, y los resultados obtenidos en las distintas técnicas, podemos inferir respecto al protocolo diagnóstico lo que sigue. Parece conveniente utilizar un formulario cerrado con opciones de solicitudes de técnicas diagnósticas ajustado, para permitir solicitar solo lo específico de cada entidad (considere-

radas según la nueva clasificación de la OMS). Porque, si bien es más cómodo permitir que se pida todo “por las dudas”, los precios de las técnicas hacen insostenible a largo plazo la eficiencia del protocolo. Aunque ya se ha avanzado en este sentido, quizás interesa limitar aún más las alternativas entre las que elegir para cada diagnóstico estándar, incluso para facilitar futuros estudios epidemiológicos. De los resultados se desprende que hay diagnósticos para los que el screening debería ser directamente la FISH, por lo que, tras valorar riesgo-beneficio de la decisión, podría descartarse la sistemática solicitud de cariotipo previo.

Hay pruebas como la JAK2 V617F (mutación de las NMP, que es la que ha dado lugar a la reclasificación completa de los trastornos mieloproliferativos, que se encuentra en Policitemia vera, Trombocitemia esencial, Mielofibrosis primaria y leucemia neutrofílica crónica), cuyas muestras recoge y procesa el laboratorio central del Hospital Universitario. Creemos que sería más eficaz unificar la recogida y procesamiento de las muestras para la FISH, para amortizar gastos fijos de la técnica; y además, para que todos los datos respecto a aspectos genéticos de los pacientes con patología hematológica oncológica (incluso para estudios posteriores) este centralizado. Actualmente nuestro Servicio no tiene acceso a otros datos de la historia clínica distintos a los resultados generados por la aplicación de las técnicas que aquí se realizan. Todo esto requiere el consenso de los servicios médicos y la gerencia hospitalaria.

Ahora que la base de datos está informatizada, parece más fácil y conveniente que se proponga una mayor rigurosidad en el registro de las solicitudes, aumentando los datos epidemiológicos (sexo, edad, teléfono...) de

modo que se optimice la calidad de estudios posteriores. A la vez que impresiona procedente el que se unifique la base de datos del Departamento con la del SAP del Hospital.

Teniendo en cuenta que la medición de la calidad de vida relacionada con la salud es cada vez mas relevante como una manera de analizar la eficacia y efectividad de las intervenciones sanitarias ; y que el cuestionario Euro Quol (EQ-5D) es la única herramienta aceptada y validada para argumentar la asignación de recursos sanitarios en España (Badia X et al 1999), proponemos se incluya en la solicitud de prueba diagnóstica, un cuestionario Euro Quol, donde los pacientes describan su auto percepción de las cinco dimensiones de salud (movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión).

195 Sería interesante reflejar el índice pronóstico conocido al momento del test, para que a posteriori, se pudiese estudiar el impacto que pudiera significar la aportación de la FISH, al modificar los índices pronósticos de distintos pacientes, por resultados discrepantes respecto al cariotipo.

Sería conveniente registrar en la solicitud de la muestra, si se trata de un estudio de cuantificación de leucemia residual, puesto que la FISH en interfase es una herramienta especialmente útil para la cuantificación y valoración pronostica de estos pacientes. Podríamos convenir que pacientes con cultivos celulares infructuosos o con menos de 20 metafases para analizar mediante cariotipo, sobretodo con altas sospechas clínicas, son candidatos a una FISH, como también lo son las muestras para estudiar enfermedad mínima residual.

Interesa estandarizar internacionalmente los puntos de cortes para cada sonda para considerar un diagnóstico como patológico, y 5 a 10% de núcleos patológicos es el margen estándar al que se tiende en las últimas publicaciones (Tabla 25) .

Considerando la mayor proporción de cariotipos falsos negativos para las traslocaciones asociadas a pacientes con SMD y LMA secundarios a tratamientos médicos, y consecuentemente la conveniencia de supra valorar la aportación de la FISH en estos casos, es importante registrar en las peticiones el hecho de haber recibido tratamiento de este tipo.

En Canarias y otras ciudades con porcentajes altos de inmigración internacional, podría suceder que aspectos étnicos, no estudiados suficientemente, modifiquen los resultados hallados en las discrepancias entre cariotipo convencional y FISH (debido a alteraciones crípticas a técnicas convencionales)

196

Consideraciones costo-beneficio:

Si bien, la diferencia de los costos diagnósticos entre el cariotipo (177€) y la FISH (319€) son importantes, hay que valorar la justificación de realizar una prueba con un porcentaje alto de falsos negativos en determinadas entidades, y el ahorro terapéutico derivado de un diagnóstico y tratamiento precoz.

Interesa incluir en la solicitud de prueba diagnóstica, un cuestionario Euro Quol (Badia X et al 1999) cerrado, donde los pacientes describan su auto percepción de las cinco dimensiones de salud (movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión).

Con estos datos será posible en un futuro, determinar el índice de coste efectividad del FISH a través de los años ajustados por calidad de vida, cuantificando las mejoras en la calidad de vida, derivada de un diagnóstico precoz y un tratamiento eficaz.

## DIFICULTADES

Al ser un estudio retrospectivo, en caso de dudas sobre el registro manual era difícil esclarecerlas, pues los datos fueron incorporados hace años, incluso por personas que ya no trabajan en el Departamento. Por este motivo, una gran cantidad de muestras se tuvo que desechar, para mantenerla libre de ambigüedades o datos dudosos.

La clasificación de la OMS en Diciembre de 2008 obligó a reiniciar el estudio ajustando el análisis a ella, para lo que hubo que redistribuir la muestra según las definiciones de cada entidad, incorporar las nuevas y volver a analizar todos los registros acorde a esta nueva identificación, agrupación y segregación de patologías.

Había 110 diagnósticos diferentes en las tablas obtenidas, debidos al modo de abreviar o referirse a determinadas entidades de los distintos médicos que enviaron las solicitudes de estudio (cuestiones lingüísticas) y debidos a diagnósticos que no eran tales, sino sólo síntomas, y a veces, muy inespecíficos. Por ejemplo: "leucopenia, monocitosis, leucocitosis...". Una vez unificados se podían simplificar en 74 diagnósticos.

Si bien, actualmente, en nuestro Centro, las FISH se consideran positivas con un hallazgo del 6 a 8% de células patológicas, independientemente de la sonda utilizada cuando el resto de datos disponibles es compatible, este

límite no fue siempre el mismo. Antes era mayor el porcentaje de células patológicas requerido para informar un cultivo celular como positivo para determinada alteración genética diagnosticada por FISH. Este valor no está estandarizado ni consensuado internacionalmente, y por lo menos en nuestro estudio, ha variado a lo largo del tiempo, tal que, un mismo resultado que puede haberse considerado negativo en su momento, actualmente se consideraría positivo



1.- Teniendo en cuenta que nuestro trabajo comienza en 1999, revisamos y actualizamos todos los registros siguiendo la clasificación de la OMS de Diciembre de 2008, que identifica, agrupa y segrega patologías de modo distinto a como se venía haciendo hasta ahora. Una vez actualizada la base de datos, y dado el elevado número de resultados "no válidos", consideramos muy importante consensuar de modo eficaz los criterios y prioridades en la recepción y calidad de las muestras que se envían al laboratorio. Concluimos que es necesario estandarizar la solicitud del estudio citogenético a realizar: cariotipo convencional o análisis FISH dependiendo del diagnóstico de presunción y de la trascendencia de los datos que se pueden aportar de cara al diagnóstico, seguimiento e incluso elección de la droga más útil en cada caso.

202

2.- Tras analizar las solicitudes diagnósticas y los resultados obtenidos, impresiona conveniente utilizar un formulario cerrado, que permita solicitar solo lo específico de cada entidad de acuerdo con la nueva clasificación de la OMS. Si bien es más cómodo permitir que se pida todo "por las dudas", los precios de las técnicas hacen insostenible a largo plazo la eficiencia del protocolo. De los resultados se desprende que hay diagnósticos para los que el screening debería ser directamente la FISH, por lo que, tras valorar riesgo-beneficio de la decisión, podría descartarse la sistemática solicitud de cariotipo previo. Hay consenso en recomendar añadir en los casos de síndrome mielodisplásicos además de toda la información clínica habitual añadir el score del IPSS. También hay consenso en pedir un análisis FISH en todos los casos de nuevo diagnóstico. Pero aún debemos consensuar un protocolo técnico de solicitud de estudios con día y hora de realización,

calidad y duración del transporte, tipo de muestra elegir, indicación de hacer una nueva punción para el estudio citogenético con obtención de los primeros 3-4mL (que aportarían una mayor calidad de la muestra analizada), con un algoritmo de selección de orden de las pruebas (cariotipo convencional sólo, FISH sólo o ambos estudios) y en caso del análisis FISH, indicar qué sondas son las más adecuadas para cada caso.

203 3.- Actualmente, en nuestro Centro, las FISH se consideran positivas a partir de un 6 a 8% de células patológicas, independientemente de la sonda utilizada, cuando el resto de datos disponibles son compatibles. Este límite no fue siempre el mismo. Antes era mayor el porcentaje de células patológicas requerido para informar un cultivo celular como positivo, para determinada alteración genética diagnosticada por FISH. Este valor no está estandarizado ni consensuado internacionalmente, y por lo menos en nuestro estudio, ha variado a lo largo del tiempo. Consideramos de gran importancia estandarizar los puntos de cortes para cada sonda, y el margen estándar promedio entre todas las publicaciones revisadas se halla entre el 4 y 9% de núcleos con alteración. En todo caso, el hematólogo que sigue al paciente podría proponer los límites de la técnica para considerar un estudio negativo o positivo.

4.- Profundizamos en el estudio de 1.684 casos, de los que 602 tenían resultados comparables de FISH y cariotipo. Analizamos estadísticamente la concordancia entre los resultados de cada test para cada entidad observando que la FISH detectó patología en un 12,45% de los casos en los que el estudio citogenético diagnosticó normalidad, y en un 22,59% de los cariotipos no valorables.

Estas discrepancias pueden deberse al menor índice mitótico de algunas patologías, en las cuales la FISH cuenta con ventaja respecto al cariotipo, por poder diagnosticarse en células en interfase. Por esto, en los cariotipos no valorables de las Leucemias mieloides crónicas, Leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionados sin especificar, Leucemia promielocítica aguda con t(15,17) y Leucemia mieloides aguda con fenotipo mixto con t(9,22), es recomendable realizar la FISH por la aportación que hace al diagnóstico.

5.- Tras comparar los resultados de FISH y cariotipo, consideramos conveniente hacer la FISH como primera opción diagnóstica para:

5.1.- Las Leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionadas sin especificar y las Leucemias mieloides agudas con fenotipo mixto con t(15,17) siempre como primera opción. Pues en las Leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionadas, la concordancia entre FISH y CRT es "insignificante" y en muestras con sospecha de Leucemias promielocítica agudas con t (15,17) la concordancia diagnóstica entre ambas pruebas es "baja".

5.2.- Los Síndromes mielodisplásicos sin especificar, en los análisis evolutivos post diagnóstico inicial considerando el alto índice de cariotipos falsos positivos y la utilidad de su correcto diagnóstico para su clasificación, pronóstico y tratamiento. Los SMD son los casos con mayor índice de cariotipos sin crecimiento suficiente para su estudio (menos de 20 metafases), por lo que el análisis FISH tiene valor.

5.3.- Las leucemias en remisión y las neoplasias yatrogénicas.

6.- Respecto a la utilidad de la FISH en las leucemias mieloides crónicas, tanto las típicas como las atípicas, y los diagnósticos iniciales de los síndromes mielodisplásicos, los estudios de FISH en las neoplasias mieloides proporcionan información relevante en los casos en que el cariotipo convencional no ha sido concluyente y puede ser importante para confirmar los hallazgos del cariotipo patológico que tengan implicaciones pronósticas. En los casos en los que el cariotipo es normal, la utilidad parece ser más limitada. En esta entidad, las discrepancias entre ambos estudios son sorprendentes desde el punto de vista clínico, sobretodo en los casos de LMC con cariotipo normal.

7.- En las Neoplasias mieloproliferativas/Neoplasias mielodisplásicas sin especificar ante cariotipos normales, a la mayoría no se le realiza FISH, pero entre las muestras a las que si se realiza, un 90% tuvo FISH patológica, por esto vemos conveniente valorar la realización del FISH.

8.-En ciertas patologías, como los síndromes mielodisplásicos o los síndrome 5q- es trascendente obtener resultados válidos, puesto que de los resultados permiten establecer sobre bases científicas la elección de un tratamiento u otro, y aporta datos pronósticos, tal que habría que ponderar adecuadamente la utilidad de realizar la FISH en estos casos.

9.- En la Mielofibrosis primaria interesa diagnosticar precozmente las alteraciones en el cariotipo, porque de existir, el pronóstico es negativo. Por tanto si bien teóricamente es correcto mantener en el protocolo la determinación del cariotipo, en muchos casos será útil o incluso necesario intentar la realización de la FISH, porque habitualmente la cantidad de muestra de médula ósea obtenida es tan pequeña que apenas hay muestra para el

mielograma, es muy difícil obtener 1 ó 2 ml de médula ósea si se obtiene algo.

10.- En la Trombocitemia esencial no existen marcadores citogenéticos específicos si bien del 5 al 10% poseen alteraciones en el cariotipo, por lo que éste debe de hacerse. Así mismo, la existencia de alteración BCR ABL sirve para excluir el diagnóstico de Trombocitemia esencial.

11.- Con relación a las sondas de FISH que se utilizan actualmente en la Sección de Citogenética, consideramos que están dentro de lo recomendado, aunque las 7q31, 5q33-34, 8p11.1-q11.1 y 20q12 no se justifican para sospechas clínicas de Leucemias mieloides agudas, puesto que no influye su conocimiento en el pronóstico ni en el tratamiento, salvo que sean casos de diagnóstico diferencial posible con Síndrome mielodisplásicos o Leucemias mieloides agudas derivadas de un Síndrome mielodisplásicos del que se quiere ver su evolución.

206

En las Leucemias mieloides agudas y neoplasias de precursores relacionados es suficiente con determinar t(8;21), t(15;17) PML-RARA, inv(16) y, t(16;16). Las demás podrían obviarse por el poco valor que aportan a un resultado y tratamiento correctos.

El grupo de las Leucemias mieloides agudas con alteraciones genéticas recurrentes requiere la determinación de inv (16), t(15;17) y t(9;22).

12.- Teniendo en cuenta que la medición de la calidad de vida relacionada con la salud es cada vez más relevante como una manera de analizar la eficacia y efectividad de las intervenciones sanitarias y que el cuestionario

Euro Quol (EQ-5D) es la única herramienta aceptada y validada para argumentar la asignación de recursos sanitarios en España, proponemos se incluya en la solicitud de prueba diagnóstica, un cuestionario Euro Quol, donde los pacientes describan su auto percepción de las cinco dimensiones de salud (movilidad, cuidado personal, actividades cotidianas, dolor/malestar y ansiedad/depresión).

#### CONFLICTO DE INTERESES

La autora no tiene conflicto de intereses económicos, personales o de relación con otras personas u organizaciones, reales ni potenciales, que pudieran influir el trabajo inapropiadamente.

207

#### APORTACION

Si bien el trabajo no descubre hallazgos desconocidos en las neoplasias mieloides, contribuye a valorar la aportación del FISH para el diagnóstico de las mismas.



ANEXO DE TABLAS

Tabla 30: Clasificación de la OMS de los tumores hematopoyéticos y de los tejidos linfoides (Swerdlow 2008)

Los tipos histológicos en cursiva son entidades provisionales, para las que el grupo de trabajo de la OMS no encontró evidencias suficientes como para incluirlas como enfermedades distintas en el momento actual.

NEOPLASIAS MIELOIDES
Neoplasias mieloproliferativas
Leucemia mieloide crónica <i>BCR-ABL1</i> positiva
Leucemia neutrofilica crónica.
Policitemia vera.
Mielofibrosis primaria
Trombocitemia esencial.
Leucemia eosinofílica crónica, NOS.
Mastocitosis:
Cutánea.
Sistémica.
Leucemia de células mastocitoides
Sarcoma de células mastocitoides
Mastocitoma extra cutáneo.
Neoplasias mieloproliferativas, no clasificables.
Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y anomalías de <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> o <i>FGFR1</i> .
<i>Neoplasias mieloides y linfoides con reorganización PDGFRA.</i>
<i>Neoplasias mieloides con reorganización PDGFRB.</i>
<i>Neoplasias mieloides con reorganización FGFR1.</i>
Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas.
Leucemia mielomonocítica crónica.
Leucemia mieloide crónica atípica, <i>BCR-ABL1</i> negativa.
Leucemia mielomonocítica juvenil.
Neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa, no clasificable.
<i>Anemia refractaria con sideroblastos en anillos asociada con trombocitosis marcada.</i>
Síndromes mielodisplásicos.
Citopenia refractaria con displasia uni-linaje.
Anemia refractaria.
Neutropenia refractaria.
Trombocitopenia refractaria.
Anemia refractaria con sideroblastos en anillos.
Citopenia refractaria con displasia multi-linaje.

Anemia refractaria con exceso de blastos.  
Síndrome mielodisplásico con del (5q) aislada.  
Síndrome mielodisplásico, no clasificable.  
Síndrome mielodisplásico infantil.

*Citopenia refractaria infantil.*

#### Leucemia mieloide aguda (LMA) y neoplasias de precursores relacionados.

LMA con alteraciones genéticas recurrentes.  
LMA con t(8 ;21)(q22 ;q22) ; *RUNX1-RUNX1T1*.  
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*.  
Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*.  
LMA con t(9 ;11)(p22 ;q23) ; *MLLT3-MLL*.  
LMA con t(6 ;9)(p23 ;q34) ; *DEK-NUP214*.  
LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EV11*.  
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*.  
*LMA con mutación NPM1.*  
*LMA con mutación CEBPA.*  
LMA con cambios relacionados con mielodisplasia.  
Neoplasias mieloides relacionadas con tratamientos.  
Leucemia mieloide aguda, NOS.  
LMA con diferenciación mínima.  
LMA sin maduración.  
LMA con maduración.  
Leucemia mielomonocítica aguda.  
Leucemia monoblástica y monocítica aguda.  
Leucemia eritroide aguda.  
Leucemia megacarioblástica aguda.  
Leucemia basofílica aguda.  
Panmielosis aguda con mielofibrosis.  
Sarcoma mieloide.  
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down.  
Mielopoyesis pasajera anormal.  
Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down.  
Neoplasia de células blásticas plasmacitoides dendríticas.

#### Leucemias agudas de linaje ambiguo

Leucemia aguda indiferenciada.  
Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*.  
Leucemia aguda de fenotipo mixto con t(v;11q23); reordenamiento *MLL*.  
Leucemia aguda de fenotipo mixto, B/mieloide, NOS.  
Leucemia aguda de fenotipo mixto, T/mieloide, NOS.  
*Leucemia/linfoma de células linfoblásticas Natural killer (NK).*

#### NEOPLASIAS LINFOIDES

Neoplasias de precursores linfoides

Leucemia/linfoma linfoblástico B.

Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con anomalías genéticas recurrentes.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con t(v;11q23); reordenamiento *MLL*.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con hipodiploidía (hipodiploidía ALL).  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con t(5;14)(q31;q32); *IL-3-IGH*.  
 Leucemia linfoma linfoblástico B con t(1;19)(q23;p13.3); *E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)*.  
 Leucemia/linfoma linfoblástico T.

#### Neoplasias de células B maduras

Leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño.  
 Leucemia promielocítica de células B.  
 Linfoma esplénico de la zona marginal.  
 Leucemia de células peludas.  
*Leucemia/linfoma de células B esplénico, inclasificable.*  
*Linfoma de células B pequeñas esplénico difuso de la pulpa roja.*  
*Variante-leucemia de células peludas.*  
 Linfoma linfoplasmocítico.  
 Macroglobulinemia de Waldenström.  
 Enfermedades de cadenas pesadas.  
 Enfermedad de cadenas pesadas alfa.  
 Enfermedad de cadenas pesadas gamma.  
 Enfermedad de cadenas pesadas mu.  
 Mieloma de células plasmáticas.  
 Plasmocitoma óseo solitario.  
 Plasmocitoma extraóseo.  
 Enfermedades por depósito de inmunoglobulinas monoclonales (amiloidosis, enfermedades por el depósito de cadenas ligeras y síndrome POEMS).  
 Linfoma extranodal de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT).  
 Linfoma nodal de la zona marginal.  
*Linfoma nodal pediátrico de la zona marginal.*  
 Linfoma folicular.  
*Linfoma folicular pediátrico.*  
 Linfoma cutáneo primario del centro folicular.  
 Linfoma de células del manto.  
 Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), NOS.  
 Linfoma de células T/histiocitos rico en células B grandes.  
 DLBCL primario del CNS.  
 DLBCL cutáneo primario, tipo pierna.

*DLBCL EBV positivo de la vejez.*

DLBCL asociado a inflamación crónica.

Granulomatosis linfomatoide.

Linfoma de células B grandes mediastínico (tímico) primario.

Linfoma de células B grandes intravascular.

Linfoma de células B grandes ALK positivo.

Linfoma plasmablástico.

Linfoma de células B grandes con expresión de HHV8 asociado a la enfermedad de Castleman multicéntrica.

Linfoma efusivo primario.

Linfoma Burkitt

Linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma Burkitt.

Linfoma de células B, inclasificable, con características intermedias entre el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma Hodgkin clásico.

Neoplasias de células T y NK maduras.

Leucemia prolinfocítica de células T.

Leucemia linfocítica de células T grandes granulares.

*Alteración linfoproliferativa crónica de células NK.*

Leucemia de células NK agresiva.

Enfermedad linfoproliferativa sistémica de la infancia de células T EBV positivas.

Linfoma hidroa vacciniforme – like.

Leucemia/linfoma de células T del adulto.

Linfoma células NK/T extranodal, tipo nasal.

Linfoma de células T asociado a enteropatía.

Linfoma de células T hepatoesplénico.

Linfoma de células T paniculitis subcutánea – like.

Linfoma de células T.

Micosis fungoides.

Síndrome de Sézary.

Alteraciones linfoproliferativas primarias cutáneas de células T CD30 positivas.

Papulosis linfomatoide.

Linfoma cutáneo primario de células grandes anaplásicas.

Linfoma cutáneo primario de células T gamma-delta.

*Linfoma cutáneo primario de células T CD8 positivas agresivo epidermotrópico y citotóxico.*

*Linfoma cutáneo primario de células T CD4 positivas pequeñas/medianas.*

Linfoma de células T periférico, NOS.

Linfoma de células T angioinmunoblástico.

Linfoma anaplásico de células grandes, ALK positivo.

Linfoma anaplásico de células grandes, ALK negativo.

### Linfoma de Hodgkin

Linfoma de Hodgkin de predominio nodular linfocítico.  
 Linfoma de Hodgkin clásico.  
 Linfoma de Hodgkin tipo esclerosis nodular clásico.  
 Linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos.  
 Linfoma de Hodgkin clásico tipo celularidad mixta.  
 Linfoma de Hodgkin tipo depleción linfocítica.

### NEOPLASIAS DE CÉLULAS HISTIOCÍTICAS Y DENDRÍTICAS

Sarcoma histiocítico.  
 Tumores derivados de las células de Langerhans.  
 Histiocitosis de células de Langerhans.  
 Sarcoma de células de Langerhans.  
 Sarcoma de células dendríticas interdigitales.  
 Sarcoma de células dendríticas foliculares.  
 Tumor de células reticulares fibroblásticas.  
 Tumor de células dendríticas indeterminadas.  
 Xantogranuloma juvenil diseminado.

### ALTERACIONES LINFOPROLIFERATIVAS POST-TRANSPLANTE (PTLD)

Lesiones tempranas.  
 Hiperplasia plasmocítica.  
 PTLD mononucleosis infecciosa – like.  
 PTLD polimórficas.  
 PTLD monomórficas (tipos células B y T/NK).  
 PTLD tipo linfoma de Hodgkin clásico.

Tabla 31: Resultados de la FISH (incluidos los “no realizados”) para las 1.684 muestras mieloides sin discriminar sus resultados de cariotipo

ENTIDAD	RESULTADOS DE FISH			
	NO REALIZADO	NORMAL	PATO LÓGICO	Total general
Mieloproliferativas S/E	20	10	2	32
LMC bcr-abl +			84	84
Mielofibrosis primaria	3	2		5
Policitemia Vera	7	7		14
Trombocitemia esencial	37	38	2	77
NMP-NMP S/E	102	4	11	117
LMC a		188		188
L Mielomonocítica crónica	1	3	1	5
SMD S/E	310	187	13	510
CRDM	72	8	2	82

	Resultados de FISH			
Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
Anemias refractarias	28	2		30
LMA y NPR S/E	174	155	48	377
LMA con t (8,21)	3		1	4
LMA con inv 16	1	2	1	4
LPMA con t (15,17)	50	44	33	127
LMA FM con t (9,22)	4	11	13	28

216

Tabla 32: Resultados de la FISH (incluidos los “no realizados”) para las 1.684 muestras mieloides desagregados según resultado de cariotipo.

	Resultados de FISH			
Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			Total general
	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	
NMP	67	57	88	212
Mieloproliferativas S/E	20	10	2	32
No valorable	6	1		7
Normal	14	9		23
Patológico			2	2
LMC			84	84
No valorable			26	26
Normal			19	19
Patológico			39	39
Mielofibrosis primaria	3	2		5
No valorable	2	1		3
Normal	1	1		2

	Resultados de FISH			
Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
Policitemia Vera	7	7		14
No valorable	3	4		7
Normal	4	3		7
Trombocitemia esencial	37	38	2	77
No valorable	10	16	1	27
Normal	27	20		47
Patológico		2	1	3
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>102</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>117</b>
No valorable	26	2		28
Normal	69	1	9	79
Patológico	7	1	2	10
LMC a		188		188

	Resultados de FISH			
Resultados de cariotipo	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
No valorable		72		72
Normal		110		110
Patológico		6		6
Mielomonocítica crónica	1	3	1	5
No valorable		1	1	2
Normal	1	2		3
<b>SMD S/E</b>	<b>310</b>	<b>187</b>	<b>13</b>	<b>510</b>
No valorable	57	48	2	107
Normal	238	132	2	372
Patológico	15	7	9	31
CRDM	72	8	2	82
No valorable	23	2		25

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			Total general
	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	
Normal	47	6		53
Patológico	2		2	4
Anemias refractarias	28	2		30
No valorable	8	1		9
Normal	18			18
Patológico	2	1		3
<b>LMA y NPR S/E</b>	<b>174</b>	<b>155</b>	<b>48</b>	<b>377</b>
No valorable	43	30	12	85
Normal	110	112	31	253
Patológico	21	13	5	39
LMA con t (8,21)	3		1	4
Normal	2		1	3

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH			Total general
	NO REALIZADO	NORMAL	PATOLÓGICO	
Patológico	1			1
LMA con inv 16	1	2	1	4
No valorable			1	1
Normal	1	2		3
LPMA con t (15,17)	50	44	33	127
No valorable	10	24	13	47
Normal	37	17	12	66
Patológico	3	3	8	14
LMA FM con t (9,22)	4	11	13	28
No valorable	2	7	5	14
Normal	1	4	1	6
Patológico	1		7	8

Tabla 33: Resultados de la FISH aplicada a las 872 muestras mieloides, desagregadas según los distintos resultados de cariotipo (valores absolutos)

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	PA-TOLÓGICO	Total general
<b>Mieloproliferativas S/E</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>12</b>
No valorable	1		1
Normal	9		9
Patológico		2	2
<b>LMC</b>		<b>84</b>	<b>84</b>
No valorable		26	26
Normal		19	19
Patológico		39	39
<b>Mielofibrosis primaria</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
No valorable	1		1
Normal	1		1
<b>Policitemia Vera</b>	<b>7</b>		<b>7</b>
No valorable	4		4
Normal	3		3
<b>Trombocitemia esencial</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>40</b>
No valorable	16	1	17
Normal	20		20
Patológico	2	1	3
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
No valorable	2		2
Normal	1	9	10

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	PA-TOLÓ-GICO	Total eneral
Patológico	1	2	3
<b>LMC a</b>	188		188
No valorable	72		72
Normal	110		110
Patológico	6		6
<b>Mielomonocítica crónica</b>	3	1	4
No valorable	1	1	2
Normal	2		2
<b>SMD S/E</b>	187	13	200
No valorable	48	2	50
Normal	132	2	134
Patológico	7	9	16
<b>CRDM</b>	8	2	10
No valorable	2		2
Normal	6		6
Patológico		2	2
<b>Anemias refractarias</b>	2		2
No valorable	1		1
Patológico	1		1
<b>LMA y NPR. S/E</b>	155	48	203
No valorable	30	12	42
Normal	112	31	143
Patológico	13	5	18
<b>LMA con t (8,21)</b>		1	1
Normal		1	1

Resultados de cariotipo	Resultados FISH		
	NORMAL	PATOLÓ- GICO	NOR- MAL
<b>LMA con inv 16</b>	2	1	3
No valorable		1	1
Normal	2		2
<b>LPMA con t (15,17)</b>	44	33	77
No valorable	24	13	37
Normal	17	12	29
Patológico	3	8	11
<b>LMA FM con t (9,22)</b>	11	13	24
No valorable	7	5	12
Normal	4	1	5
Patológico		7	7

224

Tabla 34: Resultados de la FISH aplicada a las 872 muestras mieloides, desagregadas según los distintos resultados de cariotipo (valores porcentuales)

Resultados de CARIOTIPO	Resultados FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
<b>Mieloproliferativas S/E</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>12</b>
No valorable	8%	0%	8%
Normal	75%	0%	75%
Patológico	0%	17%	17%
<b>LMC</b>		<b>84</b>	<b>84</b>
No valorable	0%	31%	31%
Normal	0%	23%	23%
Patológico	0%	46%	46%

Resultados de CARIOTIPO	Resultados FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
<b>Mielofibrosis primaria</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
No valorable	50%	0%	50%
Normal	50%	0%	50%
<b>Policitemia Vera</b>	<b>7</b>		<b>7</b>
No valorable	57%	0%	57%
Normal	43%	0%	43%
<b>Trombocitemia esencial</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>40</b>
No valorable	40%	3%	43%
Normal	50%	0%	50%
Patológico	5%	3%	8%
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
No valorable	13%	0%	13%
Normal	7%	60%	67%
Patológico	7%	13%	20%
<b>LMC a</b>	<b>188</b>		<b>188</b>
No valorable	38%	0%	38%
Normal	59%	0%	59%
Patológico	3%	0%	3%
<b>LMMC</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>
No valorable	25%	25%	50%
Normal	50%	0%	50%
<b>SMD S/E</b>	<b>187</b>	<b>13</b>	<b>200</b>
No valorable	24%	1%	25%
Normal	66%	1%	67%
Patológico	4%	5%	8%

Resultados de CARIOTIPO	Resultados FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
<b>CRDM</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>10</b>
No valorable	20%	0%	20%
Normal	60%	0%	60%
Patológico	0%	20%	20%
<b>Anemias refractarias</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
No valorable	50%	0%	50%
Patológico	50%	0%	50%
<b>LMA y NPR S/E</b>	<b>156</b>	<b>48</b>	<b>204</b>
No valorable	15%	6%	21%
Normal	55%	15%	70%
Patológico	6%	2%	9%
<b>LMA con t (8,21)</b>		1	1
Normal	0%	100%	100%
<b>LMA con inv 16</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
No valorable	0%	33%	33%
Normal	67%	0%	67%
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>44</b>	<b>33</b>	<b>77</b>
No valorable	31%	17%	48%
Normal	22%	16%	38%
Patológico	4%	10%	14%
<b>LMA FM con t (9,22)</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>24</b>
No valorable	29%	21%	50%
Normal	17%	4%	21%
Patológico	0%	29%	29%

Tabla 35: Valores absolutos agrupados por entidades, de las 602 muestras a las que se realizó cariotipo y FISH (tras quitar cariotipos no valorables y FISH no realizados)

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH		
	NOR-MAL	PATOLÓGICO	Total general
Mieloproliferativas	35	61	96
Normal	33	19	52
Patológico	2	42	44
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas	120	11	131
Normal	113	9	122
Patológico	7	2	9
SMD	146	13	159
Normal	138	2	140
Patológico	8	11	19
LMA y NPR.	147	57	204
Normal	131	44	175
Patológico	16	13	29
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	4	8	12
Normal	4	1	5
Patológico		7	7
<b>Total general</b>	<b>452</b>	<b>150</b>	<b>602</b>

227

Tabla 36: Valores relativos agrupados por entidades, de las 602 muestras a las que se realizó cariotipo y FISH (tras quitar cariotipos no valorables y FISH no realizados)

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH		
	NOR-MAL	PATOLÓGICO	Total general
Mieloproliferativas	5,81	10,13	15,95
Normal	<b>5,48</b>	<b>3,16</b>	<b>8,64</b>
Patológico	<b>0,33</b>	<b>6,98</b>	<b>7,31</b>

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH		
	NOR- MAL	PATOLÓ- GICO	Total gene- ral
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas	19,93	1,83	21,76
Normal	18,77	1,50	20,27
Patológico	1,16	0,33	1,50
SMD	24,25	2,16	26,41
Normal	22,92	0,33	23,26
Patológico	1,33	1,83	3,16
LMA y NPR.	24,42	9,47	33,89
Normal	21,76	7,31	29,07
Patológico	2,66	2,16	4,82
LMA con alteraciones genéticas recurrentes	0,66	1,33	1,99
Normal	0,66	0,17	0,83
Patológico	0,00	1,16	1,16
<b>Total general</b>	<b>75,08</b>	<b>24,92</b>	<b>100,00</b>

Tabla 37: Valores absolutos y relativos de las 602 muestras a las que se realizó cariotipo y FISH (tras quitar cariotipos no valorables y FISH no realizados) desagregados para cada entidad.

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓ- GICO	Total ge- neral
<b>Mieloproliferativas S/E</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>11</b>
Normal	82%		82%
Patológico		18%	18%
<b>LMC</b>		<b>58</b>	<b>58</b>
Normal		33%	33%
Patológico		67%	67%

	Resultados de FISH		
Resultados de CARIOTIPO	NORMAL	PATOLÓ- GICO	Total ge- neral
<b>Mielofibrosis primaria</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
Normal	100%		100%
<b>Policitemia Vera</b>	<b>3</b>		<b>3</b>
Normal	100%		100%
<b>Trombocitemia esencial</b>	<b>22</b>	<b>1</b>	<b>23</b>
Normal	87%		87%
Patológico	9%	4%	13%
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>2</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
Normal	8%	69%	77%
Patológico	8%	15%	23%
<b>LMC a</b>	<b>116</b>		<b>116</b>
Normal	95%		95%
Patológico	5%		5%
<b>LMMC</b>	<b>2</b>		<b>2</b>
Normal	100%		100%
<b>SMD S/E</b>	<b>139</b>	<b>11</b>	<b>150</b>
Normal	88%	1%	89%
Patológico	5%	6%	11%
<b>CRDM</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>8</b>
Normal	75%		75%
Patológico		25%	25%
<b>Anemias refractarias</b>	<b>1</b>		<b>1</b>

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓ- GICO	Total ge- neral
Patológico	1		1
LMA y NPR S/E	125	36	161
Normal	70%	19%	89%
Patológico	8%	3%	11%
LMA con t (8,21)		1	1
Normal		100%	100%
LMA con inv 16	2		2
Normal	100%	100%	100%
LPMA con t (15,17)	20	20	40
Normal	43%	30%	73%
Patológico	8%	20%	28%
LMA FM con t (9,22)	4	8	12
Normal	33%	8%	42%
Patológico		58%	58%

230

Tabla 38: Resultado de todas las sondas de FISH aplicadas, a cada diagnóstico de cariotipo, en todas las muestras con ambas pruebas realizadas.

Resultados de cariotipo	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total ge- neral
Mieloproliferativas sin especificar	9	2	11
<b>Normal</b>	9		9

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+20q12 (D20S108)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1		1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	8		8
<b>Patológico</b>		2	2
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		2	2
LMC		58	58
<b>Normal</b>		19	19
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		19	19
<b>Patológico</b>		39	39
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		38	38
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)		1	1
Mielofibrosis primaria	1		1
<b>Normal</b>	1		1
Del. EGR1( 5q31)	1		1
Policitemia Vera	3		3
<b>Normal</b>	3		3
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	3		3
Trombocitemia esencial	22	1	23
<b>Normal</b>	20		20
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	20		20
<b>Patológico</b>	2	1	3
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	2	1	3
NMD-NMP S/E	2	11	13
<b>Normal</b>	1	9	10
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	1		1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)		9	9
<b>Patológico</b>	1	2	3

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)	1	1	2
Rb 1 (13q14 )		1	1
<b>LMCa</b>	116		116
<b>Normal</b>	110		110
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	108		108
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) +EGR1( 5q31)	1		1
Del. p53 (17p13) Reord IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21)	1		1
<b>Patológico</b>	6		6
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	5		5
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) +5q33-34	1		1
<b>LMMC</b>	2		2
<b>Normal</b>	2		2
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1		1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+5q33-34 +7q31 +8p11.1-q11.1 +20q12	1		1
<b>SMD sin especificar</b>	139	11	150
<b>Normal</b>	132	2	134
5q33-34	1		1
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1	2		2
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	36	1	37
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	22		22
Del. EGR1( 5q31)		1	1
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)	3		3
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	62		62

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108) + BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	1		1
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+ IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32)+Rb 1 (13q14 )+Gen IgH (14q32)+p53 (17p13)	1		1
Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	2		2
IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32)	1		1
IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32)+IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21)+8p11.1-q11.1+Rb 1 (13q14 )+20q12+5q33-34+7q31	1		1
<b>Patológico</b>	7	9	16
5q33-34		2	2
5q33-34 pos+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)		1	1
8p11.1-q11.1		1	1
add(5)		1	1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		2	2
Del. EGR1( 5q31)		1	1
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	6		6
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+MALT1 t(11;18)	1		1
Del.7q31		1	1
CRDM	6	2	8
<b>Normal</b>	6		6

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	2		2
IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32) + IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21)	1		1
5q33-34 +Del.7q31+8p11.1-q11.1	3		3
<b>Patológico</b>		2	2
8p11.1-q11.1		1	1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		1	1
Anemias refractarias	1		1
<b>Patológico</b>	1		1
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108)+p53 (17p13)+Gen MLL (11q23)+Gen BCL6 (3q27)	1		1
LMA y NPR S/E	125	36	161
<b>Normal</b>	112	31	143
inv (16)	3		3
5q33-34	2		2
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108) + AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+ inv(16)	1		1
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	2		2
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	25	2	27
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	9	3	12
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) pos		1	1
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	1		1
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+Gen MLL+ (11q23)+inv(16)+t(8;21)	1		1
Gen MLL (11q23)	7	2	9

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
Gen MLL (11q23) pos + AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)		1	1
inv(16) pos +PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+8p11.1- q11.1+20q12+7q31+ 5q33-34		1	1
inv(16)+ BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+ 8p11.1-q11.1 +EGR1( 5q31)7q31+20q12 (D20S108)	1		1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	59	20	79
t(14;18)	1		1
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) pos +5q33- 34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108) +BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+inv(16)		1	1
<b>Patológico</b>	13	5	18
12p-, +6,+11	1		1
5q33-34 pos+Del.7q31+8p11.1-q11.1+ AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+ BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+gen MLL (11q23)+inv(16)		1	1
8p11.1-q11.1		1	1
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	3		3
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) +PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+5q33- 34+Del.7q31+8p11.1-q11.1	1		1
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	1		1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1		1

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	3	2	5
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+8p11.1-q11.1	1		1
t(4;4),-5,-13,-15,-18,t(4;4)	1		1
t(5;19)	1		1
t(5;9),(q13;q13)		1	1
LMA con inv 16	2		2
<b>Normal</b>	2		2
inv (16)	2		2
LMA con t (8,21)		1	1
<b>Normal</b>			
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)		1	
LPMA con t (15,17)	20	20	40
<b>Normal</b>	17	12	29
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	17	11	28
t(1;3)(p36;q21)		1	1
<b>Patológico</b>	3	8	11
8p11.1-q11.1		1	1
i(17q)	1		1
nuc ish 15q22(PMLx2),17q21.1(RARAx2)		1	1
nuc ish 15q22(PMLx2),17q21.1(RARAx2),(PML con RARAx1)		1	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	2	4	6
PML/RARA t(15;17)(q22;q21), , +8		1	1
LMA FM con t (9,22)	4	8	12
<b>Normal</b>	4	1	5
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) +PML/RARA t(15;17)(q22;q21) + Gen MLL (11q 23)	1		1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1		1

Resultados de CARIOTIPO	Resultados de FISH		
	NORMAL	PATOLÓGICO	Total general
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	2	1	3
<b>Patológico</b>		7	7
8, t(9;11)(p22;q23)		1	1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		4	4
del(1)(q?),del(3)(q11),-5,BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)		1	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)		1	1
<b>Total general</b>	<b>452</b>	<b>150</b>	<b>602</b>

Tabla 39: Numero de aplicaciones de cada sonda utilizada.

237

Sonda/s aplicadas	n° de pruebas
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	252
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	122
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	69
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	39
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	32
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)	12
Gen MLL (11q23)	9
inv (16)	5
5q33-34	5
5q33-34 +Del.7q31+8p11.1-q11.1	5

Sonda/s aplicadas	n° de pruebas
8p11.1-q11.1	4
Del. EGR1( 5q31)	3
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)	3
Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)	2
40 muestras con 40 combinaciones distintas de sondas	1

Tabla 40: Discrepancias entre ambas técnicas en cada neoplasia mieloide en nuestra muestra (N=602).

	FISH	%	Total
CARIOTIPOS NORMALES	PATOLÓGICOS	discrepan- cia	FISHS
Mieloproliferativas sin especificar			9
<b>LMC bcr-abl +</b>	<b>19</b>	<b>100%</b>	<b>19</b>
Mielofibrosis primaria			1
Policitemia Vera			3
Trombocitemia esencial			20
<b>NMD-NMP sin especificar</b>	<b>9</b>	<b>90%</b>	<b>10</b>
LMC atípica bcr-abl -			110
LMMC			2
<b>SMD sin especificar</b>	<b>2</b>	<b>1,49%</b>	<b>134</b>
CRDM			6
<b>LMA y PR</b>	<b>31</b>	<b>21,67%</b>	<b>143</b>
LMA con inv 16			2
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>13</b>	<b>43%</b>	<b>30</b>
LMA FM con t (9,22)	1		5
<b>Total general</b>	<b>75</b>	<b>51,23%</b>	<b>494</b>

Tabla 41: Sondas aplicadas en las muestras con cariotipo y FISH normales

<b>Cariotipo y FISH normales</b>	
<b>Nº muestras</b>	<b>Sondas aplicadas</b>
<b>419</b>	<b>Total general</b>
174	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)
78	PML/RARA t(15;17)(q22;q21)
63	Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)
38	5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)
26	AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)
7	Gen MLL (11q23)
5	inv (16)
3	5q33-34
3	Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)
3	5q33-34 +Del.7q31+8p11.1-q11.1
2	5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1
2	Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)
<b>15</b>	<b>Distintas combinaciones de entre 1 y 10 sondas por muestra</b>

239

Tabla 42: Sondas aplicadas en distintas sospechas clínicas, en las muestras que resultaron tener cariotipo y FISH normales.

<b>Cariotipo y FISH normales</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº muestras</b>
<b>inv (16)</b>	<b>5</b>
LMA y NPR S/E	3
LMA con inv 16	2
<b>5q33-34</b>	<b>3</b>
SMD S/E	1
LMA y NPR S/E	2
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1</b>	<b>2</b>

<b>Cariotipo y FISH normales</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº mues- tras</b>
SMD S/E	2
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108) + AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+ inv(16)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+20q12 (D20S108)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>1</b>
Mieloproliferativas S/E	1
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>38</b>
SMD S/E	36
LMA y NPR S/E	2
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)</b>	<b>26</b>
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas S/E	1
LMA y NPR S/E	25
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) +PML/RARA t(15;17)(q22;q21) + Gen MLL (11q 23)</b>	<b>1</b>
LMA FM con t (9,22)	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>174</b>
Mieloproliferativas S/E	8
Policitemia Vera	3
Trombocitemia esencial	20
LMCa	108
LMMC	1
SMD S/E	22
CRDM	2
LMA y NPR S/E	9
LMA FM con t (9,22)	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) +EGR1( 5q31)</b>	<b>1</b>
LMCa	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+5q33-34 +7q31 +8p11.1-q11.1 +20q12</b>	<b>1</b>
	1
LMMC	

## Cariotipo y FISH normales

Sondas aplicadas a cada diagnóstico	Nº mues- tras
<b>Del. EGR1( 5q31)</b>	<b>1</b>
Mielofibrosis primaria	1
<b>Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)</b>	<b>3</b>
SMD S/E	3
<b>Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>63</b>
SMD S/E	62
LMA y NPR S/E	1
<b>Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108) + BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+ IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32)+Rb 1 (13q14 )+Gen IgH (14q32)+p53 (17p13)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+Gen MLL+ (11q23)+inv(16)+t(8;21)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>Del. p53 (17p13) Reord IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21)</b>	<b>1</b>
LMCa	1
<b>Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>2</b>
SMD S/E	2
<b>Gen MLL (11q23)</b>	<b>7</b>
LMA y NPR S/E	7
<b>IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32) + IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21)</b>	<b>1</b>
CRDM	1

<b>Cariotipo y FISH normales</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº mues- tras</b>
<b>IgH-bcl1 t(11;14)(q13;q32) + IgH-bcl2 t(14;18)(q32;q21) + 8p11.1-q11.1 + Rb 1 (13q14 ) + 20q12 + 5q33-34 + 7q31</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>inv(16) + BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) + 8p11.1-q11.1 + EGR1( 5q31)7q31 + 20q12 (D20S108)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21)</b>	<b>78</b>
LMA y NPR S/E	59
LPMA con t (15,17)	17
LMA FM con t (9,22)	2
<b>t(14;18)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>5q33-34 + Del.7q31 + 8p11.1-q11.1</b>	<b>3</b>
CRDM	3
<b>Total general</b>	<b>419</b>

Tabla 43: Sondas aplicadas en las muestras con cariotipo normal y FISH patológico

<b>Cariotipo normal y FISH patológico</b>	
<b>Nº mues- tras</b>	<b>Sondas aplicadas</b>
<b>75</b>	<b>Total general</b>
32	PML/RARA t(15;17)(q22;q21)
22	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)
9	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)
3	AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)
2	Gen MLL (11q23)
<b>7</b>	<b>Distintas combinaciones de entre 1 y 10 sondas por muestra</b>

Tabla 44: Sondas aplicadas en distintas sospechas clínicas, en las muestras que resultaron tener cariotipo normal y FISH patológico.

Cariotipo normal y FISH patológico	
Sondas aplicadas a cada diagnóstico	Nº mues- tras
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)</b>	<b>3</b>
LMA y NPR S/E	2
LPMA con t (15,17)	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>22</b>
<b>LMC</b>	<b>19</b>
LMA y NPR S/E	3
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)</b>	<b>9</b>
<b>Mielodisplásicas-Mieloproliferativas S/E</b>	<b>9</b>
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) pos</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>Del. EGR1 ( 5q31)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>Gen MLL (11q23)</b>	<b>2</b>
LMA y NPR S/E	2
<b>Gen MLL (11q23) pos + AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>inv(16) pos +PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+8p11.1-q11.1+20q12+7q31+5q33-34</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21)</b>	<b>32</b>
<b>LMA y NPR S/E</b>	<b>20</b>
<b>L PMA con t (15,17)</b>	<b>11</b>
LMA FM con t (9,22)	1

<b>Cariotipo normal y FISH patológico</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº mues- tras</b>
<b>t(1;3)(p36;q21)</b>	<b>1</b>
LPMA con t (15,17)	1
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) pos +5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108) +BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+inv(16)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>Total general</b>	<b>75</b>

Tabla 45: Sondas aplicadas en las muestras con cariotipo y FISH patológicos

<b>Cariotipo y FISH patológicos</b>	
<b>Nº mues- tras</b>	<b>Sondas aplicadas</b>
<b>75</b>	<b>Total general</b>
48	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)
7	PML/RARA t(15;17)(q22;q21)
4	8p11.1-q11.1
2	5q33-34
2	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)
<b>12</b>	<b>Distintas combinaciones de entre 1 y 10 sondas por muestra</b>

244

Tabla 46: Sondas aplicadas en distintas sospechas clínicas, en las muestras que resultaron tener cariotipo y FISH patológicos.

<b>Cariotipo y FISH patológicos</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº mues- tras</b>
<b>5q33-34</b>	<b>2</b>
SMD S/E	2

## Cariotipo y FISH patológicos

Sondas aplicadas a cada diagnóstico	Nº mues- tras
<b>5q33-34 pos+Del.7q31+8p11.1-q11.1+ AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+ BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)+gen MLL (11q23)+inv(16)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>5q33-34 pos+Del.7q31+8p11.1-q11.1+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>8, t(9;11)(p22;q23)</b>	<b>1</b>
LMA FM con t (9,22)	1
<b>8p11.1-q11.1</b>	<b>4</b>
SMD S/E	1
CRDM	1
LMA y NPR S/E	1
LPMA con t (15,17)	1
<b>add(5)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>48</b>
Mieloproliferativas S/E	2
LMC	38
Trombocitemia esencial	1
SMD S/E	2
Citopenia refractaria con displasia multilineaje	1
LMA FM con t (9,22)	4
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)</b>	<b>2</b>
LMC	1
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas S/E	1
<b>del(1)(q?),del(3)(q11),-5,BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>1</b>
LMA FM con t (9,22)	1
<b>Del. EGR1( 5q31)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>Del.7q31</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1

<b>Cariotipo y FISH patológicos</b>	
<b>Sondas aplicadas a cada diagnóstico</b>	<b>Nº mues- tras</b>
<b>nuc ish 15q22(PMLx2),17q21.1(RARAx2)</b>	<b>1</b>
LPMA con t (15,17)	1
<b>nuc ish 15q22(PMLx2),17q21.1(RARAx2),(PML con RARAx1)</b>	<b>1</b>
LPMA con t (15,17)	1
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21)</b>	<b>7</b>
LMA y NPR S/E	2
LPMA con t (15,17)	4
LMA FM con t (9,22)	1
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21), , +8</b>	<b>1</b>
LPMA con t (15,17)	1
<b>Rb 1 (13q14 )</b>	<b>1</b>
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas S/E	1
<b>t(5;9),(q13;q13)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>Total general</b>	<b>75</b>

Tabla 47: Número de sondas aplicadas en las muestras con cariotipo patológico y FISH normal

<b>Cariotipo patológico y FISH normal</b>	
<b>Nº mues- tras</b>	<b>Sondas aplicadas</b>
<b>33</b>	<b>Total general</b>
8	BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)
6	Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)
5	PML/RARA t(15;17)(q22;q21)
3	AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)
<b>11</b>	<b>Distintas combinaciones de entre 1 y 10 sondas por muestra</b>

Tabla 48: Sondas aplicadas en distintas sospechas clínicas, en las muestras que resultaron tener cariotipo patológico y FISH normal.

Cariotipo patológico y FISH normal	
Sondas aplicadas a cada diagnóstico	Nº muestras
<b>12p-, +6,+11</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108)+p53 (17p13)+Gen MLL (11q23)+Gen BCL6 (3q27)</b>	<b>1</b>
Anemias refractarias	1
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)</b>	<b>3</b>
LMA y NPR S/E	3
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) +PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+PML/RARA t(15;17)(q22;q21)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)</b>	<b>8</b>
Trombocitemia esencial	2
LMC-	5
LMA y NPR S/E	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)</b>	<b>1</b>
Mielodisplásicas-Mieloproliferativas S/E	1
<b>BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) +5q33-34</b>	<b>1</b>
LMC a	1
<b>Del. EGR1 (5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)</b>	<b>6</b>
SMD S/E	6
<b>Del. EGR1 (5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+MALT1 t(11;18)</b>	<b>1</b>
SMD S/E	1
<b>i(17q)</b>	<b>1</b>

LPMA con t (15,17)	1
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21)</b>	<b>5</b>
LMA y NPR S/E	3
LPMA con t (15,17)	2
<b>PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+8p11.1-q11.1</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>t(4;4),-5,-13,-15,-18,t(4;4)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>t(5;19)</b>	<b>1</b>
LMA y NPR S/E	1
<b>Total general</b>	<b>33</b>

Tabla 49: Concordancia de la sospecha clínica con el cariotipo

<b>% de concordancia sospecha clínica – cariotipo</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No valora- ble</b>	<b>Normal</b>	<b>Patoló- gico</b>
NMP S/E	21,88	71,88	6,25
LMC	30,95	22,62	46,43
MF	60,00	40,00	0,00
PV	50,00	50,00	0,00
TE	35,06	61,04	3,90
NMD-NMP	23,93	67,52	8,55
LMC a	38,30	58,51	3,19
LMMC	40,00	60,00	0,00
SMD S/E	20,98	72,94	6,08
CRDM	30,49	64,63	4,88
AR	30,00	60,00	10,00
LMA y NPR S/E	22,55	67,11	10,34
LMA con t (8,21)	0,00	75,00	25,00
LMA con inv 16	25,00	75,00	0,00
LPMA con t (15,17)	37,01	51,97	11,02
LMA FM con t (9,22)	50,00	21,43	28,57

Tabla 50: Concordancia de la sospecha clínica con la FISH

<b>% de concordancia sospecha clínica – FISH</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No realizado</b>	<b>Nor- mal</b>	<b>Patoló- gico</b>
NMP S/E	62,50	31,25	6,25
LMC	0,00	0,00	100,00
MF	60,00	40,00	0,00
PV	50,00	50,00	0,00
TE	48,05	49,35	2,60
NMD-NMP	87,18	3,42	9,40
LMC a	0,00	100,00	0,00
LMMC	20,00	60,00	20,00
SMD S/E	60,78	36,67	2,55
CRDM	87,80	9,76	2,44
AR	93,33	6,67	0,00
LMA y NPR S/E	46,15	41,11	12,73
LMA con t (8,21)	75,00	0,00	25,00
LMA con inv 16	25,00	50,00	25,00
LPMA con t (15,17)	39,37	34,65	25,98
LMA FM con t (9,22)	14,29	39,29	46,43

249

Tabla 51: Concordancia del cariotipo no valorable con la FISH

<b>% de concordancia cariotipo no valorable-FISH</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No realizado</b>	<b>Normal</b>	<b>Patológico</b>
NMP S/E	85,71	14,29	0,00
LMC	0,00	0,00	100,00
MF	66,67	33,33	0,00
PV	42,86	57,14	0,00
TE	37,04	59,26	3,70
NMD-NMP	92,86	7,14	0,00

<b>% de concordancia cariotipo no valorable-FISH</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No realizado</b>	<b>Normal</b>	<b>Patológico</b>
LMC a	0,00	100,00	0,00
LMMC	0,00	50,00	50,00
SMD S/E	53,27	44,86	1,87
CRDM	92,00	8,00	0,00
AR	88,89	11,11	0,00
LMA y NPR S/E	50,59	35,29	14,12
LMA con inv 16	0,00	0,00	100,00
LPMA con t (15,17)	21,28	51,06	27,66
LMA FM con t (9,22)	14,29	50,00	35,71

Tabla 52: Concordancia del cariotipo normal con la FISH

<b>% de concordancia cariotipo normal-FISH</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No realizado</b>	<b>Normal</b>	<b>Patológico</b>
NMP S/E	60,87	39,13	0,00
LMC	0,00	0,00	100,00
MF	50,00	50,00	0,00
PV	57,14	42,86	0,00
TE	57,45	42,55	0,00
NMD-NMP	87,34	1,27	11,39
LMC a	0,00	100,00	0,00
LMMC	33,33	66,67	0,00
SMD S/E	63,98	35,48	0,54
CRDM	88,68	11,32	0,00
AR	100,00	0,00	0,00
LMA y NPR S/E	43,48	44,27	12,25
LMA con t (8,21)	66,67	0,00	33,33
LMA con inv 16	33,33	66,67	0,00
LPMA con t (15,17)	56,06	25,76	18,18
LMA FM con t (9,22)	16,67	66,67	16,67

Tabla 53: Concordancia del cariotipo patológico con la FISH

<b>% de concordancia cariotipo patológicos-FISH</b>			
<b>ENTIDADES</b>	<b>No realizado</b>	<b>Normal</b>	<b>Patológico</b>
NMP S/E	0,00	0,00	100,00
LMC	0,00	0,00	100,00
TE	0,00	66,67	33,33
NMD-NMP	70,00	10,00	20,00
LMC a	0,00	100,00	0,00
SMD S/E	48,39	22,58	29,03
CRDM	50,00	0,00	50,00
AR	66,67	33,33	0,00
LMA y NPR S/E	53,85	33,33	12,82
LMA con t (8,21)	100,00	0,00	0,00
LPMA con t (15,17)	21,43	21,43	57,14
LMA FM con t (9,22)	12,50	0,00	87,50

251

Tabla 54: Sondas utilizadas en muestras con cariotipos patológicos y FISH normales, agrupadas por tipos de entidad

<b>Sondas utilizadas en muestras de cariotipos patológicos</b>	<b>FISH NORMALES</b>
<b>TE</b>	<b>2</b>
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	2
<b>NMD-NMP S/E</b>	<b>1</b>
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) + LSI BCR (22q11.2)	1
<b>LMCa</b>	<b>6</b>
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	5
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) +5q33-34	1
<b>SMD S/E</b>	<b>7</b>
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)	6

Sondas utilizadas en muestras de cariotipos patológicos	FISH NORMALES
Del. EGR1( 5q31)+Del.7q31+ 8 (8p11.1-q11.1)+Del.20q12 (D20S108)+MALT1 t(11;18)	1
<b>AR</b>	<b>1</b>
5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1 +Del.20q12 (D20S108)+p53 (17p13)+Gen MLL (11q23)+Gen BCL6 (3q27)	1
<b>LMA y PR S/E</b>	<b>13</b>
12p-, +6,+11	1
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)	3
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22) +PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+5q33-34+Del.7q31+8p11.1-q11.1	1
AML1-ETO/ t(8;21)(q22;q22)+PML/RARA	1
t(15;17)(q22;q21)	1
BCR/ABL t(9;22)(q34;q11)	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	3
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)+8p11.1-q11.1	1
t(4;4),-5,-13,-15,-18,t(4;4)	1
t(5;19)	1
<b>LPMA con t (15,17)</b>	<b>3</b>
i(17q)	1
PML/RARA t(15;17)(q22;q21)	2
<b>Total general</b>	<b>33</b>



## +

+19, 30, 182  
+21, 30, 56, 182, 192  
+22, 56  
+8, 30, 33, 38, 40, 42, 45, 176, 182,  
183, 236

## 1

12p, 40, 46, 235  
-13, 46, 236

## 2

22q11.2, 231, 232, 237, 242, 244

## 5

-5, 45, 236, 237

## 7

-7, 30, 40, 45, 182

## 9

9q, 38, 46, 63, 64, 176  
9q34, 29, 182

## A

adenopatías, 52, 54  
alquilantes, 51  
OML1, 68, 69, 211  
anemia, 32, 41, 49, 51, 125, 149, 152  
Anemia refractaria con exceso de  
blastos, 44, 47, 210  
anemias refractarias con  
sideroblastos en anillos, 47  
OREB. Véase anemia refractaria con  
exceso de blastos

## B

Bandas G, 59

bandeado, 59, 62  
BCR-OBL, 28, 31, 39, 41, 62, 64, 65,  
181, 191  
benceno, 51

## C

**Características genéticas**, 28, 33, 35,  
37, 40, 42, 44, 49, 50, 52, 56, 57,  
58  
CD34+, 35  
citogenética molecular, 60, 90, 95,  
108  
citopenia refractaria con displasia  
multilinaje, 50  
citopenias refractarias con displasia  
multilinaje, 47  
citotóxicos, 34  
cloranfenicol, 51  
complicaciones, 36  
CRDM. Véase citopenia refractaria  
con displasia multilinaje  
Cromosoma Philadelphia, 55, 64, 65

## D

del(11q), 46  
del(12p), 46  
del(13q), 46  
del(20q), 45, 48  
del(5q), 45, 48  
del(7q), 45  
del(9q), 46  
der(6) t(1;6) (q21-23;p21.3), 35

## E

enfermedad mínima residual, 31  
**Epidemiología**, 51  
eritrocitosis, 33  
esplenomegalia, 32, 35, 36, 41  
**Etiología**, 51  
ETH  
OML, 68, 69  
Euro Quol, 17, 195, 207

## F

**factores predictivos.** *Véase*  
Pronóstico  
FISH, 29, 31, 33, 35, 59, 60, 63, 90, 95,  
108

## G

gemelos, 51  
genes supresores de tumores, 31

## H

**Hallazgos clínicos,** 52  
hemograma, 52  
hemorragias, 36, 38, 52

## I

i(17q), 30, 46, 182, 236  
imantinib, 32  
Índice Pronóstico Internacional  
(IPSS), 48  
Inmunofenotipo, 55  
interferón, 29, 31  
inv(16), 25, 53, 55, 56, 179, 191, 192,  
206, 211, 234, 235  
inv(16)(p13.1q22), 25, 53, 55, 56,  
179, 211  
inv(3)(q21q26.2), 45, 53, 211  
isocromosoma 17q, 42, 183

## J

JOK2, 24, 27, 33, 35, 194

## L

Leucemia mieloide crónica atípica,  
*BCR-ABL1* negativa, 25, 210  
Leucemia mielomonocítica crónica,  
39  
leucemia mieloide crónica, 28  
LMA con alteraciones genéticas  
recurrentes, 53, 211

LMC. *Véase* leucemia mieloide  
crónica  
LMCa. *Véase* Leucemia mieloide  
cronica atípica (BCR\_OBL  
negativa), *Véase* Leucemia  
mieloide cronica atípica (BCR\_OBL  
negativa), *Véase* Leucemia  
mieloide cronica atípica (BCR\_OBL  
negativa)  
LMMC. *Véase* Leucemia  
mielomonocítica crónica

## M

Mastocitosis, 210  
muestras, 16, 94  
mutación, 22, 27, 33, 35, 38, 40, 42,  
43, 45, 53, 176, 177, 182, 183,  
194, 211  
MYC, 31, 73, 76

## N

neoplasia mieloproliferativa, 32, 34,  
39  
neoplasias mieloproliferativas, 28  
nivel de significación, 98

## P

P valor, 98  
p16, 31  
p230, 30  
p53, 31, 45, 184, 232, 233, 234  
PCR, 24, 29, 31, 55, 56  
Philadelphia. *Véase* cromosoma  
philadelphia  
PML-RARA, 25, 53, 191, 192, 206,  
211  
Policitemia vera, 25, 210  
**Pronóstico y factores predictivos,** 31,  
34, 36, 38, 41, 42, 46, 50, 54, 56,  
57, 58

## Q

quimioterapia, 31, 47

**R**

radiación ionizante, 51  
 radioterapia, 45  
 RB1, 31  
 receptor de ácido alfa retinoico.  
*Véase* RORO  
 resolución, 60, 62

**S**

sarcoma mielóide, 52  
 síndrome de Down, 45, 51, 53, 211  
 Síndromes mielodisplásicos, 25, 43,  
 44, 210  
 SMD. *Véase* Síndromes  
 mielodisplásicos

**T**

**t (9,22)**, 108, 116, 130, 216, 221,  
 224, 226, 230, 236  
 t(1;3)(p36.3;q21.2), 46  
 t(11;16)(q23;p13.3), 46  
 t(12p), 46  
 t(15;17)(q22;q12), 55  
 t(16;16)(p13.1;q22), 55

t(16;16)(p13.3;q22), 56  
 t(17p), 46  
 t(2;11)(p21;q23), 46  
 t(22q11.2), 29, 182  
 t(3;21)(q26.2;p22.1), 46  
 t(3;3)(q21q26.2), 45  
 t(5;12)(q31-33 p12), 40  
 t(6;9)(p23;q34), 46  
 t(8;21)(q22;q22), 55  
 t(9;11)(p22;q23), 55

**Tejidos afectados**, 52

timo, 52  
 tirosina-quinasa, 28  
 TROSLHCOCIÓN (15,17), 71  
 TROSLHCOCIÓN (8,21), 68  
 TRASLOCACIÓN 8, 76  
 trombocitemia esencial, 25, 26, 27,  
 37, 194, 210  
 Trombocitopenia, 44, 210

**Y**

-Y, 45

**A**

$\alpha$ , 98

A decorative banner at the bottom of the page features a stylized DNA double helix structure in shades of blue, green, and yellow against a dark background. The text "INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS" is written in white, uppercase letters across the center of the banner.

INDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

IMAGEN 1: FORMACIÓN DE BCR-ABL, MODIFICADO DE TERESE WINSLOW (WINSLOW 2010)	29
IMAGEN 2: MECANISMO DE ACCIÓN DEL IMATINIB® MODIFICADO DE I. MILES (ISABELLE 2010)	32
IMAGEN 3: DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA MIELOFIBROSIS	36
IMAGEN 4: PROCESO DE LA FISH	61
IMAGEN 5: IMAGEN DE FISH, HIBRIDACIÓN DE SONDA EN PACIENTE CON T(9;22)	61
IMAGEN 6: FORMACIÓN DEL CROMOSOMA PHILADELPHIA (MODIFICADO DE TERESE WINSLOW)	64
IMAGEN 7: ESQUEMA Y CARIOTIPO DE DE LA T(9;22)(Q34,Q11)	65
IMAGEN 8: FISH Y ESQUEMA DE BCR-ABL	66
IMAGEN 9: ESQUEMA DE LA TRANSLOCACIÓN T(8;21)	68
IMAGEN 10: ESQUEMA DEL GEN AML	69
IMAGEN 11: ESQUEMA DEL GEN ETO	70
IMAGEN 12: FISH DE FUSIÓN AML1/ETO	70
IMAGEN 13: ESQUEMA DEL GEN PML	71
IMAGEN 14: ESQUEMA DEL GEN RARA	72
IMAGEN 15: ESQUEMA DE TRANSLOCACIÓN (15;17)	72
IMAGEN 16: ESQUEMA E IMAGEN DE FISH DE PML-RARA	73
IMAGEN 17: ESQUEMA DE LA TRANSLOCACIÓN (8;14)	75
IMAGEN 18: ESQUEMA DEL GEN MYC	75
IMAGEN 19: SONDA PARA DETECTAR LA TRANSLOCACIÓN 8Q 22 (MYC)	76
IMAGEN 20: DESCRIPCIÓN DE LA SONDA PARA DETECTAR LA INV 16	78
IMAGEN 21: ESQUEMA DE LA SONDA PARA DIAGNOSTICAR EL REORDENAMIENTO DEL GEN MLL	79
IMAGEN 22: DESCRIPCIÓN DE LA SONDA Y FISH DE REORDENAMIENTO MLL	80
IMAGEN 23: ESQUEMA DE LA SONDA PARA DIAGNOSTICAR LA DELECIÓN 7Q31	81
IMAGEN 24: SONDA IDENTIFICANDO LA DELECIÓN 7Q31	81
IMAGEN 25: ESQUEMA DE LA SONDA QUE DIAGNOSTICA LA DELECIÓN 5Q31	82
IMAGEN 26: DELECIÓN DE 5P15.2 EN UN SDME. CRI DU CHAT	83
IMAGEN 27: PATRÓN NORMAL DE SONDA BUSCANDO DELECIÓN 5Q 33-34	84
IMAGEN 28: FISH DE 8P11.1-Q11.1	85
IMAGEN 29: ESQUEMA DE LA SONDA QUE DIAGNOSTICA LA DELECIÓN 20Q12	86
IMAGEN 30: DISTRIBUCIÓN MIELOIDE- LINFOIDE DE LA MUESTRA, TRAS PURIFICARLA	104
IMAGEN 31: DISTRIBUCIÓN DE MUESTRA CON FISH Y CARIOTIPO REALIZADO	105
IMAGEN 32: RESULTADO DE CARIOTIPO DE LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES	109
IMAGEN 33: RESULTADO DE FISH DE LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES	110
IMAGEN 34: FISH PATOLÓGICOS EN CARIOTIPOS NO VALORABLES, EN ENTIDADES DONDE HABÍA DISCREPANCIAS QUE IMPLICABAN CAMBIOS TERAPÉUTICOS	117
IMAGEN 35: CONCORDANCIA DE LOS RESULTADOS DE LA FISH CON LOS CARIOTIPOS NO VALORABLES	119

IMAGEN 36: FISH PATOLÓGICOS EN CARIOTIPOS NORMALES, EN ENTIDADES DONDE HABÍA DISCREPANCIAS QUE IMPLICABAN CAMBIOS TERAPÉUTICOS. ....	120
IMAGEN 37: CONCORDANCIA DE LOS RESULTADOS DE LA FISH CON LOS CARIOTIPOS NORMALES. ....	121
IMAGEN 38: FISH NORMALES EN CARIOTIPOS PATOLÓGICOS, EN ENTIDADES DONDE HABÍA DISCREPANCIAS QUE IMPLICABAN CAMBIOS TERAPÉUTICOS. ....	122
IMAGEN 39: CONCORDANCIA DE LOS RESULTADOS DE LA FISH CON LOS CARIOTIPOS PATOLÓGICOS. ....	123
IMAGEN 40: CAUSAS DE LA REALIZACIÓN DE FISH Y RESULTADOS EN CADA CASO.....	127
IMAGEN 41: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH DE LAS NMP. ....	131
IMAGEN 42: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH DE LAS NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS / MIELOPROLIFERATIVAS. ....	132
IMAGEN 43: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS. ....	133
IMAGEN 44: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH DE LAS LMA Y DE PRECURSORES RELACIONADOS. ....	134
IMAGEN 45: COMPARATIVA DE LOS RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH DE LAS LMA CON FENOTIPO MIXTO Y T(9;22) (q34;q11.2).....	135
IMAGEN 46: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS SIN ESPECIFICAR, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	145
261 IMAGEN 47: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LEUCEMIAS MIELOIDES CRÓNICAS BCR ABL+, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS). ....	146
IMAGEN 48: RESULTADOS DE LA SONDA UTILIZADA EN LA FISH EN LAS MIELOFIBROSIS PRIMARIAS, PARA EL ÚNICO RESULTADO VÁLIDO DE CARIOTIPO. ....	146
IMAGEN 49: RESULTADOS DE LA SONDA UTILIZADA EN LA FISH EN LAS POLICITEMIAS VERA, PARA LOS 3 CARIOTIPOS VÁLIDOS OBTENIDOS EN MUESTRAS CON ESTA SOSPECHA CLÍNICA. ....	147
IMAGEN 50: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS TROMBOCITEMIAS ESENCIALES, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS). ....	147
IMAGEN 51: RESULTADOS DE LA SONDA UTILIZADA EN LA FISH EN LAS NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS - MIELOPROLIFERATIVAS SIN ESPECIFICAR, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS). ....	148
IMAGEN 52: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LEUCEMIAS MIELOIDES CRÓNICAS ATÍPICAS BCR ABL -, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	148
IMAGEN 53: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LEUCEMIAS MIELOMONOCÍTICAS CRÓNICAS, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS). ....	149
IMAGEN 54: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LA CITOPENIA REFRACTARIA CON DISPLASIA MULTILINAJE, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	149

IMAGEN 55: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS SIN ESPECIFICAR, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	150
IMAGEN 56: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA ÚNICA FISH SOLICITADA EN SOSPECHA DE ANEMIA REFRACTARIA, TRAS OBTENER UN RESULTADO DE CARIOTIPO PATOLÓGICO. ....	152
IMAGEN 57: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LMA Y NPR SIN ESPECIFICAR, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	153
IMAGEN 58: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LMA CON INV 16, ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS). ....	154
IMAGEN 59: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LEUCEMIAS PROMIELOCÍTICAS AGUDAS CON T (15;17), ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	155
IMAGEN 60: RESULTADOS DE LAS SONDAS UTILIZADAS EN LA FISH EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS CON FENOTIPO MIXTO CON T(9;22), ENTRE LOS CARIOTIPOS VÁLIDOS (NORMALES O PATOLÓGICOS).....	156
IMAGEN 61: VALORES DE LAS 5 SELECCIONES DE SONDAS MÁS UTILIZADAS. ....	157
TABLA 1: ENTIDADES MIELOIDES QUE ESTUDIAREMOS EN ESTE TRABAJO .....	25
TABLA 2: NEOPLASIAS MIELODISPLÁSICAS / NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS .....	39
TABLA 3: SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS .....	44
TABLA 4: FRECUENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN LOS SMD AL DIAGNÓSTICARLAS. ....	46
TABLA 5 : ÍNDICE PRONÓSTICO INTERNACIONAL (IPSS) (MALCOVATI 2005). ....	48
TABLA 6 : CLASIFICACIÓN DE LAS LMA SEGÚN WHO(SWERDLOW 2008) .....	53
TABLA 7: FACTORES PREDICTIVOS FAVORABLES Y DESFAVORABLES DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLÁSTICAS.....	54
TABLA 8: INTERVALOS DE ACUERDO PARA EL COEFICIENTE KAPPA SEGÚN LANDIS Y KOCH ...	97
TABLA 9: CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA PARA DIAGNOSTICO DE PATOLOGÍA ONCOHEMATOLÓGICA OBTENIDA ENTRE ENERO DE 1999 Y DICIEMBRE DE 2009	103
TABLA 10: DISTRIBUCIÓN MIELOIDE – LINFOIDE DE LA MUESTRA OBTENIDA ENTRE 01/1999 Y 12/2009.....	103
TABLA 11: DISTRIBUCIÓN DE LAS 1.725 MUESTRAS LINFOIDES .....	104
TABLA 12: DISTRIBUCIÓN DE LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES.....	105
TABLA 13: VALORES ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LAS 602 MUESTRAS A LAS QUE SE REALIZÓ CARIOTIPO Y FISH (TRAS QUITAR CARIOTIPOS NO VALORABLES Y FISH NO REALIZADOS) DESAGREGADOS PARA CADA ENTIDAD. ....	106
TABLA 14: RESULTADOS DE LA FISH (INCLUIDOS LOS “NO REALIZADOS”) PARA LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES DESAGREGADOS SEGÚN RESULTADO DE CARIOTIPO. ....	111
TABLA 15: ENTIDADES EN LAS QUE FISH APORTÓ INFORMACIÓN RELEVANTE EN MUESTRAS CON CARIOTIPOS NO VALORABLES. ....	118
TABLA 16: CAUSAS DE REALIZACIÓN DE FISH.....	126

TABLA 17: RESULTADOS DE LA FISH APLICADA A LAS 872 MUESTRAS MIELOIDES, DESAGREGADAS SEGÚN LOS DISTINTOS RESULTADOS DE CARIOTIPO (VALORES ABSOLUTOS) .....	128
TABLA 18: % DISCREPANCIA DE RESULTADOS CRT VS FISH EN LAS DISTINTAS ENTIDADES .....	136
TABLA 19: RESUMEN DEL ANÁLISIS CON SPSS DE LA CONCORDANCIA DEL TOTAL DE LA MUESTRA .....	137
TABLA 20: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS BIVARIADO DEL CARIOTIPO Y DEL FISH EN LOS 602 CASOS DE LA MUESTRA. ....	138
TABLA 21: COEFICIENTE DE CONCORDANCIA KAPPA PARA LAS DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS .....	140
TABLA 22: INTERVALOS DE ACUERDO PARA KAPPA SEGÚN LANDIS Y KOCH .....	142
TABLA 23: COEFICIENTE DE CONCORDANCIA KAPPA ENCONTRADO EN NUESTRO ESTUDIO PARA LAS DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS .....	144
TABLA 24: ESTA TABLA INDICA LO QUE APORTÓ LA FISH EN LAS DISTINTAS ENTIDADES, EN LOS CASOS EN QUE EL CARIOTIPO RESULTÓ SER NORMAL O NO VALORABLE. ....	162
TABLA 25: DISCREPANCIAS (CRT NORMAL Y FISH PATOLÓGICOS) EN LOS SMD EN NUESTRO TRABAJO. ....	165
TABLA 26: RESULTADOS DE DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO SIMILARES A ESTA TESIS .....	167
TABLA 27: CONCORDANCIA DE RESULTADOS NORMALES Y PATOLÓGICOS DE LAS 602 MUESTRAS CON CARIOTIPO Y FISH REALIZADOS .....	173
TABLA 28: DETALLE DE LAS SONDAS DE FISH QUE DIERON POSITIVAS EN LAS 75 MUESTRAS QUE TENÍAN CARIOTIPO NORMAL Y FISH PATOLÓGICO. ....	186
263 TABLA 29: COMPARACIÓN DE SONDAS UTILIZADAS POR NUESTRO SERVICIO Y LAS CONSIDERADAS POR OMS EN LA ÚLTIMA CLASIFICACIÓN DE ENTIDADES ONCOLÓGICAS MIELOIDES. ....	191
TABLA 30: CLASIFICACIÓN DE LA OMS DE LOS TUMORES HEMATOPOYÉTICOS Y DE LOS TEJIDOS LINFÓCIDES (SWERDLOW 2008) .....	210
TABLA 31: RESULTADOS DE LA FISH (INCLUIDOS LOS "NO REALIZADOS") PARA LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES SIN DISCRIMINAR SUS RESULTADOS DE CARIOTIPO .....	215
TABLA 32: RESULTADOS DE LA FISH (INCLUIDOS LOS "NO REALIZADOS") PARA LAS 1.684 MUESTRAS MIELOIDES DESAGREGADOS SEGÚN RESULTADO DE CARIOTIPO. ....	216
TABLA 33: RESULTADOS DE LA FISH APLICADA A LAS 872 MUESTRAS MIELOIDES, DESAGREGADAS SEGÚN LOS DISTINTOS RESULTADOS DE CARIOTIPO (VALORES ABSOLUTOS) .....	222
TABLA 34: RESULTADOS DE LA FISH APLICADA A LAS 872 MUESTRAS MIELOIDES, DESAGREGADAS SEGÚN LOS DISTINTOS RESULTADOS DE CARIOTIPO (VALORES PORCENTUALES) .....	224
TABLA 35: VALORES ABSOLUTOS AGRUPADOS POR ENTIDADES, DE LAS 602 MUESTRAS A LAS QUE SE REALIZÓ CARIOTIPO Y FISH (TRAS QUITAR CARIOTIPOS NO VALORABLES Y FISH NO REALIZADOS) .....	227
TABLA 36: VALORES RELATIVOS AGRUPADOS POR ENTIDADES, DE LAS 602 MUESTRAS A LAS QUE SE REALIZÓ CARIOTIPO Y FISH (TRAS QUITAR CARIOTIPOS NO VALORABLES Y FISH NO REALIZADOS) .....	227

TABLA 37: VALORES ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LAS 602 MUESTRAS A LAS QUE SE REALIZÓ CARIOTIPO Y FISH (TRAS QUITAR CARIOTIPOS NO VALORABLES Y FISH NO REALIZADOS) DESAGREGADOS PARA CADA ENTIDAD. ....	228
TABLA 38: RESULTADO DE TODAS LAS SONDAS DE FISH APLICADAS, A CADA DIAGNOSTICO DE CARIOTIPO, EN TODAS LAS MUESTRAS CON AMBAS PRUEBAS REALIZADAS. ....	230
TABLA 39: NUMERO DE APLICACIONES DE CADA SONDA UTILIZADA. ....	237
TABLA 40: DISCREPANCIAS ENTRE AMBAS TÉCNICAS EN CADA NEOPLASIA MIELOIDE EN NUESTRA MUESTRA (N=602). ....	238
TABLA 41: SONDAS APLICADAS EN LAS MUESTRAS CON CARIOTIPO Y FISH NORMALES ....	239
TABLA 42: SONDAS APLICADAS EN DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS, EN LAS MUESTRAS QUE RESULTARON TENER CARIOTIPO Y FISH NORMALES. ....	239
TABLA 43: SONDAS APLICADAS EN LAS MUESTRAS CON CARIOTIPO NORMAL Y FISH PATOLÓGICO ....	242
TABLA 44: SONDAS APLICADAS EN DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS, EN LAS MUESTRAS QUE RESULTARON TENER CARIOTIPO NORMAL Y FISH PATOLÓGICO. ....	243
TABLA 45: SONDAS APLICADAS EN LAS MUESTRAS CON CARIOTIPO Y FISH PATOLÓGICOS. ....	244
TABLA 46: SONDAS APLICADAS EN DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS, EN LAS MUESTRAS QUE RESULTARON TENER CARIOTIPO Y FISH PATOLÓGICOS. ....	244
TABLA 47: NÚMERO DE SONDAS APLICADAS EN LAS MUESTRAS CON CARIOTIPO PATOLÓGICO Y FISH NORMAL. ....	246
TABLA 48: SONDAS APLICADAS EN DISTINTAS SOSPECHAS CLÍNICAS, EN LAS MUESTRAS QUE RESULTARON TENER CARIOTIPO PATOLÓGICO Y FISH NORMAL. ....	247
TABLA 49: CONCORDANCIA DE LA SOSPECHA CLÍNICA CON EL CARIOTIPO ....	248
TABLA 50: CONCORDANCIA DE LA SOSPECHA CLÍNICA CON LA FISH. ....	249
TABLA 51: CONCORDANCIA DEL CARIOTIPO NO VALORABLE CON LA FISH. ....	249
TABLA 52: CONCORDANCIA DEL CARIOTIPO NORMAL CON LA FISH. ....	250
TABLA 53: CONCORDANCIA DEL CARIOTIPO PATOLÓGICO CON LA FISH. ....	251
TABLA 54: SONDAS UTILIZADAS EN MUESTRAS CON CARIOTIPOS PATOLÓGICOS Y FISH NORMALES, AGRUPADAS POR TIPOS DE ENTIDAD ....	251



1. A Hagemeijer, et al. «Leukemia.» Cap. 7, editado por Saunders. 1996.
2. Acosta TA, Cigudosa JC, Otero A, García Miranda JL. «B2 exon of the bcr gene is also duplicated in some patients with CML.» *Leukemia* 13 (1999): 645 .
3. Akasaka T, et al. *J Clin Oncol* 18, nº 3 (2000): 510-518 .
4. Andrieux, JL et al. «Karyotype and molecular cytogenetic studies in polycythemia vera.» *Curr Haematol Rep*, nº 4 (2005): 224-229.
5. Badia X et al. «La version española del EuroQol: descripción y aplicaciones.» *Med Clin (Barc)* suplemento 1, nº 112 (1999): 79-86.
6. Bernasconi P, Boni M. «Clinical relevance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes.» *Ann N Y Acad Sci* 1089 (2006): 395-410.
7. Bernasconi P, Cavigliano PM et al. «Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study of 57 patients.» *Leukaemia* 12 (2003): 2107-2112.
8. Beyer V, Castagné C. «Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31),-7 or chromosome 8 aneuploidy by Interfase FISH in 110 acute myelocytic leukemia and high risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics.» *Cancer Gener Cytogenet* 152(1) (2004): 29-41.
9. Bloomfield, et al CD. *Cancer research*, nº 58 (1998): 4173-4179.
10. Borrow J, et al. *Science* 28, nº 249(4976) (Sep 1990): 1577-1580 .
11. Brescia, M et al. «Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia.» *Haematologica*, nº 91 (2006): 1566-1568.
12. Brunel V, et al. *Genes Chromosomes Cancer* , nº 14(4) (Dec 1995 ): 307-312 .
13. Brunning RD, et al. «Tumors of the bone marrow. Armed Forces Institute of Pathology.» 1994.
14. Byrd J, et al. *J Clin Oncol* 17 (1999): 3767-3775.
15. Byrd J, et al. *Clin Cancer Res* 4 (1998): 1235-1241.
16. Byrd, JC et al. «Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patient with de novo acute myeloid

leukemia:results from Cancer and Leukemia Group B.» 2002: 4325-4336.

17. Cai Y, Qin YW. «Detection of cytogenetic abnormalities involving chromosomes 5,7 and 8 in SMD with FISH and its clinical significance.» *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi - PMID 17649717 Pubmed indexed for medline* 28(1) (2007): 6-10.
18. Carbonell F, et Al. «Cytogenetics findings in acute biphenotypic leukaemia.» *Leukaemia* (10), 1996: 1283-1287.
19. Carrasco Juan JL, Hernández García MT, Otero A, Vilar MC, Marsá L, González Brito G, García Miranda JL, Hernández Nieto L. «Cromosoma Filadelfia enmascarado: implicaciones diagnósticas en un caso de leucemia mieloide crónica de presentación en crisis blástica.» *Sangre* 37 (1992): 395-398.
20. Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, García Miranda JL, Brito Barroso ML, Hernández García MT, Hernández Nieto L. «AML with unusual chromosomal changes. Translocation (15;21) and 5q- in the presence of two normal chromosomes 5.» *Cancer Genetics and Cytogenetics* 61 (1992): 139-141.
21. Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, García Miranda JL, Trujillo González M, Herrera Fernández M, Bello Hernández T. «Deletion (7)(p11p15) in a patient with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia.» *Cancer Genetics and Cytogenetics* 64 (1992): 142-144.
22. Cervantes, F et al. «Myelofibrosis with myeloid metaplasia:diagnosis, prognostic factors and staging.» *Semin Oncol*, nº 32 (2005): 395-402.
23. Cherry AM, Brockman Sr et al. «Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study.» *Leuk Res* 27 (2003): 1085-1090.
24. Church DM, et al. *Genomic Res.*, nº 7(8) (1997): 787-801.
25. Cigudosa JC, Acosta Almeida MT, Carrasco V, Bello T, Carrasco JL, Otero Gómez A, García Talavera J, García Miranda JL. «Bcr-abl rearrangement and "variant" Philadelphia chromosome in de novo acute myelogenous leukemia FAB subtype M1.» *British Journal of Haematology* 91 (1995): 932-934.

26. Cigudosa JC, Acosta Almeida T, Carrasco Juan JL, Otero Gómez A, Hernández Nieto L, García Talavera J, García Miranda JL. «Deletion of exon b3 of gene BCR in CML. Easy breakpoint mapping by a two round PCR.» *Cancer Genetics and Cytogenetics*, nº 91 (1996): 71-73.
27. Cimino G, et al. *Haematologica*, nº 83 (1998): 350-357.
28. Collins C, et. al. Editado por Sci. *Proc. Natl. Acad.* 95 (1998 ): 8703-87083.
29. Costa D, Espinet B. «Chimeric BCR/ABL gene detected by fluorescence in situ hybridization in three new cases of Philadelphia chromosome-negative chronic myelocytic leukemia.» *Cancer genet Cytogenet*, nº 141(2) (2003): 114-119.
30. Costa D, Valera S et al. «Do we need to do fluorescence in situ hybridization analysis in myelodisplastica syndromes as often as we do?» *Leuk Res* 34 (2010): 1437-1441.
31. Cotta, CV et al. «New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia.» *Ann Diagn Pathol*, nº 11 (2007): 68-78.
32. Cuneo A., et al. «Detection and monitoring of trisomy 8 by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukaemia: a multicentre study.» *Haematologica* 83 (1998): 21-26.
33. Dash, A et al. «Molecular genetics of acute myeloid leukaemia.» *Best Pract Res Clin Haematol*, nº 14 (2001): 49-64.
34. Deininger, et al. «Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib.» *Pharmacol Rev*, nº 55 (2003): 401-423.
35. Delaunay, J et al. «Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia; a survey of 110 cases from the French AML intergroup.» *Blood*, nº 102 (2003): 462-469.
36. Deschler, B et al. «Acute myeloid leukemia:epidemiology and etiology.» *Cancer*, nº 107 (2006): 2099-2107.
37. Dewald GW, et al. *Leuk Lymphoma*, nº 34 (1999): 481-91.
38. Dewald GW, et al. *Blood* 91 (2000): 3357-3365 .
39. Dingli, D et al. «Der (6)T(1;6)(q21-23;p21.3):a specific .» *Br J Haematol*, nº 130 (2005): 229-232.
40. Druker, BJ et al. «Five years follow up of patients receiving imatinib for CML.» *N Engl J Med*, nº 355 (2006): 2408-2417.

41. El Rifai W, Ruutu T. «Prognostic value of metaphase-fluorescence in situ hybridization in follow up of patients with acute myeloid leukemia remission.» *Blood* 89(9) (1997): 3330-3334.
42. Escudier S, et al. *Blood* 81 (1993 ): 2702-2707.
43. Fagioli M, et al. *Oncogene* , nº 7 (1992 ): 1083-1091 .
44. García Miranda JL, Cruz J, Acosta MT, Carrasco JL, Otero A. «Citogenética y genética molecular en neoplasias hematológicas. Situación actual y perspectivas.» *Progresos en Diagnóstico Prenatal* 7 (1995): 503-512.
45. García Miranda, JL et al. «Citogenética y genética molecular en neoplasias hematológicas.» *Progresos en diagnóstico prenatal* 7, nº 7 (1995): 503-512.
46. Geng JP, et al. *Leukemia* , nº 7 (1993): 20-26 .
47. Germing, U et al. «Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes.» *Haematologica* 89, nº 89 (2004): 905-910.
48. Gianluca, G & Dalla-Favera, R. . *Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1977 .
49. Grimwade, et al D. *Blood*, nº 92(7) (1998): 2322-2333.
50. Gupta, R et al. «Myelodysplastic syndrome with isolated deletion of chromosome 20q; an indolent disease with minimal morphological dysplasia and frequent thrombocytopenic presentation.» *Br J Haematol*, nº 139 (2007): 265-268.
51. Haase D, et al. «Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes.» *Ann Hematol* 87 (2008): 515-526.
52. Harris, et al. «A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group.» *Blood*, nº 84 (1994): 1361-1392.
53. Harrison CJ, et al. *Cancer Genet Cytogenet*, nº 112(1) (1999): 15-20 .
54. Heim, S. & Mitelman, F. . *Cancer Cytogenetics* . New York: John Wiley and Sons, 1995.
55. Howe, RB et al. «The WHO classification of MDS does make a difference.» *Blood*, nº 103 (2004): 3265-3270.
56. Irving, JA et al. «Elemento of caution: a case of reversible cytopenias associated with excessive zinc supplementation.» *CMAJ*, nº 169 (2003): 129-131.

57. Isabelle, Miles. 2010. <http://chem4513.pbworks.com/The-Evolution-of-Cancer-Treatments> (último acceso: 2010).
58. Jaffe, A et al. «Pathology and genetics of tumours of the haematopoietic system and lymphoid tissues.» Editado por IARCPress. 2001.
59. Jenkins R, et al. *Blood* 79 (1992): 3307-3315.
60. Jensen, MK et al. «Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area.» *Eur J Haematol*, nº 65 (2000): 132-139.
61. JM Bennett, et al. «Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group.» *J. Clin. Pathol.* 42 (6) (1989): 567-84.
62. Johansson, P et al. «Epidemiology of the myeloproliferative disorders.» *Semin Thromb Hemost*, nº 32 (2004): 171-173.
63. Joss S, et al. *Hum Mol Genet*, nº 1 (1992): 625-632 .
64. Ketterling RP, Wyatt WA et al. «Primary mielodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of FISH panel testing and M-FISH.» *Leuk Res* 26 (2002): 235-240.
65. Killick S, et Al. «Outcome of biphenotypic acute leukaemia.» *Haematologica*, 1999: 699-706.
66. Kurzrock, R et al. «BCR rearrangement -negative chronic myelogenous leukemia revisited.» *J Clin Oncol*, nº 19 (2001): 2915-2926.
67. Landis, J.R.et al. «The measurement of observer agreement for categorical data.» *Biometrics*, nº 33 (1977): 159-174.
68. Lee HR, Oh B. «Cytogenetic features of 5q deleion and 5q-syndrome in myelodisplastic syndrome in Korea; marker chromosomes proved to be chromosome 5 with interstitial deletion by fluorescence in situ hibridation.» *Cancer Genet Cytogenet* 203(2) (2010): 93-202.
69. List A, et al. «Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes.» 352 (2005): 549-557.
70. Lukes-Collins. «Tumors of the Haematopoietic System.» *AFIP*, 1992.
71. Mahon, FX. *Blood*, nº 96 (2000): 1070-1079.
72. Makishima H, Rataul M. «FISH and SNP-A karyotiping in myelodisplastic syndromes:improving cytogenetic detection of

del(5q), monosomy 7, del(7q) trisomy 8 and del (20q).» *Leuk Res*, n° 34(4) (2010): 447-453.

73. Malcovati, L et al. «Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making.» *J Clin Oncol*, n° 23 (2005): 7594-7603.
74. Mallo M, Arenillas L et al. «Fluorescence in situ hybridation improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetics evidence of 5q-.» *Haematologica* 93 (2008): 1001-1008.
75. Marchioli, R et al. «Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera.» *J Clin Oncol*, n° 3 (2005): 2224-2232.
76. Marcussi, G et al. «Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): A cancer and leukemia group b study.» *J Clin Oncol*, n° 23 (2005): 5705-5717.
77. Marschalek R, et al. *Leukemia and Lymphoma*, n° 27 (1997): 417-428.
78. McClure, RF et al. «Isolated isochromosome 17q; a distinct type of mixed myeloproliferative disorder /myelodysplastic syndrome with an aggressive clinical course.» *Br J Haematol*, n° 106 (2005): 445-454.
79. McMullin, MF et al. «Guidelines for diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis.» *Br J Haematol*, n° 130 (2005): 174-195.
80. Melo, JV et al. «CML as a model of disease evolution in human cancer.» *Nat Rev Cancer*, n° 7 (2007): 441-453.
81. Mesa, RA et al. «Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment.» *Leuk Res*, n° 31 (2007): 737-740.
82. Miles, Isabelle.
83. Mitelman F, et al. *Genes Chrom Cancer*, n° 5 (1992): 57-66 .
84. Mitelman y Heim. John Wiley & Sons, Inc., 1995.
85. Mozziconacci MJ, et al. *Leukemia*, n° 13(6) (Jun 1999 ): 862-868

86. Mullier F, Daliphard S. «Morphology, cytogenetics, and survival in myelodysplasia with del (20q) or ider(20q):a multicenter study.» *Ann Hematol*, 2011.
87. Najfeld V, et al. *Bone Marrow Trans* , n° 19 (1997): 829-834 .
88. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. «Summary and description of a working.» *Cancer*, n° 49 (1982): 2112.
89. Ni, H et al. «Studies of the site and dsitribution of the CD34+ cells in idiopatic myelofibrosis.» *Am J Clin Pathol*, n° 123 (2005): 833-839.
90. P Liu, et al. *Science*, 1993: 1041-1044.
91. Pandolfi PP, et al. *EMBO Jour* 11 (1992 ): 1397-1407 .
92. Pitchford CW, Hettinga AC. «FISH testing for -5/7q, -7/7q, +8 and del(20q)in primary myelodisplastic syndrome correlates with conventional cytogenetics in the setting of an adequate study.» *Am J Clin Pathol*, n° 133(2) (2010): 260-264.
93. Rappaport, H et al. «Tumors of the Haematopoyetic System.» (AFIP) 1966.
94. Reilly, JT et al. «Cytogenetic and moleculargenetic aspects of idiophatic myelofibrosis.» *Acta Haematol*, n° 108 (2002): 113-119.
95. Remstein E, et al. *Br J Haematol* , n° 110 (2000 ): 856-62 .
96. Rigolin GM, et al. «Clinical importanceof intertogenetics detectin.g occult chromosome lesions in myelodisplastic syndromes with normal karyotype.» *Leukemia* 15 (2001): 1841-1847.
97. Romeo M, Chauffaille ML et al. «Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodisplastic syndrome patients.» *Leuk Res* 26 (2002): 993-996.
98. Rossbach, HC et al. «Familial infantile myelofibrosis as an autosomal recessive disorder: preponderance among children from Saudi Arabia.» *Pediatr Hematol Oncol* , n° 23 (2006): 453-454.
99. Royer-Pokora B, Trost D. «Delineation by molecular cytogenetics of 5q deletion breakpoints in myelodiysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.» *Cancer Genet Cytogen*, n° 167 (1) (May 2006): 66-69.
100. Rubnit JE, et al. «11q23 rearrangements in acute leukemia.» *Leukemia* 10 (1996): 74-82.

101. Rubnitz, JE et al. «Favorable impact of the t(9;11) in childhood acute myeloid leukemia.» *J Clin Oncol* 20, n° 20 (2002): 2302-2309.
102. S.Kargen, Basel. «ISCN 1995: An International System for human cytogenetic nomenclature.» Editado por Mitelman F. 1995.
103. Shali W, Helias C. «Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias:conventional cytogenetics, FISH, and multiplex FISH.» *Cancer Genet Cytogenet*, n° 168(2) (2006): 133-145.
104. Shepherd, PC et al. «Haematological classification of the myeloid leukaemias.» *Baillieres Clin Haematol*, n° 1 (1987): 887-906.
105. Siebert R, et al. *Blood* , n° 91 (1998 ): 948-90 .
106. Siebert, et al. *Blood* 91 (1998): 948-990.
107. Sinclair PB, et al. *Blood* , n° 95 ( 2000): 738-43.
108. Slovak, ML et al. «21q22 balanced chromosome aberrations in therapy related hematopoietic disorders:report from an international workshop.» *Cancer*, n° 33 (2002): 379-394.
109. Spetch, L et al. «Corebinding factors in haematopoiesis and leukemia.» *Nat Rev Cancer*, n° 2 (2002): 502-513.
110. Swerdlow, SH et al. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press, 2008.
111. Szpurka, H et al. «Refractory anemia with ringed sideroblast associated with marked thrombocytosis.» *Bood*, n° 108 (2006): 2173-2181.
112. Tanner M, et. al. *Cancer Res* , n° 54(16) (1994 ): 4257-4260.
113. Tefferi, A et al. «Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms.» *Leukemia*, 2008: 14-22.
114. Tefferi, A et al. «Myelofibrosis with myelosis metaplasia.» *N Eng J Med*, n° 342 (2000): 1255-1265.
115. Thiele, J et al. «Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic mieloproliferative disorders:a forgotten pearl.» *Best Pract Res Clin Haematol*, n° 19 (2006): 413-437.

116. Vance GH, Kim H. «Utility of interphase FISH to stratify patients into cytogenetic risk categories at diagnosis of AML in an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) clinical trial (E1900).» *Leuk Res*, nº 31(5) (2007): 605-609.
117. Vardiman, JW. «Haemopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes.» *Haematology Am Soc HAematol Educ Program*, 2006: 199-204.
118. Verbugh, E et al. «A new disease categorization of low grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and displasia in one versus more lineage improves on the WHO classification.» *Leukemia*, nº 21 (2007): 668-677.
119. Verburgh, E et al. «A new disease categorization of low grade myelodysplastic syndromes based on the expression of cytopenia and displasia in one versus morethan one lineage improves of the WHO classification .» *Leukemia* , nº 21 (2007): 668-677.
120. Virgili A, et al. «Genomic amplification of BCR/ABL1 and a region downstream of ABL1 in chronic myeloid leukaemia: a FISH mapping study of CML patients and cell lines.» *Molecular Cytogenetics*, septiembre 2010: 3-15.
121. Wells RA, et al. *Nat Genet* 17(1) (Sep 1997 ): 109-113 .
122. Winslow. <http://teresewinslow.com/>. Scientific and Medical Illustrations de 2010.
123. [www.gleevec.com](http://www.gleevec.com). 2011. <http://www.gleevec.com>.
124. Yang W, Stotler B. «FISH analysis in addition to G-band karyotyping:utility in evaluation of myelodysplastic syndromes?» *Leuk Res* 34(4) (Apr 2010): 420-425.
125. Yilmaz Z, Sahin F et al. «Conventional and molecular cytogenetics findings of myelodysplastic syndrome patients.» *Clin Exp Med* 5 (2005): 55-59.
126. Yoshida H, et al. *Genes, Chromosomes and Cancer* , nº 12 (1995 ): 37-44 .
127. Zeidler R, et al. *Genes Chromosomes Cancer*, nº 9 (1994): 282-287 .
128. Zou YS. «Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for ERG1 to detect deletion 5q in hematological disorders and to

- assess response to treatment with lenalidomide.» *Leuk Res* 31(9) (2007): 1185-1189.
129. Zou YS, Fink SR et al. «Efficacy of conventional cytogenetics and FISH for EGR1 to detect deletion 5q in haematological disorders and to asses response to treatment with lenalidomide.» *Leuk res* 31 (2007): 1185-1189.



Dra. Ana Baroni Luengo  
Sección de Citogenética  
Departamento de Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Hospital Universitario de Canarias  
Tenerife- España  
Tel. 00 34 693765765  
Fax. 00 34 922319279  
[anabaroni@yahoo.es](mailto:anabaroni@yahoo.es)