

# DIAGNÓSTICO INTEGRADO DE LEUCEMIAS AGUDAS

## Impacto Terapéutico y Prognóstico

**Pedro Horna, M.D.**  
**Hematopatólogo**

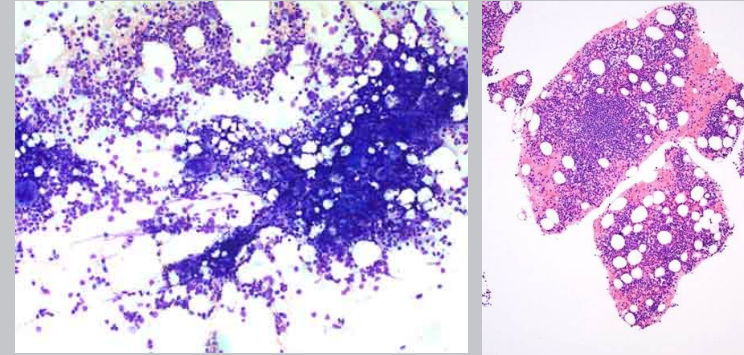
**H, Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute**  
**TAMPA, FLORIDA**



# Diagnóstico Integrado de Leucemias Agudas

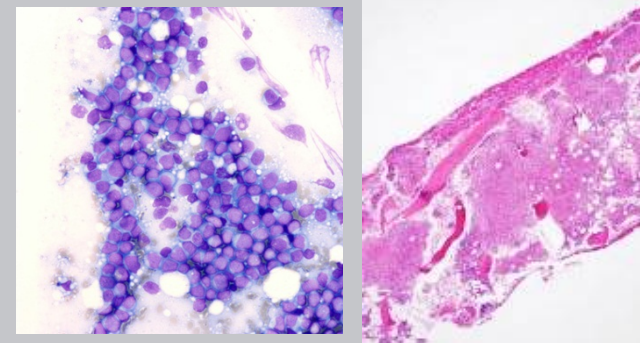
## Aspirado de médula osea

- **Frotis (Wright-Giemsa)**
- **Sección de coágulo (hematoxilina-eosina)**
- Análisis cromosómico convencional
- Citometría de flujo
- FISH
- Estudio de mutaciones genéticas



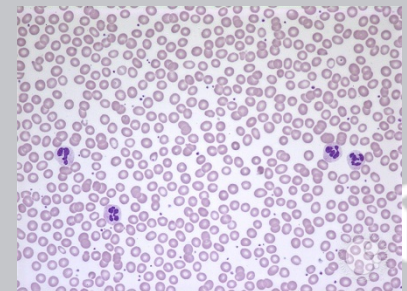
## Biopsia de médula ósea

- **Impresión en slide (Wright-Giemsa)**
- **Sección de biopsia decalcificada (hematoxilina-eosina)**
- Immunohistoquímica



## Muestra de sangre periférica

- **Frotis (Wright-Giemsa)**
- Muestra alternativa para estudios auxiliares.



# Fluxograma de Diagnóstico de Leucemias Agudas

## DÍA 1

- Evaluación de frotis de aspirado, frotis de sangre e impresión de biopsia (Wright-Giemsa).
- Evaluación de citometría de flujo STAT.
- Hematopatólogo responsable de revisar historia clínica y ordenar estudios auxiliares apropiados.

## DÍA 2

- Evaluación de secciones de biopsia y coágulo de aspirado (H&E).

## DÍA 3-7

- **REPORTE DE PATOLOGÍA INTEGRADO: Aspirado, biopsia, sangre, estudios auxiliares.**

# Evaluación inicial para iniciar tratamiento en pacientes con leucemias agudas

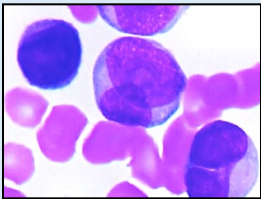
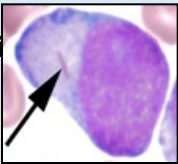
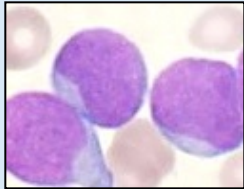
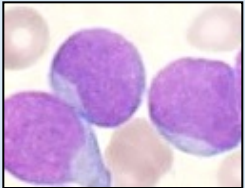
**Evaluación microscopica del frotis de aspirado de médula o frotis de sangre + Citometría de Flujo (STAT)**

**Leucemia aguda promielocítica**

**Leucemia mieloide aguda (no promyelocítica)**

**Leucemia T linfoblástica aguda**

**Leucemia B linfoblástica aguda**

Leucemia Aguda promielocítica	Leucemia mieloide aguda (no promielocítica)	Leucemia B linfoide	Leucemia T linfoide
<p><b>Morfología:</b> Núcleo bilobado, gránulos citoplasmáticos primarios, múltiples bastos de Auer.</p>  <p><b>Citoquímica:</b> Mieloperoxidasa (+)</p> <p><b>Citometría de Flujo:</b> CD34(-) HLADR(-) CD117(+) MPO(+) CD13(+) CD33(+) CD11b(-) CD11c(-)</p> <p><b>FISH / Citogenética:</b> t(15;17)(q24;q22) or variantes</p>	<p><b>Morfología:</b> Variable, blastos grandes indiferenciados o con diferenciación granulocítica, monocítica u otro. A veces displasia</p> <p><b>Bastones de Auer, pero diagnosticos.</b></p>  <p><b>Citoquímica:</b> Mieloperoxidasa (+/-), diagnóstico si es positiva.</p> <p><b>Citometría de Flujo:</b> Variable expresión de antígenos mieloides, megacariocíticos o eritroides: CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD41, CD64, CD61</p> <p><b>FISH / Citogenética:</b> Variable</p>	<p><b>Morfología:</b> Variable, blastos generalmente pequeños, sin evidencia de diferenciación.</p>  <p><b>Citoquímica:</b> Mieloperoxidasa (-),</p> <p><b>Citometría de Flujo:</b> CD19(+)</p> <p>La mayoría CD10(+), inmunoglobulina (-)</p> <p><b>Expresión variable de antígenos de inmadurez</b> TdT, CD34</p> <p><b>FISH / Citogenética:</b> Variable</p>	<p><b>Morfología:</b> Variable, blastos generalmente pequeños, sin evidencia de diferenciación.</p>  <p><b>Citoquímica:</b> Mieloperoxidasa (-),</p> <p><b>Citometría de Flujo:</b> CD3 citoplasmático (+) CD7(+)</p> <p><b>Expresión variable de antígenos de inmadurez</b> TdT, CD34, CD1a, CD99</p> <p><b>FISH / Citogenética:</b> Variable</p>

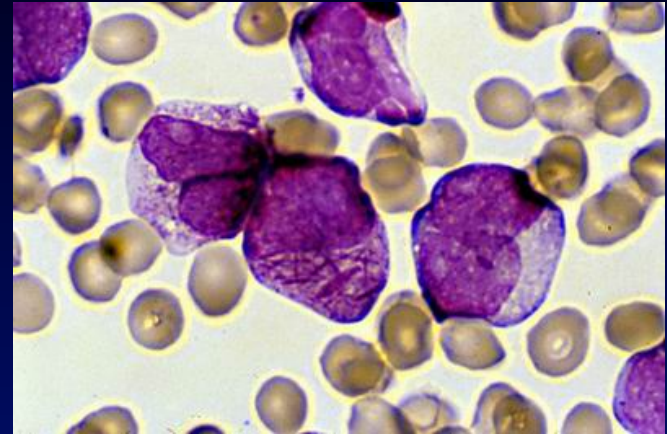
## Otras patologías y condiciones con células blasticas o de apariencia inmadura en sangre y médula ósea

- Linfomas y leucemias maduros de alto grado:
  - Linfoma de Burkitt
  - Linfoma blástico de células del manto
  - Leucemia agresiva de células NK
  - Linfoma B difuso de células grandes
  - Otros.
- Mieloblastos menos de 20%: considerar síndrome mielodisplástico de alto grado.
- Condiciones reactivas o regenerativas con expansiones benignas de células B inmaduras o mieloblastos: post-transplante de médula, factores de crecimiento, post quimioterapia, pacientes pediátricos, infecciones severas.
- Neoplasias no hematopoiéticas con metástasis a la médula ósea:
  - Carcinoma o sarcoma pobremente diferenciado
  - Tumor neuroendocrino
  - Tumor de células germinales.

# Leucemia aguda Promielocítica

t(15;17)(q24;q22); *PML-RARA*

- Prognóstico favorable.
- Mortalidad temprana antes de iniciar tratamiento por desarrollo de coagulación intravascular diseminada.
- Tratar inmediatamente con ATRA ante la sospecha morfológica de leucemia aguda promielocítica, y antes de confirmación por citogenética.

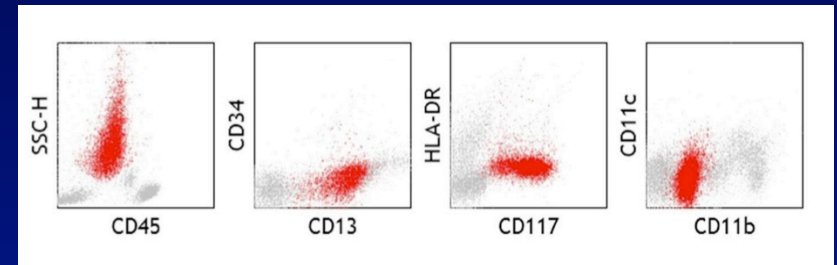


- **Citometría de flujo:**

- MPO(++), CD117(+), HLA-DR(-), CD34(-), side scatter (+).
- CD11b(-), CD11c(-).

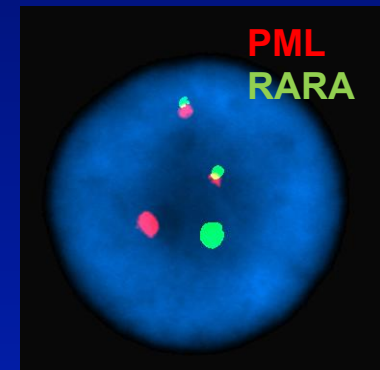
- **Estudios confirmatorios:**

- **FISH de fusión para PML-RARA.**
- FISH de separación para *v-RARA*
- RT-PCR para PML-RARA



- **Translocaciones variantes:**

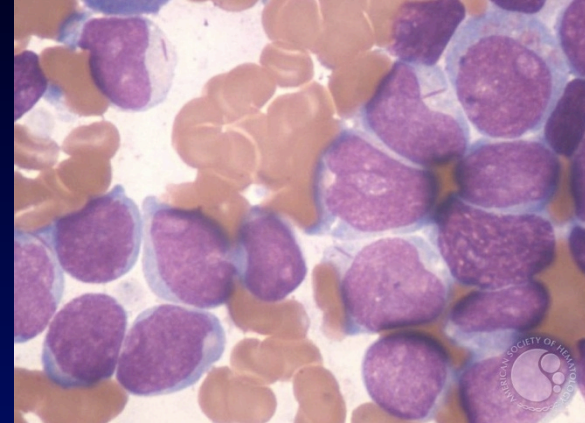
- t(11;17)(q23;q12);ZBTB16-RARA
- t(5;17)(q35;q12);NPM1-RARA
- t(17;17)(q35;q11);STAT5B-RARA
- Translocaciones complejas entre PML, RARA y un cromosoma adicional.
- Inserciones submicroscópicas de RARA en PML



# Leucemias mieloides agudas con translocaciones de subunidades de “core binding factor”

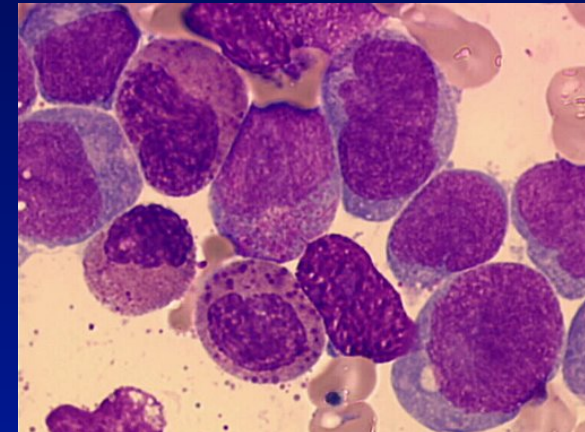
## **t(8;21)(q22;q22); RUNX1(CBF $\alpha$ )-RUNX1T1**

- Leucemia con maduración granulocítica.
- Inclusiones citoplasmáticas rosa-salmón.
- Bastones de Auer solitarios, largos y delgados.



## **inv16 o t(16;16)(p13.1;q22); CBF $\beta$ -MYH11**

- Leucemia con maduración mielomonocítica.
- Eosinófilos inmaduros atípicos con gránulos metacromáticos

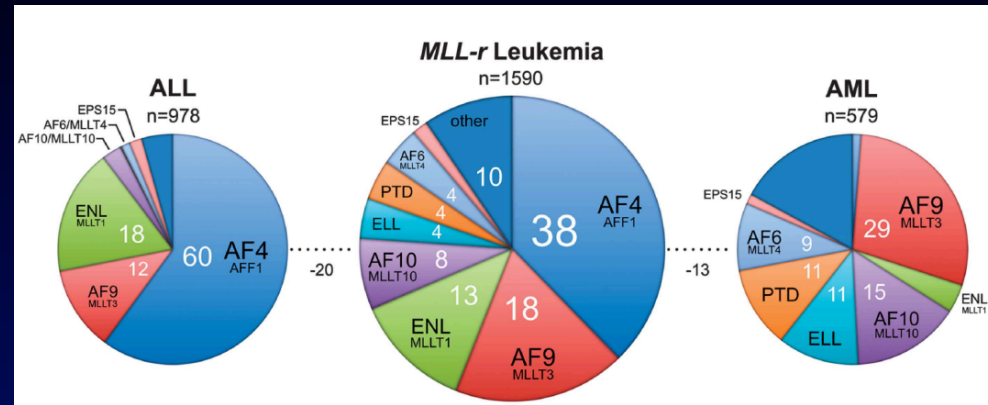


- Relativamente buen pronóstico
- Mutaciones en KIT confieren mal pronóstico
- inv16 puede ser difícil de detectar por cariotipo convencional



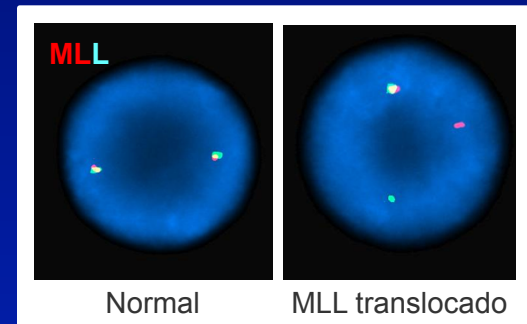
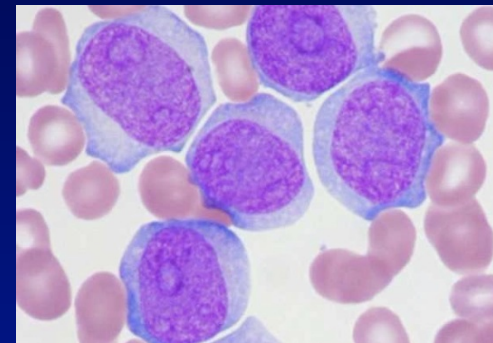
# Leucemias con translocaciones de MLL / KMT2A (11q23)

- Se han descrito mas de 120 diferentes translocaciones involucrando MLL y varios otros genes.
- Las translocaciones mas frecuentes son:
  - t(4;11) AF4-MLL**, generalmente con fenotipo de leucemia aguda B linfoblástica.
  - t(9;11) AF9-MLL**, generalmente con fenotipo de leucemia mieloide aguda con diferenciación monocítica.



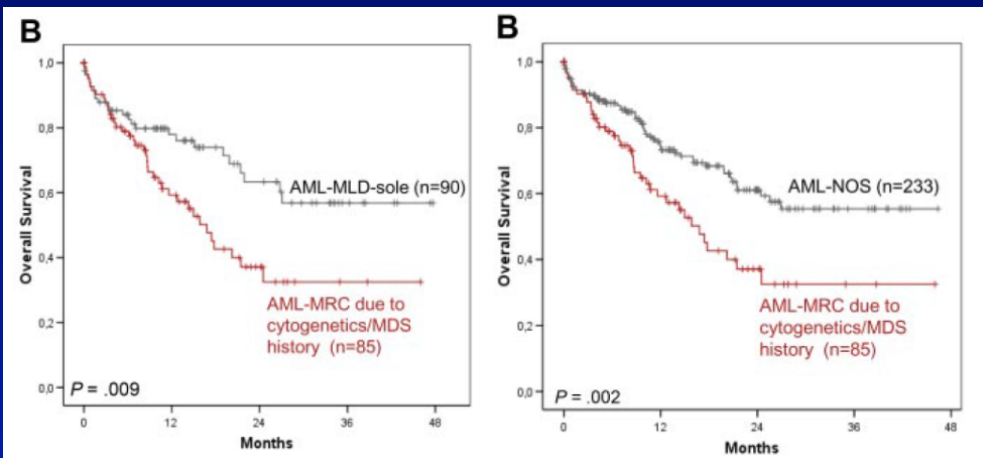
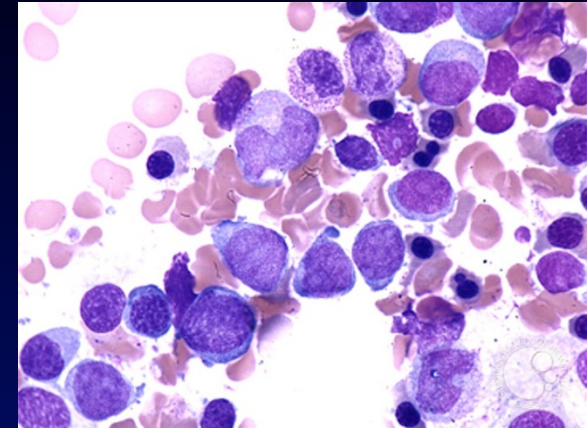
Meyer C, et al. Leukemia 2013;27:2165

- t(4;11) y t(9;11) detectables por cariotipo convencional.
- 30% de otras translocaciones de 11q23 son submicroscópicas y requieren FISH de separación de MLL para ser detectadas.
- Leucemias con translocacion de MLL son de pronóstico desfavorable.
- t(9;11) es considerada separadamente como leucemia de riesgo intermedio.



# Leucemias mieloides agudas con cambios relacionados a mielodisplasia

- Prognóstico desfavorable
- Clasificación de la OMS (2008) considera **tres posibilidades para diagnóstico**
  - ✓ Pacientes con historia de síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo que evolucionan con 20% o más blastos.
  - ✓ Leucemias agudas nuevas con displasia morfológica en >50% de elementos en al menos 2 lineages. (???)
  - ✓ Leucemias agudas nuevas con alteraciones cromosómicas asociadas a síndrome mielodisplásico.
- En pacientes con leucemias nuevas y cariotipo normal, la supervivencia no es afectada en la presencia o ausencia de mielodisplasia morfológica.



Miesner M, et al. Blood 2010;116:2742.

**Table 8. Cytogenetic abnormalities sufficient for diagnosis of AML with myelodysplasia-related changes when 20% or more PB or BM blasts are present**

**Complex karyotype\***

**Unbalanced abnormalities**

–7 or del(7q)  
 –5 or  
 i(17q) or t(17p)  
 –13 or del(13q)  
 del(11q)  
 del(12p) or t(12p)  
 del(9q)  
 idic(X)(q13)

**Balanced abnormalities**

t(11;16)(q23;p13.3)†  
 t(3;21)(q26.2;q22.1)†  
 t(1;3)(p36.3;q21.1)  
 t(2;11)(p21;q23)†  
 t(5;12)(q33;p12)  
 t(5;7)(q33;q11.2)  
 t(5;17)(q33;p13)  
 t(5;10)(q33;q21)  
 t(3;5)(q25;q34)

\*Three or more unrelated abnormalities, none of which are included in the "AML with recurrent genetic abnormalities" subgroup; such cases should be categorized in the appropriate cytogenetic group.

†These abnormalities most commonly occur in therapy-related disease, and therapy-related AML should be excluded before these are used as evidence for diagnosis of AML with myelodysplasia-related changes.

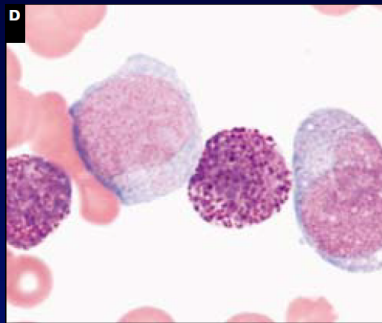
Vardiman J, et al. Blood 2009;114:937

# Leucemias mieloides agudas con cambios asociados a mielodisplasia

## Entidades independientes

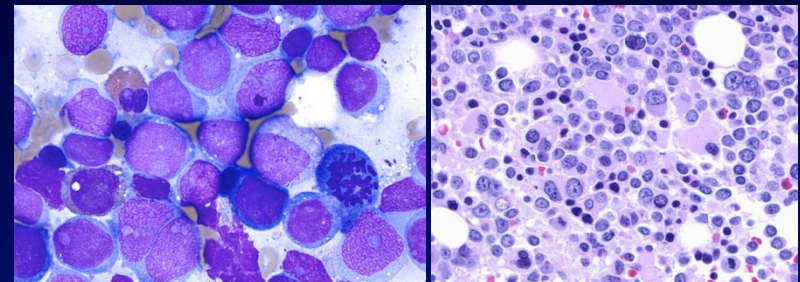
**t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214**

- Basofilia



**inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1**

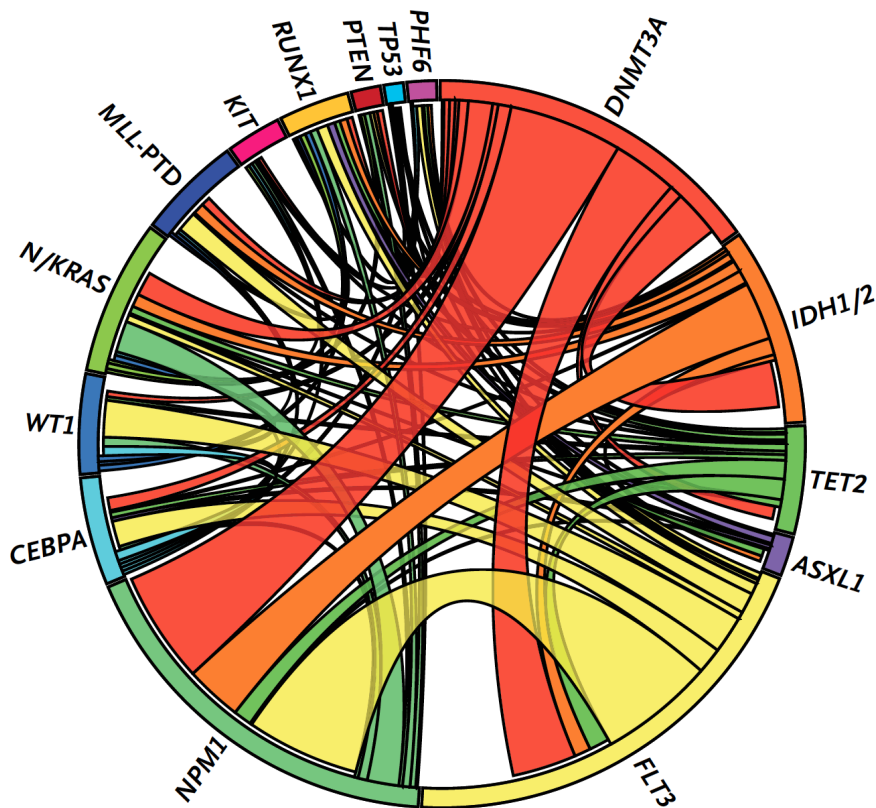
- Trombocitosis, megacariocitos monolobados.



- Mielodisplasia multilineage.
- Alteraciones detectables por cariotipo convencional.
- Prognostico desfavorable

# Mutaciones en Leucemias Mieloides Agudas

- ~50% de casos de leucemia aguda mieloide no tienen alteraciones cromosómicas recurrentes de significado pronóstico
- Estudios de secuenciamiento genético de nueva generación han detectado mutaciones en un número limitado de genes (20-30), en >95% de leucemias mieloides agudas.



Patel JP, et al. NEJM 2012;366:1079

## Señales de transducción

- **FLT3**
- **N/K-RAS**
- **KIT**

## Señales de diferenciación

- **NPM1**
- **CEBPA**
- **MLL**
- **RUNX1**

## Regulación epigenética

- **DNMT3A**
- **IDH1/2**
- **ASXL1**
- **TET2**

## Genes supresores de tumores

- **TP53**
- **WT1**

# EVALUACIÓN PROGNÓSTICA DE LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

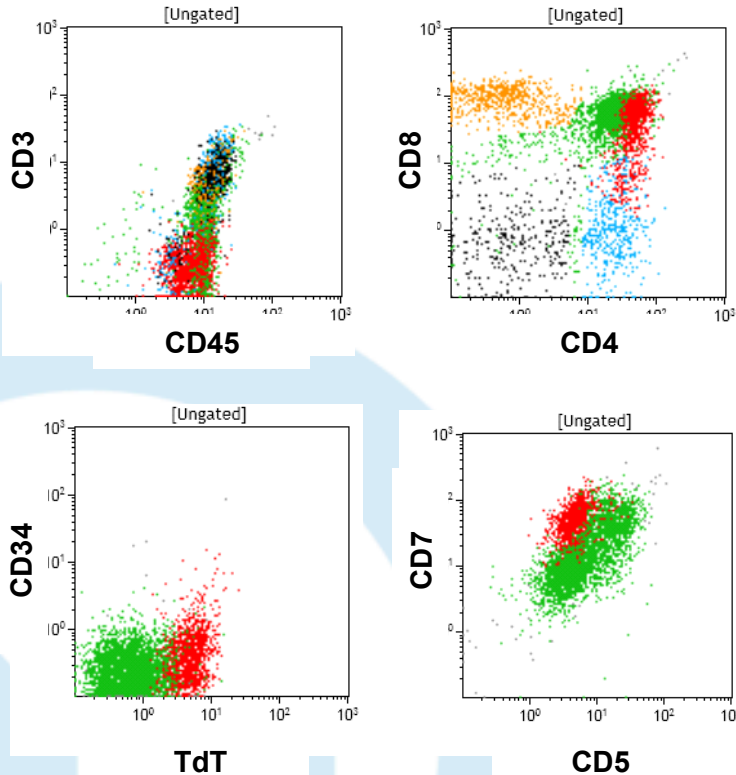
RIESGO	CARIOTIPO ANORMAL	CARIOTIPO NORMAL	RESPUESTA A 7+3
<b>FAVORABLE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(15;17)</li> <li>inv(16) o t(16;16) sin mutacion en KIT</li> <li>t(8;21) sin mutation en KIT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mutaciones de <b>CEBPA biallelicas</b></li> <li>Mutacion en <b>NPM1 en la ausencia de mutaciones en FLT3-ITD</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remision completa: 80-90%</li> <li>Recidiva: 35-40%</li> </ul>
<b>INTERMEDIO I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>inv(16) or t(16;16) con mutacion en KIT</li> <li>t(8;21) con mutation en KIT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Otras mutaciones o mutaciones no detectables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remision completa: 50-80%</li> <li>Recidiva: 50-60%</li> </ul>
<b>INTERMEDIO II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(9;11)</li> <li>Otras anormalidades cromosomicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacion en <b>FLT3-ITD</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remision completa: 40-60%</li> <li>Recidiva: 70-80%</li> </ul>
<b>DESFAVORABLE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Otras translocaciones de <b>11q23</b></li> <li>Alteraciones cromosomicas asociadas a mielodisplasia:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-5q, -7q, <b>cariotipo complejo, cariotipo monosomal</b></li> <li>inv(3) o t(3;3)</li> <li>t(6;9)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutaciones en <b>p53</b></li> <li>Otras mutaciones??? <b>RUNX1, TET2, ASXL1, MLL-PTD, PHF6, DNMT3A</b>. Quizas en combinacion con mutaciones es FLT3-ITD y/o en la ausencia de mutaciones en CEBPA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remision completa: &lt;50%</li> <li>Recidiva: &gt;90%</li> </ul>

- Acute Myeloid Leukemia. **NCCN Guidelines** 2015. [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
- Estey, EH. **Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk stratification and management**. Am J Hematol 2014;89:1064
- Dohner H, et al. **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet**. Blood 2010;115:453.
- Patel JP, et al. **Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia**. NEJM 2012;366:1079.
- Grossman V, et al. **A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations**. Blood 2012;120:2963.

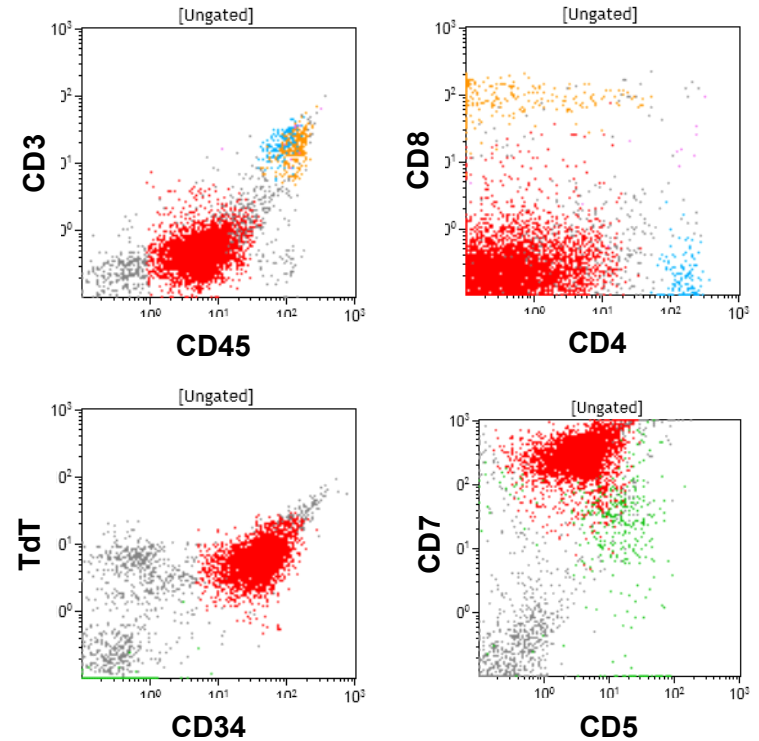
# Diagnóstico de Leucemia Aguda T Linfooblástica

- Diagnóstico de leucemia aguda T linfooblástica en sangre o médula ósea consiste en la demostración de células T inmaduras.
- La leucemia aguda T linfooblástica comunmente se presenta como masa mediastinal (linfoma T linfooblástico). En esta escenario, la citometría de flujo es muy útil para distinguir células T inmaduras benignas de timo vs. linfoblastos T malignos.

## Timocitos benignos



## Linfoma/leucemia T linfooblástica



# Factores Prognósticos en Leucemia Aguda T Infioblástica

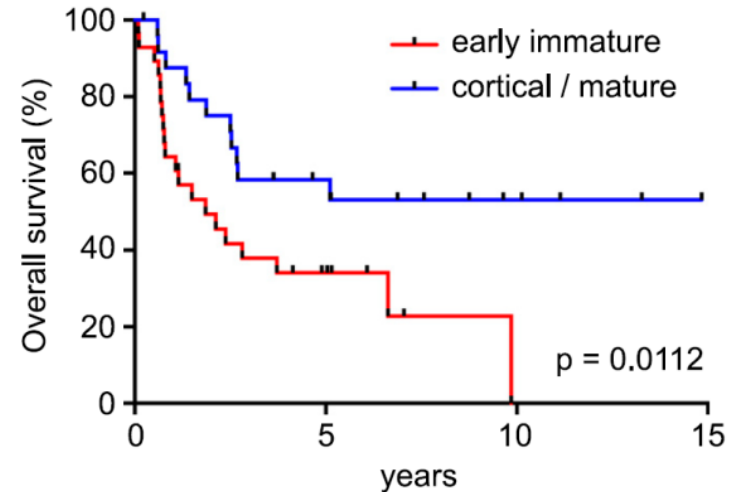
## • Citometría de Flujo

Coustan-Smith E, et al. Lancet Oncol 2009;10:147

- **Fenotipo de timocitos corticales (90-95%)**  
**Buen pronóstico**  
CD1a(+), CD5(+), CD4(+) o CD8(+) o CD4(+)/CD8(+)
- **Fenotipo de Precursor T temprano (5-10%)**  
**Mal pronóstico**  
CD1a(-) CD8(-) CD5 (bajo/-) y...presencia de uno o mas marcadores de inmadurez or mieloides: CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b

## • Mutaciones Prognósticas

- **Favorables**
  - Mutaciones en NOTCH1 / FBXW7 (60%)
  - Deleciones homocigotas de 9p21-22 CDKN2A/2B
- **Desfavorables**
  - Ausencia de deleción bi-alelica de TCRG
  - Mutaciones en DNMT3A, IDH1/2 and RUNX1
  - Deleción 17p P53
  - LOH 6q16
  - mutaciones o deleciones en N-RAS / K-RAS / PTEN



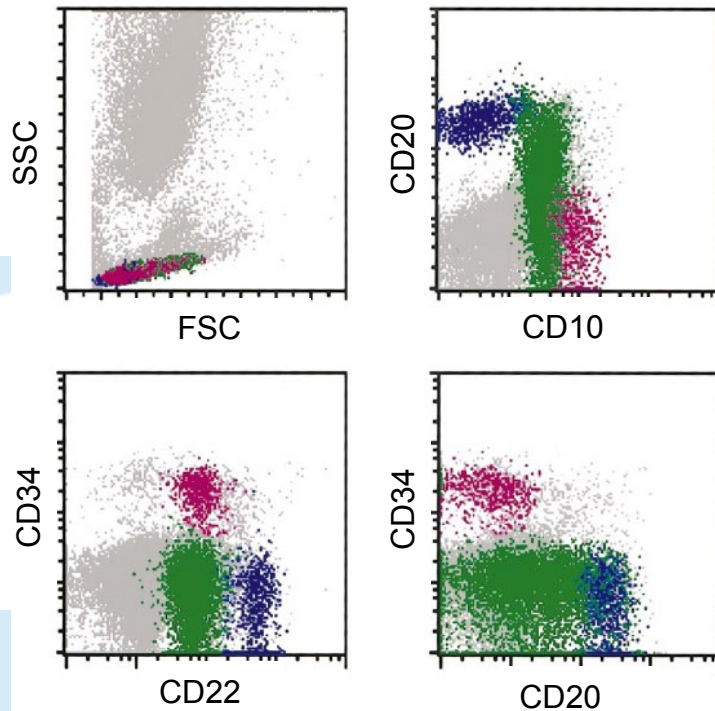
Van Vlierberghe P, et al. Blood 2013;122:74

Van Vlierberghe P, et al. Blood 2013;122:74  
Trinquand A, et al. JCO 2013;31:4333  
Bonn BR, et al. Blood 2013;121:3153  
Grossmann V, et al. Haematologica 2011;96:1874

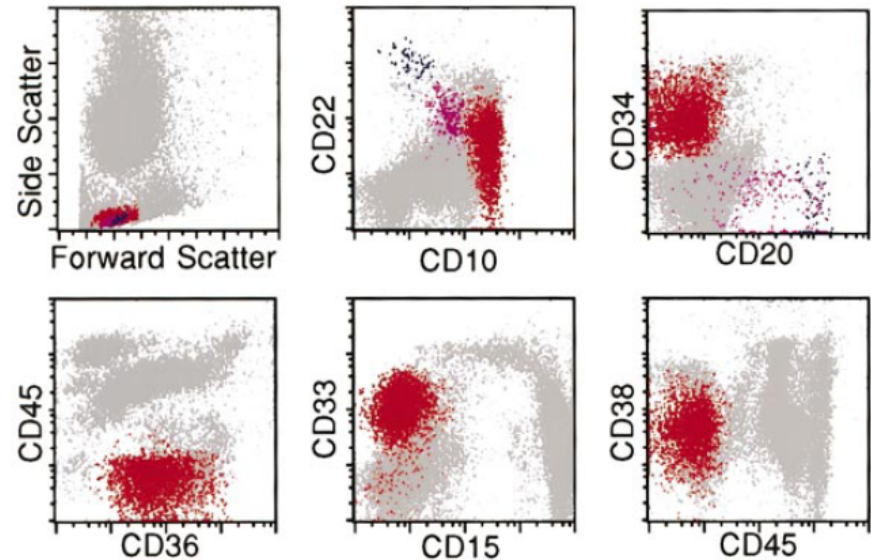
# Diagnóstico de Leucemia Aguda B Infolblástica

- La maduración de células B ocurre normalmente en la médula ósea.
- En situaciones reactivas y regenerativas puede haber un incremento marcado de células B inmaduras benignas (hematogonas).
- Citometría de flujo es esencial para distinguir hematogonas benignas vs. linfoblastos B malignos.

## Hyperplasia benigna de linfocitos B inmaduros



## Linfoma/leucemia B linfoblástica





# Evaluación Prognóstica en Leucemia aguda B linfoblástica

## Estudios de FISH

### Mal Prognóstico

t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1

t(v;11q23); MLL-v

iAMP21 (misma prueba que para ETV6-RUNX1)

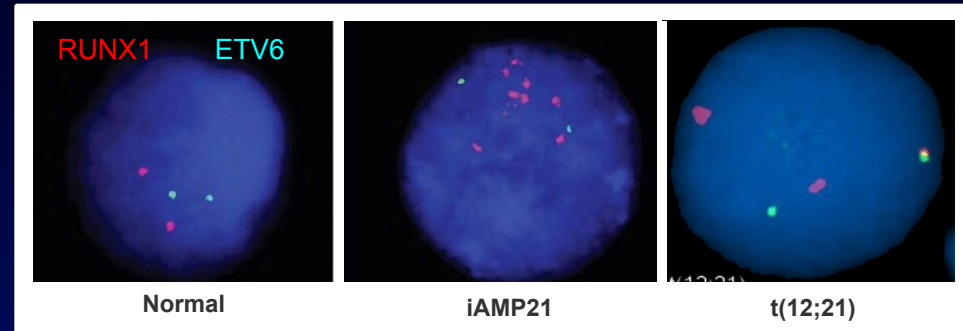
Hypodiploidia (<44 cromosomas) (CEP 4,10,17)

### Buen pronóstico

t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1

t(1;19); TCF3-PBX1

Hyperdiploidia (51-65 cromosomas) (CEP 4, 10, 17)



# Otros factores pronósticos en leucemia aguda B linfoblástica

~30% de leucemias agudas B linfoblásticas no tienen una alteración cromosómica pronóstica

## •Perfil de expresión genética similar a casos con t(9;11). “BCR-ABL1-like”.

Den Boer, NL, et al. *Lancet Oncol* 2009;10:125

- Pronóstico adverso.
- Test no estandarizado.

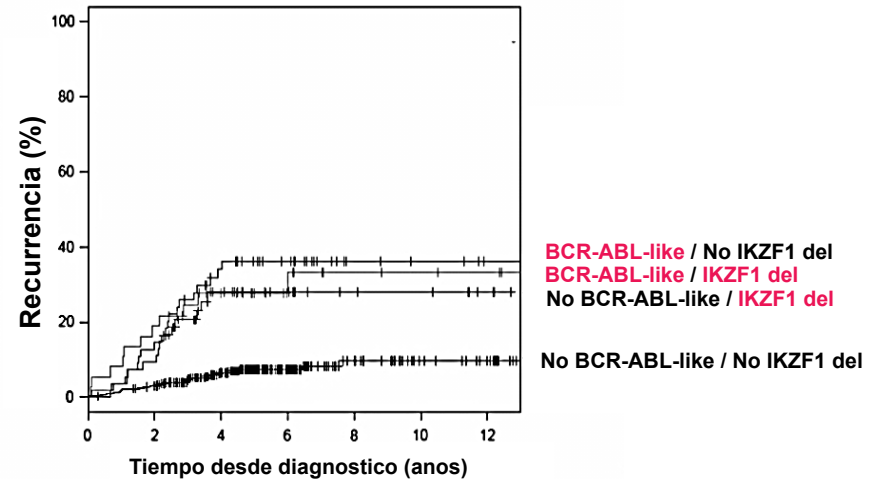
## • del17p12.2 IKZF1 (“ikaros”)

Mullighan C, et al. *NEJM* 2009;360:470.

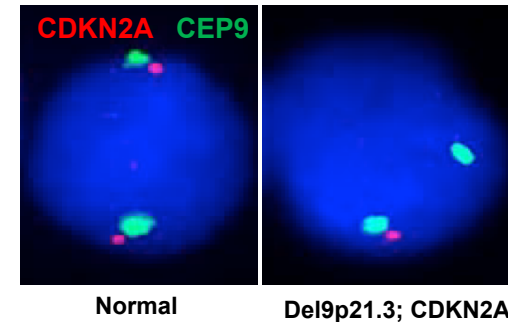
- Pronóstico adverso
- Detección por SNP array (costoso).
- Detección por FISH todavía no esta disponible comercialmente.

## •Del9p21.3 CDKN2A

- Pronóstico adverso (controversial).
- FISH disponible.



Van der Veer, A, et al. *Blood* 2013;122:2622



**Citología: frotis de sangre y aspirado  
+  
Citometría de Flujo (STAT)**

**Leucemia aguda promielocítica**

**FISH: t(15;17)**

PCR: PML-RARA  
FISH: v-RARA  
Cariotipo

**Leucemia mieloide aguda  
(no promyelocítica)**

**Cariotipo**  
**FISH: 11q23, inv16**  
**NGS: KIT, NPM1, FLT3-ITD, CEBPA**

FISH: t(8;21), inv3/t(3;3),  
t(6;9), t(1;22)  
-5q, -7q, -20q, -17p

NGS: RUNX1, TET2, ASXL1,  
DNMT3A, P53, MLL-PTD,  
PHF6...

**Leucemia T linfoblástica aguda**

**Citometría de flujo  
(cortical vs. precursor T temprano)**

NGS: NOTCH, FBXW7  
DNMT3, IDH1/2,  
RUNX1  
K/N-RAS, PTEN

SNP array: del17p,  
del9p21-22, LOH6q16,  
DBA TCRG

**Leucemia B linfoblástica aguda**

**FISH: t(9;22), v-11q23,  
t(12;21), t(1;19), CEP2,10,17**

FISH: del CDKN2A (?)  
del IKZF1 (...)

SNP array

Perfil de expresión genética  
(?).

