



Hibridación *in situ* fluorescente: herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas

 23 min.



Las neoplasias hematológicas se caracterizan por presentar gran heterogeneidad genética. El desarrollo de la citogenética molecular a través de la hibridación *in situ* por fluorescencia (*FISH*, por su sigla en inglés) se convirtió en un avance importante en el diagnóstico citogenético de estas neoplasias. La aplicación de este análisis aportará datos de valor pronóstico con importantes implicaciones clínicas y terapéuticas en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas.



Dra. Kalia Lavaut Sánchez
Lic. Norbelys Hernández Aguilar
Lic. Vera Ruiz Moleón

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter. 2016;32(1):99-109

Recibido: mayo 28, 2015. Aceptado: agosto 19, 2015.

Dra. Kalia Lavaut Sánchez.

Instituto de Hematología e Inmunología.
Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA



Resumen

Introducción: las neoplasias hematológicas tienen origen clonal y se caracterizan por presentar gran heterogeneidad genética. El desarrollo de la citogenética molecular a través de la hibridación *in situ* por fluorescencia (*FISH*, por su sigla en inglés) se convirtió en un avance importante en el diagnóstico citogenético de estas neoplasias.

Objetivo: describir las alteraciones

cromosómicas detectadas en pacientes con neoplasias hematológicas a partir de la introducción de esta técnica.

Métodos: se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal de pacientes con neoplasias hematológicas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), en el período comprendido entre julio de 2014 y abril de 2015. Se utilizó la técnica de *FISH* con las sondas fluorescentes específicas.

Resultados: se estudiaron 87 muestras correspondientes a diferentes tipos de neoplasias hematológicas. Con la sonda LSI BCR/ABL se observaron 18 casos positivos de leucemia mieloide crónica y los ocho pacientes con leucemia linfocítica aguda fueron negativos. Se marcaron con sonda PML/RAR α 17 muestras con diagnóstico de leucemia promielocítica: 10 fueron positivas. Se procesaron 8 muestras con la sonda LSI RUNX1/RUNX1T1, una resultó positiva. Dos muestras marcadas con sonda LSI RB1 (13q14) y una con LSI TP53 (17p13.1), resultaron negativas. Se observó un caso positivo de delección 7q31.

Conclusiones: a pesar de que la muestra estudiada es pequeña, resulta importante reportar los primeros resultados como evidencia de la incorporación de la técnica de *FISH* en el IHI, lo que constituye una nueva herramienta para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas.

Palabras clave: hibridación *in situ* fluorescente, neoplasia hematológica, leucemia.

Introducción

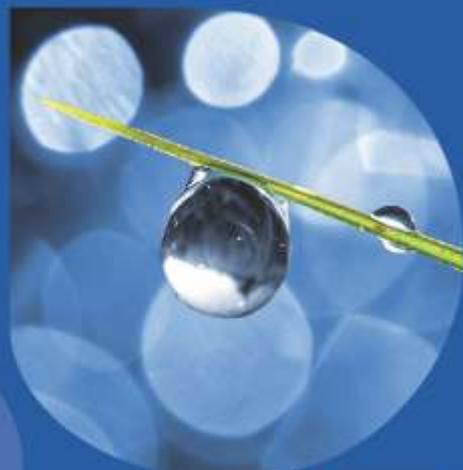
Las neoplasias hematológicas tienen origen clonal y se caracterizan por presentar gran heterogeneidad genética. Varios mecanismos genéticos se relacionan con el

origen de estas dolencias, entre ellos las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, principalmente deleciones, inversiones y translocaciones. Estas alteraciones conducen a la activación de protooncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores, los cuales promueven la inestabilidad genómica. El análisis citogenético en estas enfermedades es una importante herramienta para definir el diagnóstico, predecir el pronóstico, evaluar la respuesta al tratamiento y profundizar en el conocimiento de las bases genéticas de su patogénesis (1).

El desarrollo de la citogenética molecular a través de la hibridación *in situ* por fluorescencia (*FISH*, por su sigla en inglés), se convirtió en un avance importante en el diagnóstico citogenético de las neoplasias hematológicas. Esta técnica presenta alta sensibilidad y especificidad y posibilita el análisis de células, tanto en metafase como en interfase. Esta última ventaja supera una limitación importante de la citogenética convencional, la necesidad de obtener las células en metafase. Además, permite el análisis de un gran número de células de forma rápida y la identificación de cambios estructurales más sutiles por debajo de la resolución de la citogenética convencional (2).

La técnica de *FISH* utiliza fragmentos de secuencias de ADN, sonda marcada con fluorescencia, con el fin de localizar una secuencia complementaria en el ADN de la muestra. Existen varios tipos de sondas, cada una con una función específica según lo que se desea detectar. Se describen las sondas centroméricas (que marcan toda la región del centrómero), las sondas de pintado cromosómico (constituidas por una librería de

Tecnología escalable que acompaña su crecimiento



- Gestión de laboratorios
- Conectividad con analizadores
- Trazabilidad de muestras
- Redes de laboratorios
- Integración hospitalaria
- Facturación



PUBLISHER

Publicación automática de resultados vía fax / email / PDF. Envío simultáneo a pacientes / médicos / instituciones.



WEB

Integración a la web. Consulta interactiva de resultados para Pacientes / Médicos / Derivantes / Recepción en línea de derivaciones.

CONNECT

Comunicación con instrumentos. Producto independiente o componente de NextLAB LIS.



MICROBIOLOGÍA

Definición de paneles de antibióticos (CIM, Disco, IDI) / Manejo de múltiples aislamientos para muestra / Informes preliminares.



SISTEMA DE TRACKING DE MUESTRAS

Seguimiento de las muestras dentro del laboratorio. Producto independiente o integrado a NextLAB LIS.

CONECTOR

Integración en tiempo real de NextLAB LIS con Sistemas hospitalarios / Middleware / LIS de otros fabricantes.



**LABORATORY
INFORMATION
SYSTEM®**

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

LITE

PRO

ENT

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB by Genetrics S.A.
Av. del Libertador 8630 6to Piso "11"
C1429BNT Núñez Buenos Aires
T. [+5411]52 63 02 75 Rot
F. [+5411]52 63 02 75 Ext 100
info@nextlab.com.ar

sondas que abarcan todo el cromosoma) y las sondas de secuencia única (locus específico) que marcan regiones cromosómicas muy concretas.

Para la detección del cromosoma Filadelfia en las leucemias mieloide crónica (LMC) y linfocítica aguda (LLA), se utilizan sondas de locus específicos y diferentes colores para marcar las regiones involucradas, en la búsqueda de señales híbridas para caracterizar la reorganización, tanto en metafase como en núcleos en interfase.

Una metodología similar se utiliza para la detección de la translocación (15;17) presente en la leucemia promielocítica (LPM), así como la translocación (8;21) y otras alteraciones citogenéticas específicas descritas en la clasificación de la OMS del 2008 para la leucemia mieloide aguda (LMA), como la inversión del cromosoma 16 (inv16) y los reordenamientos en 11q23 (3).

En la leucemia linfocítica crónica (LLC) existe un bajo índice mitótico, por lo que es difícil obtener metafases a través de la citogenética convencional. La técnica de *FISH* permite detectar alteraciones cromosómicas y estratificar grupos pronósticos con implicación clínica y terapéutica; ejemplo de ello son las deleciones 13q, 17p, los rearrreglos en 11q, entre otras (4).

En los síndromes mielodisplásicos (SMD) las anomalías cromosómicas detectadas por *FISH* pueden aportar información pronóstica y ser útiles para respaldar decisiones terapéuticas en algunos casos, como las deleciones 5q, 7q y la monosomía 7 (5).

En este trabajo se presentan los primeros resultados de la detección de alteraciones cromosómicas a través de la introducción de la técnica de *FISH* en el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), como una herramienta más en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas.

Métodos

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo de tipo transversal, para identificar las alteraciones cromosómicas por técnica de *FISH* en muestras de sangre medular (MO) de 84 pacientes con neoplasias hematológicas, recibidas en el Laboratorio de Citogenética del IHI en el período comprendido entre julio de 2014 y abril de 2015.



Cuadro 1 A y B

Sondas	Alteración cromosómica	Estudios
LST BCR/ABL Dual color	t (9;22)	44
LST PML/RARA Dual color	t (15;17)	17
RUNX1/RUNX1T1 Dual Color	t (8;21)	9
CBFB Break	rearrreglos en el locus CBFB	5
	(16q22)	
LST MLL Dual Color	rearrreglos en el gen MLL (11q23)	1
LST RB1 (13q14) señal naranja	delección del gen RB1	2
LST TP53 (17p13.1) señal naranja	delección del gen TP53	1
LSD75486 Spectrum Orange/CCP 7	delección 7q31	6
Spectrum Green		
LSCSF1R Spectrum Orange/DSS23,DS5721	delección 5q33-34	2
Spectrum Green		

La técnica de *FISH* se realizó con sondas comerciales

marcadas directamente con diversos fluorocromos; se utilizó cada una de las sondas teniendo en cuenta la impresión diagnóstica del paciente en el momento de recepción de la muestra en el laboratorio. En tres de ellos, dada la enfermedad presentada, se realizaron dos estudios con sondas diferentes para un total de 87 estudios, distribuidos como se muestra en el cuadro:

Preparación de la muestra

Todas las muestras fueron cultivadas por técnica de citogenética convencional (6). La extensión se realizó en láminas porta-objetos y la calidad de la preparación fue verificada en microscopio de contraste de fase.

Pretratamiento de las láminas

Las láminas (debidamente identificadas) fueron sometidas a pretratamiento en solución 2XSSC (NaCl/citrato de sodio) a 37°C, durante 30 min. Posteriormente fueron deshidratadas mediante lavados sucesivos en diluciones etanólicas, al 70 % (v/v), 85 % (v/v) y un tercer lavado en 100 %. Se mantuvieron 2 min en cada lavado.

Hibridación y detección

En cada lámina se aplicaron 10 µL de sonda, se colocó un cubreobjeto y se selló con cemento de goma. Las láminas fueron ubicadas en un sistema de desnaturalización e hibridación de ADN (S-96 *Quanta Biotech, qCycler*). Se realizó la codesnaturalización a 72°C durante 2 min, seguido de la hibridación en cámara húmeda a 37°C durante toda la noche, por 18 horas. Al día siguiente se retiró el cubreobjeto y se realizaron dos lavados para eliminar la hibridación excedente, en 70 mL de 0,4XSSC/0,3 % NP40 a 72°C durante 3 min y posteriormente en 70 mL de 2XSSC/0,1 % NP40 a temperatura ambiente (25°C) durante 30 s.

En todos los casos se utilizó la tinción de contraste DAPI (diamidinofenilindol) para la identificación de los núcleos celulares en interfase.

Análisis

Las señales de hibridación se analizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51. Los núcleos donde el marcaje era evidente fueron seleccionados para el conteo de las señales. Fueron descartados los núcleos sobrelapados o con un marcaje débil. Fue considerada señal si el marcaje estaba dividido en dos, pero la distancia entre las señales era menor que su ancho.

En cada muestra fueron analizados de 100 a 200 núcleos. Se consideró positivo el resultado cuando la alteración cromosómica estuvo presente en más del 10 % de los núcleos observados, según bibliografía consultada (7,8).

Para las sondas dual color, las células negativas mostraron dos señales rojas (2R) y dos verdes (2V) separadas e independientes (correspondientes a cada par cromosómico). Las células positivas mostraron una señal roja y una verde independiente, y dos señales

de fusión roja-verde o amarillas (2F) al estar los dos fluorocromos unidos.

Para las sondas LSI RB1 (13q14), LSI TP53 (17p13.1) las células negativas muestran dos señales rojas y las células con la alteración cromosómica muestran una señal roja.

Para detectar la deleción 7q31 y 5q33-34, las células negativas mostraron dos señales verdes (control) y dos rojas (región de la deleción); mientras que las células positivas mostraron dos señales verdes y una roja.

Captura y procesamiento de imágenes

Se utilizó el Programa Olympus MicroDP-BSW para la captura, procesamiento y análisis de las imágenes. De cada imagen tomada se guardó una versión, como evidencia del marcaje real en los núcleos. Los resultados fueron expresados de acuerdo con la nomenclatura ISCN (del inglés: *International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* 2013) (9).

Resultados

Del total de 87 estudios realizados, en cinco no se obtuvo hibridación o resultó muy débil la señal, por lo que estos casos no resultaron útiles para el diagnóstico.

De 42 muestras marcadas con sonda LSI BCR/ABL, 34 correspondían a un posible diagnóstico de LMC y de ellas, sólo 18 resultaron positivas (figura 1); en 17 muestras se observó un patrón típico de hibridación y en una, un patrón atípico. Las ocho muestras restantes marcadas con esta sonda, eran pacientes con LLA al inicio de la enfermedad, todas fueron negativas.

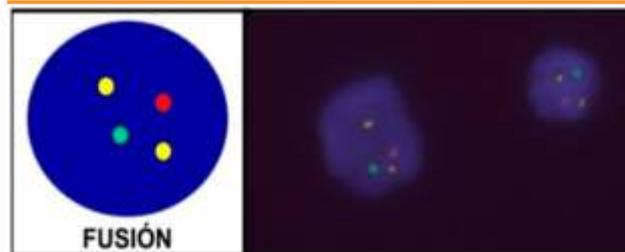


Fig. 1. Patrón de señales observado con la Sonda LSIBCR/ABL Dual color, para detectar la t (9; 22) mediante la técnica de FISH. El cromosoma 9 normal de la señal roja; el cromosoma 22 normal, la señal verde; y los derivados de los cromosomas 9 y 22 se observan señales de fusión en amarillo.

Se aplicó una sonda LSI MLL a una muestra de un paciente con LLA de debut para detectar translocaciones que involucran la región 11q23; no se detectó ningún rearrreglo en ese locus.

Se marcaron con sonda LSI PML/RARA para la detección de



Electroforesis Totalmente Automatizada Gel de Agarosa

- Fácil Automatización
- Un gel en sólo 45 minutos: aproximadamente un resultado de análisis de seroproteínas por minuto.
- Cámara de Migración Seca con Temperatura controlada.
- Alta Eficacia en el control de la temperatura por Peltier.
- Cámara de migración única en su tipo, con 2 o 3 electrodos.
- Fácil interpretación de los resultados.
- Reporta lo que usted ve, combinando la inspección visual del gel y el gráfico.
- Minimiza las pruebas de inmunofijación innecesarias, Maximiza las pruebas de primera línea negativa utilizando el ESTÁNDAR DE ORO: Electroforesis en gel de agarosa.
- Portamuestras desechables.
- Sistema de electroforesis automatizado más pequeño en el mundo.

Para electroforesis de:

Seroproteínas; Lipoproteínas; Hemoglobinas; Proteínas Urinarias y SDS; Inmunofijación; Isoelectroenfoque de LCR y $\alpha 1$ - AT



Ideal para laboratorios pequeños y medianos



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

la t(15;17), un total de 17 muestras con diagnóstico de LPM. De ellas, 10 eran estudios al debut y todas resultaron positivas con patrón típico de hibridación. Siete muestras, que eran casos de reevaluación, resultaron negativas (figura 2).

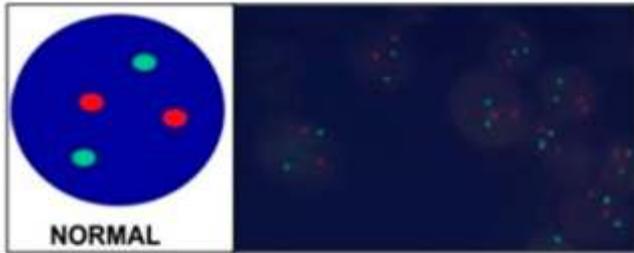


Fig. 2. Patrón de señales observado con la Sonda LSI PML/RARADual color, para detectar la t(15;17) mediante la técnica de FISH. Se observan núcleos negativos a la translocación, ambos cromosomas 15 con la señal roja y los cromosomas 17 con la señal verde.

Ocho muestras fueron marcadas con sonda LSI RUNX1/RUNX1T1 para detectar la t(8;21); de ellas, solo una resultó positiva, la que mostró un patrón típico de señales. Para identificar la inversión del cromosoma 16 se marcaron tres muestras con la sonda LSI CBFb break; todas resultaron negativas.

En las dos muestras marcadas con sonda LSI RB1 (13q14) y en la marcada con LSI TP53 (17p13.1), no se observó la delección.

Se observó un caso positivo con la delección 7q31 (figura 3), de un total de seis muestras estudiadas. Las dos muestras estudiadas para detectar la delección 5q resultaron negativas.



Fig. 3. Patrón de señales observado con la Sonda D75486 para detectar delección 7q31. Señal verde centrómero del 7, señal roja región 7q31. Se observan núcleos positivos. a) filtro DAPI dos señales verdes y una roja (2V, 1R); b) filtro Verde dos señales (2V); c) filtro Rojo una señal (1R).

Discusión

La leucemia es un trastorno clonal de las células progenitoras hematopoyéticas, caracterizada por aberraciones genéticas adquiridas. La formación de proteínas de fusión a partir de reordenamientos cromosómicos, ha contribuido significativamente a la comprensión del mecanismo molecular de la patogénesis de la leucemia. La técnica de FISH es considerada de gran utilidad para la detección de alteraciones cromosómicas y por tanto, desempeña una función crucial en la selección de una terapia dirigida a los diferentes tipos de leucemias (10).

La translocación recíproca t(9;22)(q34;q11.2) provoca la formación del denominado cromosoma Filadelfia (Ph), el cual se encuentra presente aproximadamente en el 90 % de los pacientes con LMC. En el 10 % restante se pueden presentar translocaciones variantes o atípicas, como la delección de secuencias en el cromosoma 9 derivativo, que pueden pasar desapercibidas mediante el estudio de citogenética convencional, por lo que el uso del FISH ayuda a confirmar el diagnóstico (11).

En el presente estudio se obtuvo un menor porcentaje de muestras positivas con la t(9;22), que en otros estudios reportados por diferentes autores (12-14). A pesar de estos resultados, la aplicación del FISH pudo definir la presencia o ausencia de esta translocación, lo que facilitó el diagnóstico diferencial entre la LMC y otras neoplasias mieloproliferativas Ph negativas, pues muchos de los pacientes presentaron trombocitosis y leucocitosis al debut y los estudios de citogenética convencional fueron no útiles. Esta alteración cromosómica se presenta también en alrededor del 5 % de los pacientes pediátricos con LLA y se asocia a un pronóstico desfavorable, lo cual cambió desde el surgimiento de los inhibidores tirosinquinasa como el imatinib, nilotinib, entre otros. Cuando estos medicamentos se administran a pacientes con LLA Ph+ se plantea que el rango de remisión completa es mayor del 90 % y la supervivencia libre de eventos es superior que la de los controles históricos (15).

La LPM se caracteriza por la presencia de la translocación recíproca t(15;17) en alrededor del 90 % de los pacientes. Esta translocación da lugar a la formación del gen de fusión PML/RAR α en el cromosoma 15 derivativo y tiene implicación pronóstica, ya que estos pacientes muestran mejor respuesta al tratamiento con ácido todo trans-retinoico.¹⁶ Todas las muestras de los pacientes al debut de la enfermedad resultaron positivas, lo cual coincide con otros estudios internacionales (17,18). En el 10 % de los pacientes están descritas inserciones crípticas que no son visibles con la citogenética convencional, por lo que el FISH constituye una herramienta útil en el diagnóstico de la LPM.

En el 2 % de los casos existen translocaciones que incluyen rearrreglos del gen RAR α con otros genes, como las t(11;17), t(5;17).⁽¹⁸⁾ En las muestras negativas a la t(15;17) pudieran estar presentes algunas de estas translocaciones lo cual no pudo precisarse por disponer de esas sondas fluorescentes.

La t(8;21) fue la primera alteración citogenética descrita en la LMA. Representa un subtipo particular en la clasificación de la OMS del 2008 con características clínicas y biológicas específicas, asociada a un pronóstico favorable. En este estudio se presentó en el 10 % de la muestra, lo cual coincide con la literatura que reporta una frecuencia entre el 5 y el 10 % en este tipo de leucemia, (3,19). La detección de esta translocación es esencial para el manejo óptimo de estos pacientes y su implicación en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (20).

En la LLC existe un bajo índice mitótico in vitro de las células leucémicas, aun con la utilización de mitógenos. La técnica de FISH

La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos

SEMIAUTOMÁTICOS



V4 Semi Básico

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras diarias. No consume mientras no se usa!



V4 Semi Plus

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras. Con impresora y conectividad. No consume mientras no se usa!

Desde equipos semiautomáticos para pocas muestras diarias, hasta automáticos de alta gama y prestación para una gran carga de trabajo.

Diseñados y producidos en Argentina comercializados en todo el mundo.

AUTOMÁTICOS



V4 Auto Básico

Para laboratorios medianos y modernos, con auto stand by para reducir consumo, impresora y conectividad.



V4 Auto Plus

Es el instrumento para laboratorios grandes, que necesita gestionar sus muestras en forma autónoma y segura, con toda la conectividad necesaria.

Na⁺

K⁺

Cl⁻

Ca⁺⁺

Li⁺



es capaz de superar esta dificultad, por lo que se convierte en una herramienta muy factible para la detección de alteraciones cromosómicas. Esto permite el establecimiento de grupos de riesgo citogenético, entre los que se destacan las deleciones: 13q14.3 asociada a buen pronóstico y 17p13 de pronóstico desfavorable (21,22). En la literatura se reporta como alteración citogenética más frecuente la deleción 13q, en alrededor del 55 % de los pacientes y en el 7 % la deleción 17p.23 Sin embargo, en el presente estudio no se encontró ninguna alteración citogenética en los pacientes con diagnóstico de LLC, lo que puede deberse al limitado número de la muestra.

La evaluación citogenética en los SMD reviste importancia por su implicación pronóstica, basado en el IPSS (del inglés: International Prognostic Scoring System) descrito en 199724 y su revisión en el 2012 (IPSS-R) (25).

La deleción heterocigótica intersticial del cromosoma 5q (del5q) es una de las alteraciones citogenéticas más comunes, reconocida como un subtipo en la clasificación de la OMS. Esta deleción se asocia con un fenotipo clínico característico y una sensibilidad terapéutica a la lenalidomida. Con el uso del FISH se pudieron localizar dos regiones críticas que intervienen en la hematopoyesis, la 5q31 y 5q32-33 (26)

La segunda alteración más frecuente en los SMD es la monosomía del cromosoma 7, en alrededor del 25 %, se puede presentar como una monosomía total con peor pronóstico o como una deleción del brazo largo (del 7q) con pronóstico intermedio. Se reportan tres regiones la 7q22 y dos más teloméricas la 7q31-32 y 7q36, en las cuales están mapeados genes supresores de tumores (27).

Varios estudios multicéntricos reportan la presencia de alteraciones citogenéticas y su implicación pronóstica, (28-30) lo cual concuerda con los resultados de este estudio en el que se observó una del 7q, a pesar de lo pequeño de la muestra.

La aplicación del análisis citogenético en el estudio de los SMD aporta datos de valor pronóstico con importantes implicaciones clínicas y terapéuticas, por lo que se

sugiere la necesidad de realizar el cariotipo en el momento del diagnóstico y durante la evolución de la enfermedad.

A pesar de que la muestra estudiada es pequeña, resulta de gran importancia la incorporación de la técnica de FISH como una herramienta más en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Lo anterior viene dado por las ventajas que presenta respecto a la citogenética convencional como: la mayor rapidez y sensibilidad, su especificidad y la posibilidad de analizar un mayor número de células. Hasta donde se conoce, estos son los primeros resultados obtenidos de la aplicación de esta técnica en el estudio de las leucemias en Cuba.



Referencias Bibliográficas

- Herrera JC, Ramírez GC, Muñeton CM. Estudio de las aneuploidias del cromosoma 17 y la deleción del gen TP53 en neoplasias hematológicas, por la técnica del FISH- bicolor. *Iatrea*. 2008 dic;21(4):364-74.
- Foppa CE. Aplicações da metodologia fish em citogenética de neoplasias 2009. [citado: marzo 15, 2015]. Disponible en: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/132329/20092-CarolinaEFoppa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia. *Blood*. 2010 Jan;115(3):455-73.
- García JA, Giraldo P, López J, Ríos E, Sastre JL, Terol MJ, et al. Guía de consenso nacionales para el estudio y tratamiento de los pacientes con leucemia linfocítica crónica. *Med Clin (Barc)* 2013;141(4):175.e1-e8.
- Codispoti KET, Depalma L. Myelodysplastic syndrome in elderly patients: correlation of CBC with cytogenetic and FISH analysis. *Int J Lab Hematol*. 2010 Aug;32(4):443-8.
- Alfaro J, Legues M, Grebe G. Técnicas de Citogenética. En *Hematología. Técnicas y procedimientos de laboratorio*. Guido Osorio (ed). Santiago de Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 1996. p.159-68.
- Espinete B, Salido M, Solé F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones. Utilidad de la citogenética en el estudio de las neoplasias. *Laboratori de Citogenética i Biologia Molecular. Servei de Patologia. Hospital de Mar de Barcelona*. [citado: marzo 15, 2015]. Disponible en: http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso_Largo_Patologia_Molecular/Citogenetica_molecular.PDF. 15, 2015]. Disponible en: http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso_Largo_Patologia_Molecular/Citogenetica_molecular.PDF.
- Solé F. Bases técnicas del FISH. *Servei de Patologia. Laboratori de Citogenética i Biologia Molecular Hospital del Mar. Barcelona*. [citado: marzo 15, 2015]. Disponible en: https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=065873b3-02a9-452f-9b49-605a3ebcddd&groupId=10157
- Simons A, Shaffer LG, Hastings RJ. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res*. 2013;141(1):1-6.
- Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, et al. Fluorescence

in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res*. 2014 Feb 5;2(1):3.

- Jabbour E, Kantarjian H. Introduction: chronic myelogenous leukemia (CML). *Semin Hematol*. 2007;44(Suppl 1):S1-S3.
- Choi HJ, Kim HR, Shin MG, Kook H, Kim HJ, Shin JH, et al. Spectra of Chromosomal Aberrations in 325 Leukemia Patients and Implications for the Development of New Molecular Detection Systems. *Korean Med Sci*. 2011 Jul;26(7):886-92.
- Dávila MI, Cerda RM, Leal CH, Arana RM, Báez E, Cortés EI. Alteraciones cromosómicas secundarias en pacientes con leucemia mieloide crónica, en un hospital de referencia del noreste de México. *Gac Méd Méx*. 2004 Nov-Dic;140(6):589-92.
- Seong CM. Monitoring the course of chronic myelogenous leukemia by FISH. *Int J Hematol*. 2002 Aug;76:53-7.
- Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, et al. Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood*. 2011 Jun;117(25):6793-800.
- Avvisati G, Lo Coco F, Paoloni FP, Petti MC, Diverio D, Vignetti M, et al. AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. *Blood*. 2011 May;117(18):4716-25.
- Campbell LJ, Oei P, Brookwell R, Shortt J, Eaddy N, Ng A, et al. FISH Detection of PML-RARA Fusion in ins(15;17) Acute Promyelocytic Leukaemia Depends on Probe Size. *Biomed Res Int*. 2013 Mar;2013:1-4 doi: 10.1155/2013/164501
- Sagrillo MR, Cardoso SH, Silva L, Graça C, Ferreira E, Hamerschlag N, et al. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27(2):94-101
- Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *J Biomed Biotechnol*. 2011 May;2011:1-23 doi: 10.1155/2011/104631
- Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV, Grimwade DJ, Hann I, Webb DK, et al. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML10 and 12. *J Clin Oncol*. 2010 Jun;28(16):2674-81.
- Travella A, Bezares R, Rodriguez A, Slavutsky I. Anomalías cromosómicas estructurales nuevas en leucemia linfocítica crónica. Su valor pronóstico. *Hematología*. 2012 Ene-abril;16(1):8-19.
- Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, Frederick LS, Rabe KG, Sharma RG, et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br J Haematol*. 2013 Nov;163(3):326-33.
- Cantú ES, McGill JR, Stephenson CF, Hoffmann HM, Tang L, Yan J, et al. Male- to-female Sex ratios of abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization in a population of chronic lymphocytic leukemia patients. *Hematol Rep*. 2013 Jan;5(1):13-7.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 March;89(6):2079-88.
- Greenberg P, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Sep;120(12):2454-65.
- Komrokji RS, Padron E, Ebert BL, List AF. Deletion 5q MDS: molecular and therapeutic implications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013 Dec;26(4):365-75.
- Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008 Jul;87(7):515-526.
- Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, Pfeilstocker M, Nosslinger T, Tuechler H, et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. *J Clin Oncol*. 2011 May;29(15):1963-70.
- Pozdnyakova O, Miron PM, Tang G, Walter O, Raza A, et al. Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some un defined single chromosomal abnormalities. *Cancer*. 2008
- Schanz J, Tuechler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):820-9.