

De la microscopía a la secuenciación genética: La evolución en las técnicas de diagnóstico de la Leucemia Linfóide Aguda.

From Microscopy to Genetic Sequencing: The Evolution of Diagnostic Techniques for Acute Lymphoblastic Leukemia.

Dayana Fernanda Pico Sánchez ¹, Daniela Alexandra Rosero Freire ^{2*}

¹ Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico. Ambato, Ecuador; dpico4968@uta.edu.ec.

² Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico. Ambato, Ecuador

* Correspondence: da.roserof@uta.edu.ec



RESUMEN

La Leucemia Linfóide Aguda (LLA) es una enfermedad hematológica muy heterogénea que afecta tanto a niños como adultos, cuyas tasas de curación han incrementado con el pasar de los años. Esto se debe a la evolución en las técnicas de diagnóstico, que han contribuido a realizar una detección más temprana y precisa, monitorear la evolución de la LLA y reconocer el pronóstico. El objetivo del presente artículo es proporcionar una revisión comprensiva y actualizada sobre los avances en las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la LLA. Se encontró que el diagnóstico parte de los resultados dados por las técnicas convencionales como el hemograma y el análisis de la morfología celular. Sin embargo, estas deben ser complementadas por técnicas más avanzadas como el cariotipo, Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), RT-PCR que detectan alteraciones y mutaciones a nivel molecular. Además de otras técnicas como la NGS, que, aunque aún se limitan a los laboratorios de investigación siguen brindando información útil. Estos avances han mejorado significativamente la identificación de subtipos moleculares y alteraciones genéticas, las cuales son clave para la estratificación de riesgo y el pronóstico, aunque no se puede dejar atrás a las técnicas convencionales, ya que son el punto de partida para la realización de análisis posteriores.

Palabras Clave: cariotipo convencional; FISH; hemograma; Leucemia Linfóide Aguda; NGS; RT-PCR.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a highly heterogeneous hematological disease that affects both children and adults, with cure rates that have increased over the years. This progress is attributed to advancements in diagnostic techniques, which have contributed to earlier and more precise detection, monitoring of ALL progression, and prognosis assessment. The objective of this article is to provide a comprehensive and updated review of the advances in techniques used for diagnosing ALL. It was found that diagnosis begins with results obtained from conventional techniques, such as complete blood count and cellular morphology analysis. However, these must be complemented by more advanced techniques, such as karyotyping, FISH, and RT-PCR, which detect molecular-level alterations and mutations. Additionally, other techniques like NGS, although still limited to research laboratories, continue to provide valuable information. These advancements have significantly improved the identification of molecular subtypes and genetic alterations, which are crucial for risk

stratification and prognosis. Nonetheless, conventional techniques remain indispensable as the starting point for subsequent analyses.

Keywords: conventional karyotyping; FISH; complete blood count; Acute Lymphoblastic Leukemia; NGS; RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una enfermedad hematológica muy heterogénea que abarca una variedad de neoplasias linfoides que se desarrollan a partir de células precursoras de los linajes B y T ¹. Estas neoplasias pueden presentarse principalmente como un proceso leucémico generalizado que afecta tanto la médula ósea (MO) como la sangre periférica, o pueden aparecer con infiltración localizada en los tejidos, con una afectación mínima de la MO ².

Entre los factores de riesgo de esta enfermedad, se pueden mencionar la exposición a radiación antes y después del nacimiento, mutaciones genéticas como el síndrome de Down, tratamientos con quimioterapia, infecciones virales como el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV1), el virus de Epstein-Barr (EBV), o tener un gemelo idéntico con LLA, entre otros ³. También este tipo de leucemia tiene su pico etario entre los 2 y 5 años ⁴, representando el cáncer más frecuente en pacientes pediátricos, siendo mucho menos común en adolescentes, adultos jóvenes y adultos mayores ⁵.

A nivel mundial los casos de LLA aumentaron de 49,1 mil en 1990 a 64,2 mil en el año 2017, mientras que la tasa de incidencia ajustada por edad disminuyó levemente. Es importante mencionar también que la mayor frecuencia de diagnóstico en niños y adultos jóvenes fue registrada en regiones en vías de desarrollo. Un ejemplo de ello es que >20% de los casos totales de LLA se han reportado en regiones de bajo índice socio-demográfico, mientras que en América Latina central representaron >30% ⁶.

En los últimos años la incidencia de la LLA de células B (LLA-B) ha aumentado a nivel global en comparación con el linaje de células T (LLA-T), especialmente en América Latina, debido a diversos factores como ambientes laborales que no cumplen con los estándares de control a exposiciones cancerígenas, la migración a lugares con peores condiciones ambientales, e incluso la exposición a nuevos agentes infecciosos ⁴.

En estos países las tasas de curación varían ligeramente, por ejemplo, en Chile y Argentina los porcentajes de supervivencia son de más del 70%, mientras que en México se estima que son de alrededor del 50% ⁷. En contraparte, las tasas de curación en países desarrollados superan el 90% en la mayoría de los casos infantiles y del 30 al 40% en el caso de pacientes adultos, esta significativa mejora se ha dado debido a los avances en el diagnóstico clínico y en la comprensión de la LLA ⁵.

Los métodos tradicionales de diagnóstico de la LLA han sido fundamentales tanto para la detección como para el tratamiento de la enfermedad. Desde un principio el diagnóstico de la LLA se iniciaba con el hemograma, donde se analizaban parámetros como la hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), recuento de glóbulos rojos (RBC), índices hematimétricos, conteo total de leucocitos (WBC) y plaquetas (PCT) ⁸, además de los análisis microscópicos que examinaban la morfología celular en busca de blastos y las tinciones citoquímicas, utilizadas principalmente para poder diferenciar la LLA de la leucemia mieloide aguda (LMA) ^{5,9}. No obstante, en la actualidad, estas características morfológicas rara vez son útiles para diferenciar los subtipos de la enfermedad, ya que, aunque puede detectar células leucémicas no proporcionan suficiente información para que los médicos confirmen el diagnóstico de esta enfermedad ^{10,11}.

Debido a estas limitaciones, se emplean otros métodos como la inmunofenotipificación a través de citometría de flujo o la inmunohistoquímica, cuyo objetivo es confirmar que las células leucémicas sean de origen

linfoide⁵. Asimismo, la necesidad de obtener una comprensión más amplia de la enfermedad ha impulsado el desarrollo y la aplicación de métodos enfocados en la genética, los cuales han permitido la identificación de nuevos subtipos moleculares de la LLA y el descubrimiento de nuevas alteraciones o mutaciones genéticas que predisponen al desarrollo de esta enfermedad¹².

El presente artículo tiene como objetivo proporcionar una revisión exhaustiva de la evolución que han tenido las técnicas de diagnóstico de la LLA. A través de un análisis detallado de la literatura, se busca resaltar las limitaciones de las técnicas convencionales, como el hemograma y el análisis de frotis, así como el potencial de otras metodologías, incluyendo la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y los nuevos enfoques basados en la genética. Este trabajo pretende no solo ofrecer una visión integral de la evolución del diagnóstico de la LLA, sino también subrayar la importancia de una detección temprana y precisa para mejorar los resultados clínicos en los pacientes.

Técnicas convencionales o tradicionales en diagnóstico de LLA.

Hemograma

En la gran mayoría de casos, el diagnóstico de la LLA gira en torno al hemograma completo (CBC, por sus siglas en inglés), debido a las situaciones clínicas que derivan a solicitar este análisis, además de los datos relevantes que se pueden obtener del mismo¹³. De acuerdo con los parámetros analizados en el CBC la LLA cursa con anemia normocítica normocrómica; trombocitopenia, aunque uno de cada cinco niños no presenta esta alteración. En cuanto a los glóbulos blancos estos pueden encontrarse con niveles altos, bajos o normales, siendo así que, el 50% de los niños presentan contajes de menos de 11.000 leucocitos/ μl en el hemograma inicial, el 20% tienen más de 100.000/ μl y solo el 7% presenta contajes de 200.000 células/ μl ^{3,13}. En cuanto a los adultos, los contajes de leucocitos rondan entre 30.000 a 100.000 células/ μl ¹⁴. En el frotis de sangre periférica el 90% de los pacientes suelen presentar células blásticas¹⁵.

Análisis morfológico en médula ósea o sangre periférica

En el estudio de la MO es necesario demostrar la existencia de más del 25% de linfoblastos, además la médula tiene que presentar entre otras características, la hiper celularidad con una notable sustitución de los espacios adiposos y otros componentes medulares normales por células leucémicas, también se pueden observar algunos precursores mieloides y eritroides aparentemente normales y megacariocitos normales o ausentes⁹.

Por otra parte, el análisis de la morfología de las células sanguíneas permaneció como la principal herramienta empleada en el abordaje de la leucemia aguda para distinguir si esta era de origen linfoblástico o mieloblástico¹⁶. La clasificación más aceptada respecto a la morfología celular es la planteada por la asociación FAB (Franco-América-Británica), la cual analiza las características de las células luego de ser coloreadas por la tinción de Wright¹⁷ o la tinción May-Grunwald-Giemsa¹⁵. Con estos parámetros la LLA es clasificada en 3 grupos: L1, L2 y L3, de acuerdo con el diámetro celular, la forma del núcleo, la cantidad y prominencia de los nucléolos, así como la proporción y aspecto del citoplasma⁹.

TIPO	Diámetro celular	Núcleo	Nucléolos	Citoplasma
L1	Células pequeñas y homogéneas.	Regular y redondo.	No se observan.	Escaso con leve basofilia.
L2	Células grandes y heterogéneas.	Irregular con hendiduras.	Uno o más.	Abundante con basofilia variable.

L3	Células grandes y homogéneas.	Regular, redondo u oval.	Prominentes.	Abundante con basofilia intensa. Se observan vacuolas.
-----------	-------------------------------	--------------------------	--------------	--

Tabla 1. Características morfológicas de los linfocitos en la LLA.^{9,15}

Tinciones Citoquímicas

Utilizadas para poder diferenciar la LLA de la leucemia mieloide aguda (LMA), las principales reacciones que van a servir para realizar esta diferenciación son la mieloperoxidasa y el sudan negro¹⁸, ya que los linfoblastos son completamente negativos⁹. Los linfoblastos T muestran actividad paranuclear en la esterasa inespecífica cuando se realiza en un pH ácido, con más del 75% de actividad en la fosfatasa ácida. En la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), los linfoblastos generalmente presentan una coloración distintiva con gránulos gruesos o bloques masivos en forma de anillos concéntricos. Además, es más común encontrar una reacción PAS negativa en la LLA de linaje T que en la de linaje B⁹.

Tinción		LLA	Características	LMA	Características
Mieloperoxidasa (MPO)		-	No se observa ninguna reacción.	+	Se observan gránulos de color azul turquesa en el citoplasma.
Sudan negro		-	No se observa reacción.	+	Reacciona con los lípidos presentes en los gránulos de las células, dando una coloración marrón – negra.
Esterasas inespecíficas	*ANAE	+	Positiva únicamente para linfocitos Th. Se observa de color pardo naranja.	+	Muestra positividad en la línea monocítica, con un patrón difuso e intensamente positivo en el citoplasma. La línea granulocítica es negativa.
	*ANBE	+	Positiva únicamente para linfocitos Th.	+	Positiva para la línea monocítica y es negativa o levemente positiva en la línea granulocítica. Menos sensible pero más específica que ANAE.
Esterasas específicas: Clo-roacetatoesterasa (CAE)		-	No se observa reacción.	+	Se observa de un color rojo – naranja brillante. Es específica para la línea granulocítica y negativa para la línea monocítica.
Acido periódico de Schiff (PASchiff)		+	Coloración púrpura-roja en forma de gránulos o bloques que pueden variar de tamaño (fino, mediano o grueso).	+	Se observa una coloración más difusa, entre homogénea o mixta.

*ANAE: α -naftil acetato esterasa; *ANBE: α -naftil butirato esterasa.

Tabla 2. Características diferenciales microscópicas de las tinciones citoquímicas¹⁹.

Inmunofenotipificación

Actualmente, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) las leucemias agudas se clasifican a partir del linaje, ya sea mieloide o linfoide, lo cual se determina mediante la presencia de ciertos antígenos en las células malignas²⁰. La inmunofenotipificación representa uno de los métodos más importantes para

clasificar correctamente a la LLA y para ello se utilizan dos técnicas diferentes: la inmunohistoquímica (IHQ) para el estudio de la biopsia de MO y la citometría de flujo (CF) en el análisis del aspirado medular²¹.

Inmunohistoquímica

La IHQ detecta la interacción entre el antígeno y el anticuerpo mediante un cambio colorimétrico, que puede observarse a través de un microscopio óptico o bien con marcadores de fluorescencia utilizando un microscopio con este mismo enfoque. Esta técnica se utiliza en secciones de tejidos fijados con formaldehído e incrustados en parafina, y habitualmente se emplea un único anticuerpo por sección^{15,22}. En un principio, se vio limitada por el uso de anticuerpos de baja afinidad o interpretaciones erróneas, sin embargo, actualmente y con los avances tecnológicos realizados, la IHQ es mucho más útil en el análisis de células que son demasiado frágiles como para soportar el procesamiento de la muestra usando la CF. Entre estos avances se destacan la recuperación de antígenos, implementación de equipos automatizados de tinción y la producción comercial de anticuerpos²⁰. Basándose en estos puntos, la IHQ se ha convertido en una técnica mucho más accesible y que proporciona resultados mucho más rápidos manteniendo e incluso mejorando la precisión de estos.

El primer paso en este proceso es la recuperación del antígeno, lo que implica un pretratamiento del tejido para recuperar los antígenos ocultos por el proceso de fijación y así facilitar su acceso para la unión con los anticuerpos. Posteriormente, se añade el anticuerpo primario que se va a unir al antígeno de interés, se lava el exceso de anticuerpos no unidos y se aplica el anticuerpo secundario conjugado con enzimas (como la peroxidasa de rábano picante) o con marcadores fluorescentes. En el caso de que se trate con una enzima es necesario añadir un cromógeno (por ejemplo, NovaRED) para visualizar el cambio de color en un microscopio óptico. Finalmente, se realiza una contratinción con hematoxilina seguido de un proceso de deshidratación, aclarado y montaje para el análisis de la muestra, ya sea en un microscopio óptico o de fluorescencia²².

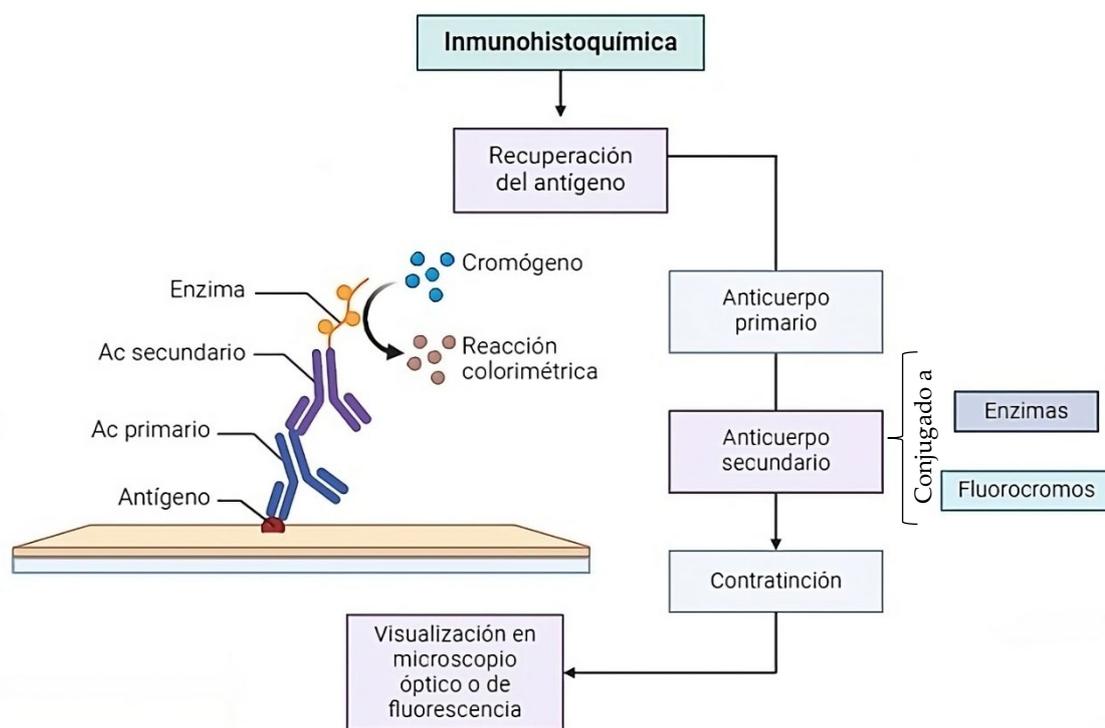


Figura 1. Fundamento de la inmunohistoquímica basado en la utilización de enzimas.

De acuerdo con los estudios realizados por Rani et al²³, y Kasonkanji et al²⁴, acerca de la clasificación de leucemias agudas utilizando esta técnica se hace uso de un panel de marcadores de incluye CD34, MPO, CD117, CD3, CD20, PAX5, TdT y CD10. Para diferenciar entre LLA y LMA se usaron MPO y CD117. En

cuanto a la distinción en la línea linfoide, la LLA-B fue positiva para CD34, CD20, PAX5, CD10, mientras que la LLA – T mostró positividad para CD34, CD3 y TdT. También se menciona que otros antígenos de células T como CD2, CD5 y CD7 no son específicos de este linaje y pueden manifestarse de forma anormal en la LMA.

Citometría de flujo.

Esta técnica representa una tecnología potente capaz de procesar decenas de miles de partículas por segundo y de identificar subpoblaciones mediante herramientas de análisis multiparamétrico²⁵. Para realizar esta técnica las células o partículas que se van a analizar deben encontrarse suspendidas en un fluido como la solución salina tamponada con fosfato (PBS). Esta suspensión requiere someter a la muestra, que en este caso es un aspirado de MO o sangre periférica (únicamente en caso de que la MO sea de mala calidad o se observe una blastosis periférica masiva), a un proceso de lisis – tinción – fijación y lavado. Las células van a ser teñidas con un panel de anticuerpos conjugados a fluorocromos como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), proteína peridina clorofila cianina 5.5 (PerCP Cy5.5), APC H7 y PE Cya-nin 7 (PE Cy 7)²⁶⁻²⁸.

Al pasar por el citómetro de flujo, las células se disparan a través de los rayos láser a altas velocidades y es en esta intersección en donde la óptica de recolección de luz capta la fluorescencia y la dispersión de luz de cada célula^{25,26}. El uso de uno o varios láseres, al incidir sobre las células, permite medir sus características por la dispersión frontal, lo que refleja el tamaño y por la dispersión lateral la complejidad interna o granularidad de cada célula. Además, al incidir el láser sobre las moléculas de fluorescencia estas se excitan y envían una señal^{15,25}.

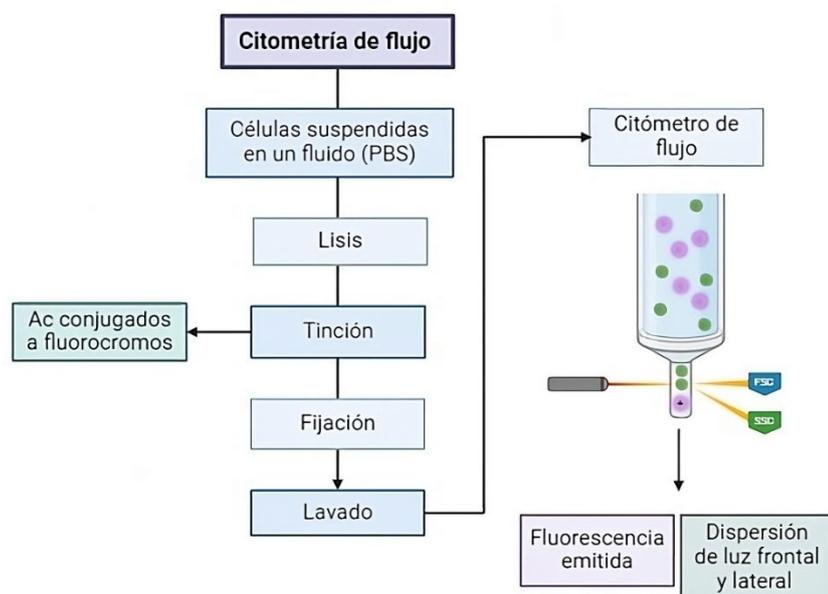


Figura 2. Pasos para el análisis de muestras mediante citometría de flujo.

Es así como mediante estas técnicas se pueden detectar los antígenos presentes en la superficie de las células blásticas de cada estirpe (T o B). Además, también se identifican a los subtipos que van a corresponder con los diferentes estadios de diferenciación de los linfocitos normales¹⁵.

LLA – T	LLA – B
<ul style="list-style-type: none"> • Precursores T (15%, morfología L2): expresa CD3 (citoplasmático o de membrana), TdT. <ul style="list-style-type: none"> ○ LLA Pro-T: cCD3/CD7⁺. ○ LLA Pre-T: (CD3 citoplasma, CD7, CD5+/-, CD2+/-) TdT⁺. ○ LLA Cortical-T: CD3 citoplasma y membrana, CD7, CD1a⁺, TdT⁺. 	<ul style="list-style-type: none"> • Precursores B (80%, morfología L1 y L2): expresa CD19, CD22, CD79a (al menos 2), TdT⁺. <ul style="list-style-type: none"> ○ LLA Pro-B (B-I): CD19/CD79a/cCD22⁺/CD10⁻. ○ LLA - B común (B-II): CD10⁺, TdT⁺, cIgM⁻. ○ LLA Pre-B (B-III): IgM citoplasma⁺, TdT⁺, sIg⁻.
<ul style="list-style-type: none"> • LLA – T madura: CD3 membrana⁺, TdT⁺, CD1a⁻. 	<ul style="list-style-type: none"> • LLA – B madura (5%, morfología L3) (B-IV): expresa inmunoglobulinas de superficie (k o λ) o cadenas ligeras citoplasmáticas, TdT⁻, sIg⁺, CD20⁺.

Tabla 3. Clasificación de la LLA por inmunofenotipos.^{15, 29}

También cabe recalcar que enfrenta desafíos, como el bajo volumen y la baja viabilidad celular, resultados engañosos debido al cambio fenotípico, así como el manejo de grandes cantidades de datos, además de que se considera que su sensibilidad es subóptima^{21,29}. Es por ello por lo que se busca implementar el uso del flujo de próxima generación, que ofrece mejorar la interoperabilidad y sensibilidad²⁹.

En casos de fibrosis en la MO, la cantidad de células obtenidas para CF disminuye considerablemente, lo que a veces impide su uso para el diagnóstico, convirtiendo al estudio de la biopsia de MO mediante IHQ en la herramienta diagnóstica alternativa²¹.

Citogenética

La LLA se describe como una enfermedad de origen genético, debido a que en la gran mayoría de casos se encuentran alteraciones genéticas adquiridas (mutaciones somáticas), las cuales favorecen el incremento del proceso proliferativo, la supervivencia prolongada y/o la diferenciación incorrecta de las células progenitoras linfoides. Es por ello por lo que tanto los hallazgos citogenéticos como los genéticos moleculares representan factores pronósticos importantes al momento del diagnóstico de la LLA, ya sea en niños o adultos³⁰.

Dentro de la citogenética se pueden mencionar principalmente al análisis convencional o estándar y la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés).

- **Análisis citogenético estándar.**

En esta técnica se pueden detectar microscópicamente las anomalías en los cromosomas, sin importar si son anormalidades en el número de cromosomas o en su estructura³¹. Para ello es necesario obtener células en metafase, en donde las cromátidas se encuentran condensadas y la morfología de los cromosomas está bien definida³². Las muestras se someten a *cultivos in vivo* no estimulados en un período corto (24 a 48 horas), y posterior a este tiempo se detiene la división celular al exponer el cultivo a diversas sustancias (colamida principalmente). Estas muestras se van a teñir usando técnicas de banda (generalmente bandas G) y se analizan en el microscopio. Para poder confirmar que un caso es citogenéticamente normal es necesario analizar por lo menos 20 cariotipos de una muestra de MO y en caso de encontrar aberraciones cromosómicas, estas se consideran relevantes cuando son clonales. Esto significa que deben encontrarse en al menos dos células en metafase si se trata de una aberración estructural idéntica o de una ganancia de un cromosoma intacto (trisomía), en el caso de un cromosoma que falta (monosomía), deben estar presentes en al menos tres células^{30,31}.

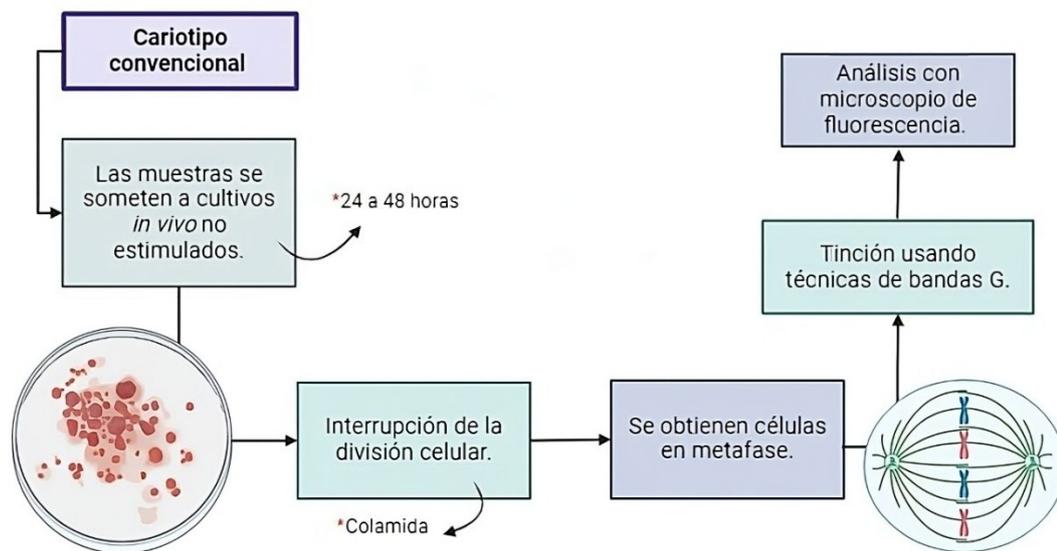


Figura 3. Protocolo para el análisis de cariotipo convencional.

Mediante esta técnica se pueden detectar aneuploidías (hiper o hipodiploidías) y otros reordenamientos cromosómicos comunes. Sin embargo, el cariotipo convencional no suele ser lo suficientemente sensible en la detección de reordenamientos que son crípticos, es decir, que son muy pequeños y más complejos¹⁰. Además, la precisión del análisis de cariotipos depende de la obtención de metafases de alta calidad provenientes de células neoplásicas. Sin embargo, en casos donde los blastos tienen un bajo potencial de proliferación o en situaciones de alta hiperdiploidía, es posible que no se generen metafases analizables, lo que podría llevar a una interpretación errónea de los resultados³².

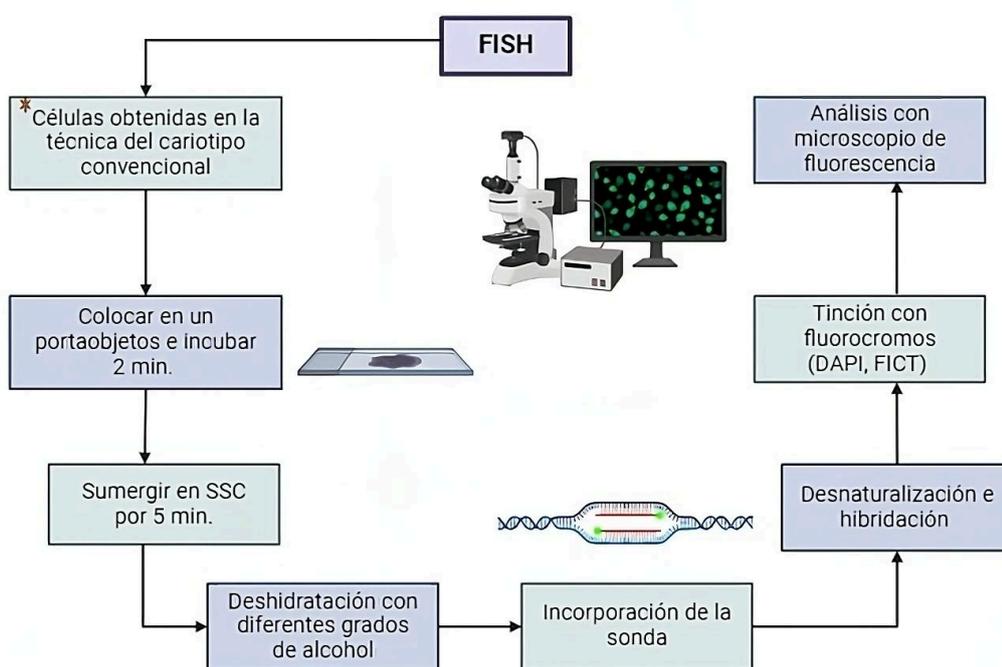
En la LLA-B, se encuentran varias alteraciones como diferentes tipo de ploidía: hiperdiploidía (> 50 cromosomas), hipodiploidía (entre 24 y 31 cromosomas denominado casi hipoide o entre 32 y 39 cromosomas denominado bajo haploide) y traslocaciones como t(9;22), *KMT2A* -r, t(5;14); t(1;19). Mientras que, en la LLA-T, aún no se ha establecido una clasificación exacta acerca de las alteraciones detectadas mediante el cariotipo convencional, lo cual puede deberse a que la cantidad de casos citogenéticamente normales es mayor que en la LLA-B^{30,33}.

Aproximadamente un tercio de los pacientes con LLA-T presenta una translocación que involucra alguno de los genes del receptor de células T (TCR), con puntos de ruptura en 14q11 (*TCRA/TCRD*) o 7q34 (*TCRB*). La translocación más frecuente en adultos es t(10;14)(q24;q11.2), la cual provoca la sobreexpresión del gen *TLX1* (*HOX11*) y está vinculada a un pronóstico favorable. En niños, alrededor del 3 y el 6% de los casos presentan una translocación t(1;14)(p32;q11.2), que coloca al gen *TCRD* junto al gen *TAL1*, lo que provoca la sobreexpresión de este último. Además, esta sobreexpresión puede ocurrir debido a una delección críptica en el cromosoma 1, lo que provoca una fusión entre los genes *TAL1* y *STIL*. Esta fusión específica, *TAL1-STIL*, se observa en un 16–26% de los casos, convirtiendo a las alteraciones relacionadas con *TAL1* (tanto la translocación como la fusión) en las anomalías genéticas más comunes en este tipo de leucemia infantil³⁰.

Si bien el cariotipo convencional ofrece una perspectiva amplia y completa de las aberraciones cromosómicas presenta ciertas limitaciones como el realizar un cultivo celular que demanda mucho tiempo y que tiene probabilidades de fracaso, una interpretación que depende de la experiencia del analista y una resolución máxima de entre 5 a 7 megabases (Mbp)³⁴.

• FISH

El principio en el cual se basa esta técnica es la hibridación de sondas de ADN de cadena simple marcadas con fluoróforos a sus secuencias genómicas complementarias³². El procedimiento se puede iniciar con las células preparadas en la técnica del cariotipo convencional, depositando las mismas en un portaobjetos e incubando durante 2 minutos a 45°C en una placa caliente, para luego empapar el portaobjetos en citrato salino de sodio (SSC) por 5 minutos. Posteriormente, se somete a un proceso de deshidratación con diferentes grados de alcohol (70%, 85% y 100%) y se procede a agregar la sonda, se coloca un cubreobjetos y la muestra se somete a una desnaturalización seguida de una hibridación durante toda la noche. Al día siguiente se realiza otra hibridación con SSC y finalmente los portaobjetos se tiñen con los fluorocromos que pueden ser 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloruro de ácido sulforodamina 101, entre otras. Las señales de fluorescencia se van a detectar utilizando un microscopio específico para este fin^{35,36}. Cabe destacar que las sondas que se utilizan son fragmentos de ADNc o ADN genómico que son complementarias a secuencias específicas en el genoma humano³⁰.



* Opcional

Figura 4. Protocolo para el procesamiento de muestras mediante FISH.

La ventaja de la FISH es que no requiere de células vivas, ya que se pueden analizar células tanto en metafase como en interfase, a diferencia del cariotipo convencional que ocupa exclusivamente células en metafase, además permite analizar con mayor rapidez un gran número de células e identificar cambios estructurales que son más sutiles para la resolución de la citogenética convencional³⁷. Sin embargo, no puede identificar pequeñas deleciones y mutaciones³⁸.

Actualmente, esta técnica es usada en la detección de translocaciones, inversiones, inserciones, microdeleciones y en la identificación de cromosomas llamados marcadores o de referencia, además también es útil en la delimitación de los puntos de ruptura a nivel cromosómico³⁹.

Se utilizan varios tipos de sondas que cumplen con una función en específico de acuerdo con lo que se intenta encontrar o detectar. Entre estas se encuentran las sondas centroméricas, sondas de pintado cromosómico y

las sondas de secuencia única o locus específico. Mediante esta última sonda se puede detectar al cromosoma Filadelfia en la LLA, que se forma debido a la traslocación t(9;22), presente en el 5% de los casos y que representa un mal pronóstico³⁷. También se ha logrado detectar el gen de fusión ETV6/RUNX1, identificar patrones de hibridación atípicos y la amplificación intracromosómica del 21 (iAMP21)³⁹.

Técnicas moleculares

De acuerdo con la clasificación actualizada por la OMS en el 2016, de todas las anomalías genéticas recurrentes que se presentan en la LLA, las traslocaciones suelen ser las más frecuentes. Estas al ser analizadas desde una perspectiva molecular son las causantes de la formación de genes de fusión, creados a partir del intercambio de material entre cromosomas y que se puede detectar en el ácido ribonucleico (ARN) mediante la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR)⁴⁰.

- RT-PCR

Se describe como una variante de la PCR convencional y consta de 2 procesos⁴¹. El primero de ellos inicia con la transcripción inversa, en donde se va a tomar un fragmento de ARN para convertirlo en ADN complementario (ADNc) por acción de la transcriptasa inversa. El ADNc obtenido va a servir como molde para realizar la PCR convencional, que inicia con la desnaturalización del ADN para separar las cadenas dobles, después se añaden los cebadores o primers para su unión con las cadenas simples de ADN que, cabe destacar, van a ser diseñadas exclusivamente para las necesidades de cada estudio realizado. Por último, la elongación o extensión que es catalizada por la ADN polimerasa, resultando en la duplicación del material genético^{14,41,42}.

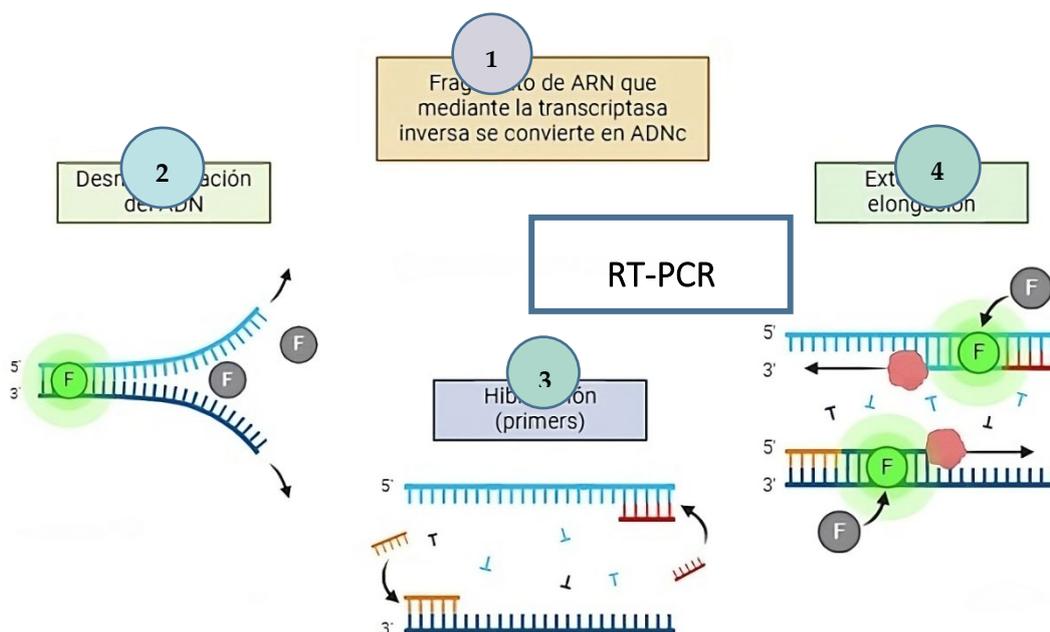


Figura 5. Pasos esenciales en la RT-PCR.

Presenta una alta sensibilidad (0,01% a 0,001%), superior a otras técnicas como la CF, que le permite detectar una célula maligna entre 10 000 a 100 000 células normales¹⁴. Utilizando cebadores dirigidos hacia distintos genes de fusión se han logrado detectar varios reordenamientos importantes como *BCR::ABL1*, *TCF3::PBX1*, *ETV6::RUNX1* y *UBTF::ATXN7L3*. Además, se considera que la implementación de esta metodología es especialmente útil para la detección de reordenamientos crípticos y comprobación de la expresión

y estructura de nuevos genes de fusión identificados por otras metodologías como FISH. Sin embargo, su uso se limitado por la gran heterogeneidad molecular que generan las fusiones génicas, tal es el caso del subtipo *BCR::ABL1-like*, en el que están involucradas varias quinasas¹⁰.

Secuenciación de nueva generación

Se considera que, aún en la actualidad al momento de realizar el análisis genómico de la LLA se utilizan técnicas de bajo rendimiento como la FISH, debido a que el número de alteraciones que detecta es muy limitado, es por ello por lo que se espera modernizar las técnicas diagnósticas con la introducción de otras tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés)⁴³. También se puede utilizar para monitorear la EMR, consiguiendo mejores resultados al alcanzar una sensibilidad de hasta 1×10^{-6} , de acuerdo con el estudio realizado por Short et al⁴⁴, del total de pacientes que tuvieron resultados negativos para EMR mediante CF, el 46% resultó positivo al realizar el estudio utilizando NGS. Se demostró de esta manera que, esta técnica puede detectar incluso aquellos casos en los que las células leucémicas son casi imperceptibles para otras técnicas que se usan comúnmente en el diagnóstico convencional de la LLA.

La NGS es una técnica avanzada que permite identificar de manera eficiente y rápida cambios moleculares en las células tumorales. Tradicionalmente estos cambios genéticos se detectaban mediante citogenética convencional, FISH o PCR, sin embargo, al buscar mejorar la relación coste-eficiencia se implementó esta nueva técnica capaz de detectar múltiples aberraciones genéticas a la vez⁴⁵. De acuerdo con la complejidad que represente el análisis requerido y la información que se quiera obtener se pueden realizar distintos tipos de secuenciación, entre las que se incluye a la secuenciación del genoma completo (WGS), secuenciación del transcriptoma (RNA-seq) y secuenciación del exoma completo (WES)⁴³. Cabe señalar que todas estas técnicas no forman parte del estudio estándar para el diagnóstico de la LLA, sin embargo, se llevan a cabo en los laboratorios de investigación para lograr establecer una clasificación mejor definida de esta enfermedad²⁹.

En un principio esta técnica se veía limitada tanto por su precio como por la complejidad de su uso. A partir de 2001, cuando se estaban realizando los primeros experimentos el costo se ha reducido drásticamente de 100 millones de dólares a 1000 dólares, aunque este precio aún es considerablemente alto se espera que siga bajando en los próximos años. Asimismo, las herramientas bioinformáticas empleadas para analizar la gran cantidad de datos obtenidos a partir de la secuenciación han sido mejoradas mediante el perfeccionamiento de nuevos algoritmos y canales⁴³.

WGS

Esta técnica se divide en 4 procesos esenciales: preparación de la muestra, preparación de la biblioteca, generación de grupos y secuenciación^{46,47}. El ADN de alto peso molecular se aísla a partir de sangre completa (EDTA o citrato), tejidos extirpados quirúrgicamente o biopsias, para luego ser fragmentado y generar la biblioteca. Aquí también se agregan los adaptadores y el ADN enlazador. Posteriormente, las bibliotecas se cargan en una celda de flujo y se sitúan en un secuenciador en donde los fragmentos de ADN van a amplificarse mediante una polimerasa. Con un detector láser de fluorescencia se detecta la señal producida y los datos finalmente se transfieren a una computadora de alto rendimiento para ser analizados y comparados con el genoma de referencia humano^{43,46}. Por lo cual, esta técnica es especialmente valiosa para estudiar o detectar variaciones estructurales⁴³.

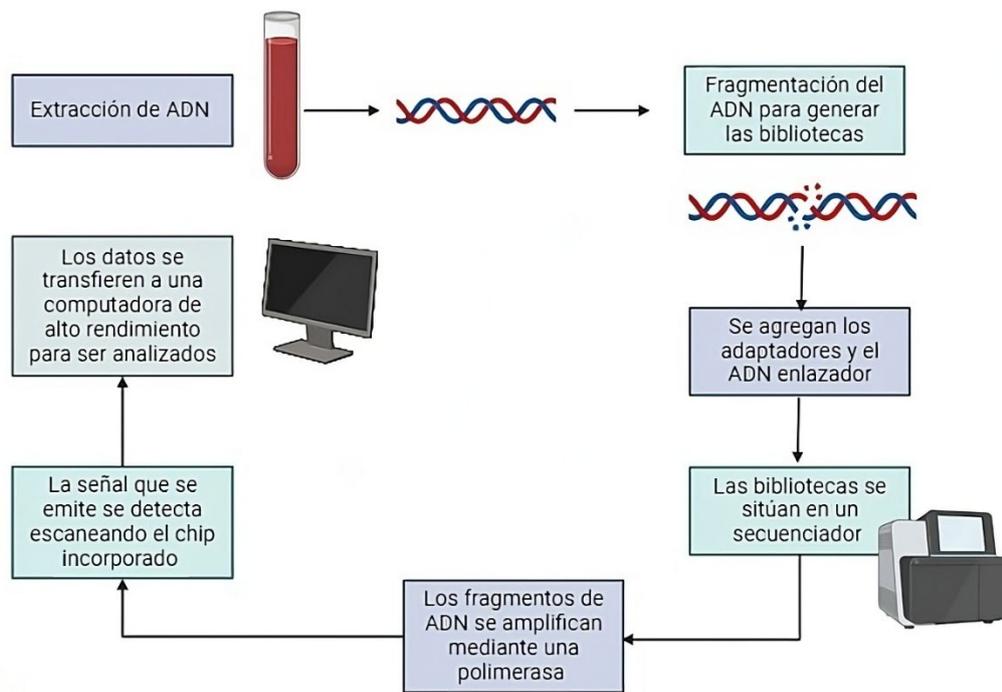


Figura 6. Protocolo para análisis del genoma y exoma completo.

WES

Considerada útil para estudiar mutaciones puntuales, especialmente en subclones leucémicos durante la recaída. Esta técnica comparte un flujo de trabajo bastante similar a WGS, con la excepción de que, a diferencia de dicha técnica, esta va a centrarse únicamente en las regiones codificantes, es decir, los exomas. Cabe mencionar que se van a ocupar bases de datos como la del Consorcio de Agregación de Exomas para obtener más información del efecto biológico de las alteraciones identificadas⁴³.

RNA-seq

Se emplea para analizar la expresión de ARNm o ARN no codificante, y puede identificar tanto mutaciones en la secuencia como genes de fusión, los cuales también pueden ser detectados por el WGS⁴³. Este análisis consta de 3 pasos fundamentales: alineamiento, cuantificación y análisis diferencial^{48,49}. El proceso de preparación de una biblioteca de RNA-seq comienza con la obtención y aislamiento del ARN de una muestra biológica, que puede provenir de una línea celular o de un tejido previamente congelado. Posteriormente, el ARN es transformado en ADNc mediante una transcripción inversa, el ADN obtenido va a ser fragmentado en secuencias cortas. La biblioteca creada a partir de este proceso se convierte en la entrada a una plataforma de secuenciación que va a generar las lecturas correspondientes al comparar o alinear estas con otra secuencia de referencia⁵⁰.

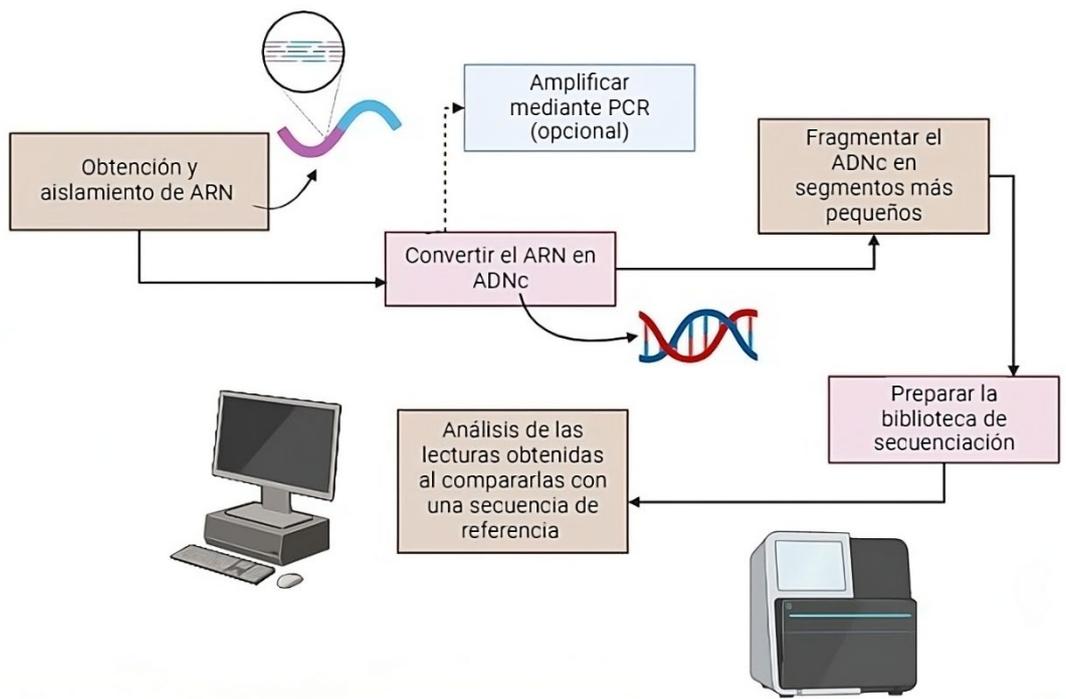


Figura 7. Protocolo para el análisis del transcriptoma completo.

NGS		
	LLA-T	LLA-B
WGS+WES	<ul style="list-style-type: none"> • Genes impulsores putativos nunca vistos: <i>CCND3, CTCF, MYB, SMARCA4, ZFP36L2</i> y <i>MYCN</i>⁴³. • Fusiones: <i>SET-NUP214, ZBTB16-ABL1, TRA-SALL2</i>⁴³. • Sobreexpresión de <i>HOXA, MEF2C, LYL1</i> y <i>TAL1</i>⁴³. 	<ul style="list-style-type: none"> • Implicación frecuente de la vía RTK – RAS y modificadores de histonas⁴³. • Deleciones intragénicas recurrentes de <i>PAX5</i> o <i>VPREB1</i>⁴³. • Fusión <i>TCF3 – HLF</i>⁴³.
WES	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones de <i>NOTCH1 / FBXW7</i>⁴³. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación de las vías de señalización <i>RAS / RTK</i> y <i>JAK / STAT</i>⁴³.
RNA – seq	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión <i>PTEN-ATAD</i> y <i>TP53-WDR7</i>⁵¹. • Otras alteraciones: <i>TCF7-CSF1R, ETV6-CRX</i> y dos fusiones <i>BCOR</i> en las que podría estar involucrado el cromosoma X⁵¹. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión <i>KMT2A-USP2</i>¹⁰. • Fusiones raras de <i>ABL1</i>¹⁰. • Reordenamientos: <i>P2RY8-CRLF2, ETV6::RUNX1-like</i> y <i>PAX5 alt</i>. • Fusión <i>PAX5-JAK2</i>¹⁰.

Tabla 4. Alteraciones detectadas en varios estudios por distintas técnicas.

TÉCNICAS	BENEFICIOS	LIMITACIONES
Hemograma	<ul style="list-style-type: none"> Herramienta diagnóstica accesible a laboratorios básicos de análisis clínicos. Económicamente asequible para los pacientes. 	<ul style="list-style-type: none"> Baja cantidad de leucocitos y, por ende, de blastos en la muestra. Los blastos pueden ser reportados de manera inconsistente, como linfocitos atípicos, inmaduros o sospechosos, lo que puede dar lugar a interpretaciones erróneas por posible falta de experiencia del analista. No permite un diagnóstico preciso de LLA.
Inmunohistoquímica	<ul style="list-style-type: none"> Análisis de células que son demasiado frágiles como para soportar el procesamiento de la muestra usando la CF. 	<ul style="list-style-type: none"> El análisis se puede realizar solo en muestras de tejido. Puede analizar solo 1 anticuerpo a la vez.
Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidad del 0,1% a 0,01% en el monitoreo de la EMR. Es decir, puede detectar una célula anormal en 1000 a 10 000 células normales. Analiza múltiples anticuerpos al mismo tiempo. Manejo de grandes cantidades de datos. 	<ul style="list-style-type: none"> Bajo volumen y la baja viabilidad celular. Resultados engañosos debido al cambio fenotípico.
Cariotipo convencional	<ul style="list-style-type: none"> Detección de aneuploidías y reordenamientos cromosómicos comunes. 	<ul style="list-style-type: none"> La sensibilidad no es óptima para detectar reordenamientos crípticos. La precisión del análisis depende de la obtención de metafases de alta calidad. Cultivo celular que demanda mucho tiempo y que tiene probabilidades de fracaso.
FISH	<ul style="list-style-type: none"> No requiere de células vivas. Analiza con mayor rapidez un gran número de células. Identifica cambios estructurales que son más sutiles para la resolución de la citogenética convencional. 	<ul style="list-style-type: none"> No identifica pequeñas deleciones y mutaciones
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad (0,01% a 0,001%), superior a otras técnicas como la CF, que le permite 	<ul style="list-style-type: none"> Su uso se ve limitado debido a la gran heterogeneidad debido a las fusiones génicas, tal es el caso del subtipo

	<p>detectar una célula maligna entre 10 000 a 100 000 células normales.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detección de reordenamientos crípticos. • Comprobación de la expresión y estructura de nuevos genes de fusión identificados por otras metodologías como FISH 	<p><i>BCR::ABLI-like</i>, en el que están involucradas varias quinasas.</p>
NGS	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora la relación coste-eficiencia, en relación con otras pruebas como FISH, RT-PCR o la citogenética convencional. • Permite el análisis del genoma completa (WGS), exoma completo (WES) y del transcriptoma (RNA-seq). 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitada a laboratorio de investigación. • Requiere equipos más complejos. • Necesidad de personal especializado en sistemas bioinformáticos.

Tabla 5. Principales beneficios y limitaciones de las diferentes técnicas analizadas.

Desafíos en países en vías de desarrollo

Se recalca ampliamente que las tasas de curación y supervivencia de la LLA rondan el 90%, sin embargo, estos datos pertenecen únicamente a los países de altos ingresos. Esto se debe a que las técnicas más avanzadas ya han sido implementadas en dichos lugares⁵². En contraste, tanto en América Latina como en otros países de ingresos medios bajos, los resultados están significativamente por debajo de los estándares internacionales establecidos, tanto en pacientes pediátricos como adultos. Además, la disponibilidad de las pruebas basadas en la citogenética o biología molecular varía ampliamente y depende en gran medida del ámbito económico. Actualmente, la medición de la EMR es considerado como el factor pronóstico independiente más importante, ya que, facilita la adaptación de la intensidad de la quimioterapia y el ajuste de las estrategias de consolidación⁷. Los ensayos preferidos para realizar estos análisis son la PCR y la CF, esta última siendo la menos accesible y asequible, debido a que la distribución de laboratorios que realicen técnicas genéticas y citogenéticas se concentra por lo general en áreas urbanas principales, lo que provoca una alta demanda que colapsa los sistemas de salud en Latinoamérica. Lo cual subraya la necesidad de mejoras en la gestión gubernamental que permita el acceso a estas herramientas.

La implementación de técnicas más avanzadas es de suma importancia debido a que mediante la detección de anomalías genéticas específicas que son recurrentes y la medición de la EMR al finalizar la terapia de inducción es posible establecer una clasificación de riesgo (bajo, estándar, alto o muy alto). Esta combinación ha dado grandes resultados en cuanto a la mejora en las tasas de supervivencia en los últimos 30 años^{7,53}. Además, se necesitan encontrar nuevos enfoques terapéuticos para los casos de LLA de alto riesgo, cuyo pronóstico sigue siendo desfavorable aún con la aplicación de una terapia intensiva. Para ello es necesario conocer con mucha más profundidad las alteraciones moleculares que son responsables de la resistencia a estos tratamientos⁵³.

	TÉCNICAS	PARÁMETROS / MARCADORES
DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	Hemograma	<ul style="list-style-type: none"> Anemia normocítica normocrómica. Trombocitopenia. Glóbulos blancos variables: <i>Niños:</i> <ul style="list-style-type: none"> <11.000 células/μl (50%). >100.00 células/μl (20%). 200.000 células/μl (7%). <i>Adultos:</i> <ul style="list-style-type: none"> >30.000 células/μl o <100.000 células/μl. Formas blásticas inmaduras.
	Tinciones citoquímicas	<ul style="list-style-type: none"> MPO (-). Sudán negro (-). ANAE Y ANBE (+ solo para linfocitos T), CAE (-). PASchiff (+).
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL O DEFINITIVO	Inmunohistoquímica	<ul style="list-style-type: none"> LLA-B: CD34, CD20, PAX5, CD10. LLA-T: CD34, CD3 y TdT. (Marcadores CD2, CD5 y CD7 no son específicos del linaje T.)
	Citometría de flujo	<ul style="list-style-type: none"> LLA Pro-T: cCD3/CD7⁺. LLA Pre-T: (CD3 citoplasma, CD7, CD5+/-, CD2+/-) TdT⁺. LLA Cortical-T: CD3 citoplasma y membrana, CD7, CD1a⁺, TdT⁺. LLA – T madura: CD3 membrana⁺, TdT⁺, CD1a⁻. LLA Pro-B (B-I): CD19/CD79a/cCD22⁺/CD10⁻. LLA - B común (B-II): CD10⁺, TdT⁺, cIgM⁻. LLA Pre-B (B-III): IgM citoplasma⁺, TdT⁺, sIg⁻. LLA – B madura (5%, morfología L3) (B-IV): expresa inmunoglobulinas de superficie (k o λ) o cadenas ligeras citoplasmáticas, TdT⁻, sIg⁺, CD20⁺.
	Cariotipo convencional	<ul style="list-style-type: none"> LLA-B: Hiperdiploidía (> 50 cromosomas), hipodiploidía (entre 24 y 31 cromosomas denominado casi hipoide o entre 32 y 39 cromosomas denominado bajo haploide) y traslocaciones como t(9;22), <i>KMT2A</i> -r, t(5;14); t(1;19). LLA-T: <ul style="list-style-type: none"> <i>Adultos:</i> sobreexpresión del gen TLX1, con t(10;14). <i>Niños:</i> t(1;14) que yuxtapone los genes TCRD-TAL1 Fusión TAL1-STIL.
	FISH	<ul style="list-style-type: none"> Cromosoma Filadelfia t(9;22). Gen de fusión ETV6/RUNX1. Patrones de hibridación atípicos y la amplificación intracromosómica del 21 (iAMP21)
	RT-PCR	<i>BCR::ABL1</i> , <i>TCF3::PBX1</i> , <i>ETV6::RUNX1</i> y <i>UBTF::ATXN7L3</i>

<p>WGS WES</p>	<p>LLA-T</p> <ul style="list-style-type: none"> • Genes impulsores putativos nunca vistos: <i>CCND3</i>, <i>CTCF</i>, <i>MYB</i>, <i>SMARCA4</i>, <i>ZFP36L2</i> y <i>MYCN</i>. • Fusiones: <i>SET-NUP214</i>, <i>ZBTB16-ABL1</i>, <i>TRA-SALL2</i>. • Sobreexpresión de <i>HOXA</i>, <i>MEF2C</i>, <i>LYL1</i> y <i>TAL1</i>. • Alteraciones de <i>NOTCH1</i> / <i>FBXW7</i>. <p>LLA-B</p> <ul style="list-style-type: none"> • Implicación frecuente de la vía RTK – RAS y modificadores de histonas. • Deleciones intragénicas recurrentes de <i>PAX5</i> o <i>VPREB1</i>. • Fusión <i>TCF3 – HLF</i>. • Mutación de las vías de señalización <i>RAS</i> / <i>RTK</i> y <i>JAK</i> / <i>STAT</i>.
<p>RNA-seq</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LLA-B: <ul style="list-style-type: none"> - Fusión <i>KMT2A-USP2</i> y fusiones raras de <i>ABL1</i>. - Reordenamientos como <i>P2RY8-CRLF2</i>, <i>ETV6::RUNX1-like</i> y <i>PAX5 alt</i>, <i>PAX5-JAK2</i>. • LLA-T: <ul style="list-style-type: none"> - Nuevas fusiones: <i>PTEN-ATAD</i> y <i>Tp53-WDR7</i>, <i>BCOR</i>. - Otras alteraciones: <i>TCF7-CSF1R</i>, <i>ETV6-CRX</i>.

Tabla 6. Principales alteraciones y/o mutaciones detectadas por cada una de las técnicas.

La integración de múltiples técnicas diagnósticas, desde los métodos convencionales hasta las tecnologías más avanzadas, ha revolucionado el abordaje clínico de la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). Si bien las técnicas tradicionales como el hemograma, el análisis morfológico y las tinciones citoquímicas siguen siendo fundamentales en el diagnóstico inicial, su sensibilidad y especificidad han sido complementadas por herramientas más precisas, como la citometría de flujo, el cariotipo convencional y la hibridación in situ por fluorescencia (FISH). A su vez, los enfoques moleculares como RT-PCR y la secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido detectar con mayor precisión las alteraciones genéticas y los subtipos de riesgo, facilitando así la estratificación del tratamiento y la medición de la enfermedad mínima residual (EMR). Estos avances no solo han incrementado las tasas de supervivencia, especialmente en países desarrollados, sino que también subrayan la necesidad urgente de implementar dichas tecnologías en países en vías de desarrollo para reducir la brecha existente en el acceso a un diagnóstico preciso y oportuno.

CONCLUSIONES

Los avances en las técnicas de diagnóstico de la LLA han revolucionado el enfoque clínico de esta enfermedad, permitiendo una identificación más precisa y rápida de los subtipos moleculares y alteraciones genéticas, consideradas como las más cruciales en cuanto a la elección de tratamiento y la estratificación de riesgo, ya que partiendo de estas alteraciones se establece un peor o mejor pronóstico. Las técnicas tradicionales como el hemograma y el frotis sanguíneo aún cumplen con un papel importante en el diagnóstico presuntivo de esta enfermedad, ya que, estos resultados son el punto de partida para análisis más exhaustivos. Asimismo, las tinciones citoquímicas también representaron una parte fundamental en el diagnóstico, especialmente al

momento de diferenciar la LLA de la LMA, aunque con el tiempo su uso fue desplazado hasta quedar prácticamente obsoletas.

No obstante, estas técnicas han sido complementadas y/o superadas en especificidad y sensibilidad por tecnologías más avanzadas, tales como la IHQ, que permite identificar marcadores específicos en las células; la CF, utilizada para clasificar subtipos celulares; el cariotipo convencional y FISH, que detectan alteraciones cromosómicas; y la RT-PCR, que permite identificar translocaciones (genes de fusión) y otras mutaciones con gran precisión a nivel molecular. Al integrar todas estas técnicas en un solo flujo se logra una gran mejora en la precisión diagnóstica y también facilita la estratificación de riesgos, la implementación de tratamientos mucho más específicos y el monitoreo de la evolución de la enfermedad mediante el estudio de la EMR.

Aunque las tasas de curación y supervivencia han incrementado en los últimos años, esto ha ocurrido principalmente en países de ingresos altos, quedando en evidencia la brecha tecnológica existente con los países en vías de desarrollo. Es imprescindible garantizar un acceso equitativo a métodos diagnósticos más avanzados para mejorar los resultados clínicos, especialmente en adultos, que suele ser la población con los peores pronósticos. Además, la investigación en torno a las alteraciones moleculares responsables de la resistencia al tratamiento es esencial para desarrollar terapias más efectivas mediante la clasificación de riesgo, particularmente para los pacientes con LLA de alto riesgo, cuyo pronóstico sigue siendo desfavorable.

Técnicas como la NGS no han sido implementadas en todos los laboratorios o bien están en vías de adaptación y desarrollo para que sean más accesibles, ya sea por la complejidad que representan estos análisis y por lo tanto el personal altamente especializado que se requiere para su ejecución, o bien por los altos costos que representa el realizar uno de estos estudios.

Financiación: Este artículo no recibió financiación externa.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Brown PA, Shah B, Advani A, Aoun P, Boyer MW, Burke PW, et al. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2021;19(9).
2. Elsayed B, Elhadary M, Elshoeibi RM, Elshoeibi AM, Badr A, Metwally O, et al. Deep learning enhances acute lymphoblastic leukemia diagnosis and classification using bone marrow images. Vol. 13, *Frontiers in Oncology*. 2023.
3. José M, Rodríguez M, De La Paz K, Salinas A, Alexander K, Cepeda S, et al. Leucemia linfoblástica aguda diagnostico. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, ISSN-e 2588-073X, Vol 4, N° 2, 2020, págs 53-63. 2020;4(2).
4. Mejia-Arangure JM, McNally RJQ, Pombo-de-Oliveira MS. Editorial: Prevention in Acute Leukemias in Children. Vol. 9, *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A.; 2021.
5. Kansal R. Diagnosis and Molecular Pathology of Lymphoblastic Leukemias and Lymphomas in the Era of Genomics and Precision Medicine: Historical Evolution and Current Concepts—Part 2: B-/T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *Lymphatics*. 2023;1(2).
6. Dong Y, Shi O, Zeng Q, Lu X, Wang W, Li Y, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol*. 2020 Dec 19;9(1):14.

7. Colunga-Pedraza PR, Colunga-Pedraza JE, Peña-Lozano SP, Gómez-De León A, Ruiz-Delgado GJ, Ribeiro RC. Diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in Latin America. *Hematology*. 2022 Dec 31;27(1):971–6.
8. Sharma N, Gupta R, Kotru M, Gomber Sunil., Vardhan Gautam H. Higher baseline natural killer cell counts are associated with a lower 8-day blast count and lower day 33 minimal residual disease in children with pediatric B-acute lymphoblastic leukemia. *Am J Blood Res*. 2023;13(1):53–60.
9. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(2).
10. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Vol. 482, *Virchows Archiv*. 2023.
11. Shafique S, Tehsin S. Computer-Aided Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Comput Math Methods Med*. 2018;2018:1–13.
12. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. Vol. 16, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 227–40.
13. González Llano O. The complete blood count in the early diagnosis of acute leukemia in children. *Medicina Universitaria*. 2016;18(73).
14. Jaime Pérez JC, Gómez Almaguer D. Hematología, la sangre y sus enfermedades. (Spanish). Vol. 7, *Medicina Universitaria*. 2005.
15. Moraleda JJ. Pregrado de Hematología. Vol. 4, Suparyanto dan Rosad (2015. 2017.
16. Aldama D, Sotomayor G. Sensibilidad y especificidad de morfología, inmunofenotipo e histopatología para el diagnóstico de leucemias agudas en un centro del noreste de México. *Revista Hematología*. 2023;27(2).
17. Castañeda-Huerta JE. Leucemia linfoblástica aguda. *Revista Médica MD*. 2009;1(4).
18. Santos J da S, Sá LFP de, Mata JP de O, Teixeira A da S, Crisanto AVS de MS, Amorim GR, et al. Diagnóstico da leucemia linfoblástica aguda em crianças. *Research, Society and Development*. 2022 Jul 13;11(9):e39411919078.
19. Gonzáles Cruz E de J, Díaz Contreras A, Gómez Aburto DH, Rivera Rosado FE, de la Cruz Nicolás MÁ. Manual de tinciones citoquímicas especiales en hematología. *CECan*; 2019.
20. Olsen RJ, Chang CC, Herrick JL, Zu Y, Ehsan A. Acute leukemia immunohistochemistry: A systematic diagnostic approach. Vol. 132, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2008.
21. ÖZDEMİR Ç, DÜZENLİ KAR Y, EROĞLU N, ŞENOL Y, EKER İ, ŞAHİN M. Evaluation of the Correlation of Immunohistochemical Findings with Flow Cytometric Findings in Newly Diagnosed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Journal of Contemporary Medicine*. 2023 Mar 22;13(2):318–25.
22. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. In 2019. p. 289–98.
23. Rani HS, Hui M, Uppin MS, Uppin SG, Sadashivudu G, Paul TR. Utility of Immunohistochemistry on Bone Marrow Trepine Biopsy for the Diagnosis and Classification of Acute Leukemia. *INDIAN JOURNAL OF MEDICAL AND PAEDIATRIC ONCOLOGY*. 2020 Oct;41(5):683–7.
24. Kasonkanji E, Kimani S, Skiver B, Ellis G, Seguin R, Kaimila B, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adolescents and Young Adults in Malawi. *JCO Glob Oncol*. 2022;(8).
25. Robinson JP. Flow cytometry: past and future. Vol. 72, *BioTechniques*. 2022.

26. Cossarizza A, Chang H, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*. 2019 Oct 21;49(10):1457–973.
27. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, et al. AIEOP - BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 Jan 21;94(1):82–93.
28. Pavithra P, Laxminarayana SLK, Manohar C, Belurkar S, Kairanna N V. Transition from morphologic diagnosis to immunophenotypic diagnosis of acute leukemia-experience of establishing a new flow cytometry laboratory. *J Hematop*. 2019 Oct;12(4):191–9.
29. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, Dombret H, Doubek M, Fielding A, et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. Vol. 143, *Blood*. 2024.
30. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. *Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia*. Vol. 23, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009.
31. Mrózek K, Carroll AJ, Maharry K, Rao KW, Patil SR, Pettenati MJ, et al. Central review of cytogenetics is necessary for cooperative group correlative and clinical studies of adult acute leukemia: the Cancer and Leukemia Group B experience. *Int J Oncol*. 2008 Aug;33(2):239–44.
32. Dhabe A, Islam R, Ramakrishnan K, Parihar M. Role of Cytogenetics and FISH in Laboratory Workup of B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2023 Oct 17;44(05):482–93.
33. Genescà E, Morgades M, González-Gil C, Fuster-Tormo F, Haferlach C, Meggendorfer M, et al. Adverse prognostic impact of complex karyotype (≥ 3 cytogenetic alterations) in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leuk Res*. 2021 Oct;109:106612.
34. Mareschal S, Palau A, Lindberg J, Ruminy P, Nilsson C, Bengtzén S, et al. Challenging conventional karyotyping by next-generation karyotyping in 281 intensively treated patients with AML. *Blood Adv*. 2021 Feb 23;5(4):1003–16.
35. Kulkarni N V, Shetty V V, Prasad HL K, Arumugam M, Krishna R, Shetty RA, et al. Evaluation of the cytogenetic profile in patients with acute leukaemia. *Polish Journal of Pathology*. 2023;74(2):89–97.
36. Yadav V, Raveendranath V, Ganesan P, Kar R, R P, Manivannan P. Immunophenotypic Characteristics and Cytogenetic Analysis of Adolescent and Young Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Correlations With Clinicopathological Parameters. *Cureus*. 2024 Sep 5;
37. Lavaut Sánchez K, Hernández Aguilar N, Ruiz Moleón V. Hibridación in situ fluorescente: Herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2016;32(1).
38. Ibarгойen-Roteta N, Gutiérrez-Ibarluzea I, Garcia Ruiz JC, Lawry C, Urruticoechea Ribate A. Secuenciación masiva en el diagnóstico de las leucemias agudas. 2023.
39. González García S, Lavaut Sánchez K. Técnicas de citogenética para el estudio de las leucemias. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2022;38(2).
40. Huguet F, Récher C. Leucemia linfoblástica aguda. *EMC - Tratado de Medicina*. 2024 Mar;28(1):1–6.
41. Díaz-Alonso C, Garrote-Santana H, Ana maría amor-Vigil C, Suárez-González Y, González-Mugica Romero R. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2013;29(3).
42. Okuku P, Kwenda G, Samutela M, Nkhoma P, Mantina H. Molecular detection of fusion oncogenes in zambian patients with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Appl Basic Med Res*. 2020;10(4).

43. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 15;20(12):2929.
44. Short NJ, Kantarjian H, Ravandi F, Konopleva M, Jain N, Kanagal-Shamanna R, et al. High-sensitivity next-generation sequencing MRD assessment in ALL identifies patients at very low risk of relapse. *Blood Adv.* 2022 Jul 12;6(13):4006–14.
45. Cho YU. The role of next-generation sequencing in hematologic malignancies. Vol. 59, *Blood Research.* 2024.
46. Bagger FO, Borgwardt L, Jespersen AS, Hansen AR, Bertelsen B, Kodama M, et al. Whole genome sequencing in clinical practice. *BMC Med Genomics.* 2024 Jan 29;17(1):39.
47. Brlek P, Bulić L, Bračić M, Projić P, Škaro V, Shah N, et al. Implementing Whole Genome Sequencing (WGS) in Clinical Practice: Advantages, Challenges, and Future Perspectives. Vol. 13, *Cells.* 2024.
48. Jiang G, Zheng JY, Ren SN, Yin W, Xia X, Li Y, et al. A comprehensive workflow for optimizing RNA-seq data analysis. *BMC Genomics.* 2024 Jun 24;25(1):631.
49. Spinozzi G, Tini V, Adorni A, Falini B, Martelli MP. ARPIR: automatic RNA-Seq pipelines with interactive report. *BMC Bioinformatics.* 2020;21.
50. Deshpande D, Chhugani K, Chang Y, Karlsberg A, Loeffler C, Zhang J, et al. RNA-seq data science: From raw data to effective interpretation. *Front Genet.* 2023 Mar 13;14.
51. Brown LM, Lonsdale A, Zhu A, Davidson NM, Schmidt B, Hawkins A, et al. The application of RNA sequencing for the diagnosis and genomic classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* 2020;4(5).
52. Inaba H, Pui CH. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Med.* 2021;10(9).
53. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010 Jul 1;115(26):5312–21.

Received: November 29, 2024 / **Accepted:** December 15, 2025 / **Published:** March 15, 2025

Citation: Pico-Sánchez D F, Rosero-Freire D A. De la microscopía a la secuenciación genética: La evolución en las técnicas de diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda. *Bionatura Journal.* *Bionatura Journal.* 2025;2(1):11. doi: 10.70099/BJ/2025.02.01.11

Additional information Correspondence should be addressed to da.roserof@uta.edu.ec

Peer review information. Bionatura thanks anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>

ISSN.3020-7886

All articles published by Bionatura Journal are made freely and permanently accessible online immediately upon publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura Journal stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. They were submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).