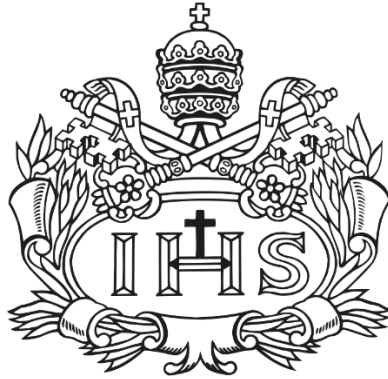


PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO



**Evaluación del desempeño de la tecnología MALDI TOF MS en la identificación de líneas celulares asociadas a leucemias linfocítica y mieloide aguda.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER

presentada por

YURANY DUARTE TORRES.

Tutoras

Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo, PhD.  
Directora

Dra. Sandra Milena Quijano Gómez, PhD.  
Codirectora

Bogotá D.C  
Julio de 2022

## **NOTA**

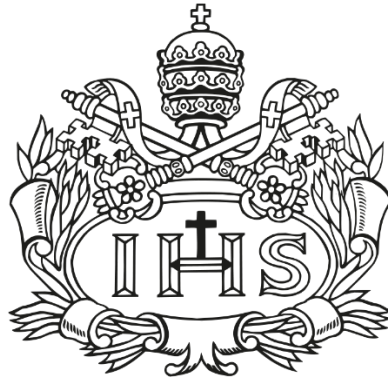
“Este trabajo de grado se ha realizado teniendo en cuenta las bases establecidas en el documento aprobado por el ministerio de educación que establece el programa de maestría en ciencias del laboratorio clínico, de la facultad de ciencias de la pontificia universidad Javeriana..

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**Evaluación del desempeño de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de líneas celulares asociadas a leucemias linfocíticas y mieloides agudas.**



YURANY DUARTE TORRES.

---

**Claudia Marcela Parra Giraldo, PhD.**  
Directora

---

**Sandra Milena Quijano Gómez, PhD.**  
Codirectora

Bogotá D.C  
Julio de 2022

**Evaluación del desempeño de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de líneas celulares asociadas a leucemias linfocíticas y mieloides agudas.**



**YURANY DUARTE TORRES**

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser 'Andrés Ceballos Garzón', escrita sobre una línea horizontal.

**Andrés CEBALLOS GARZÓN, PhD**

Bogotá D.C  
Julio de 2022

**Evaluación del desempeño de la tecnología MALDI TOF en la identificación de líneas celulares asociadas a leucemias linfocíticas y mieloide aguda.**



**YURANY DUARTE TORRES**

---

**Jhon Jairo Sutachán, PhD.**  
**Director de Posgrado**  
**Facultad de Ciencias**

---

**Alba Alicia Trespalcios, PhD.**  
**Decana**  
**Facultad de Ciencias**

Bogotá D.C.,  
Colombia  
Julio de 2022

## DEDICATORIA

*A Dios, al autor de mi vida, a quien le pertenecen mis fuerzas, a mi patrocinador de sueños, a mi fiel compañero, te doy gracias porque en mis noches más oscuras y en los días más brillantes te tengo a ti*

*A mis padres, quienes sembraron sueños en mí, los llevo en mi vida siempre como ejemplo de lucha, sacrificio y amor incondicional, nos hizo falta vida para compensar la vida que me dieron.*

*A mis hermanos por ser el motor de cada sueño, por cada palabra de ánimo, por cada conexión al corazón que hacemos.*

*A mi Isa, mi pequeña gran maestra, viniste al mundo abriendo camino con amor.*

*A Javi por llenarme la vida de amor, gracias por cada esfuerzo y tu incondicional apoyo.*

*A mi jefe y amiga Betty Amaya, quien ha inspirado mi vida, quien ha apoyado cada sueño, gracias por tu ánimo y por cada palabra precisa, por sentir como tuyos mis logros.*

*“Señor, delante de ti están todos mis deseos,  
Y mi suspiro no te es oculto”  
Salmos 38:9*

*“La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio”*

**Marie Curie**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Claudia Parra, por su dirección, asesoría y confianza para desarrollar el proyecto, a la Dra Sandra Quijano por su inmenso compromiso y acompañamiento, a Daniela Amado, por su permanente asesoría, por inspirarme con su ejemplo en este proceso de investigación, a Cindy Arévalo, Natalia Murillo y al Grupo de Inmunobiología y Biología celular de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo con las diferentes líneas celulares, al semillero del laboratorio de Proteómica y Micosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana por haberme acogido en el grupo y por poner a mi disposición la infraestructura y reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto, a mis compañeros y amigos de la maestría y finalmente gracias a la Pontificia Universidad Javeriana, a la facultad de ciencias por mi formación académica y el apoyo económico, gracias por hacer posible este proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

Índice de tablas .....	12
Índice de figuras.....	13
Abreviaturas .....	14
1. Resumen .....	15
2. Abstract.....	16
3. Alcance y definición del problema de investigación .....	17
4. Marco teórico .....	19
4.1 Leucemias agudas (LA).....	19
4.1.1 Definición .....	19
4.2 Epidemiología de las leucemias agudas.....	20
4.3 Clasificación .....	21
4.4 Diagnóstico.....	23
4.5 Pronóstico .....	35
4.7 Terapia de inducción de remisión .....	38
4.8 Terapia de consolidación .....	38
4.9 Terapia de mantenimiento .....	39
4.10 Estudios proteómicos en leucemias agudas .....	39
4.11 Proteómica.....	39
4.12. Herramientas proteómicas:.....	40
4.12.1. Métodos basados en anticuerpos.....	40
4.12.2. Métodos basados en gel.....	40
4.12.3. Métodos basados en cromatografía .....	41
5 Objetivos .....	44
5.1 Objetivo general .....	44
5.2 Objetivos específicos .....	44
6 Metodología .....	45
6.1 Cultivo de Células Leucémicas .....	45
6.2 Protocolo de extracción de proteínas.....	47
6.3 Obtención de los espectros en Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) 48	
6.4 Análisis en MALDI-TOF MS .....	49
6.5 Construcción de la biblioteca:.....	50

6.6 Validación de la biblioteca de líneas celulares derivadas de LMA y LLA. ....	51
7 Resultados .....	51
7.1 Construcción de la biblioteca .....	51
7.2 Validación .....	55
7.2.1 Validación final .....	58
8. Discusión .....	60
9. Conclusiones .....	63
10. Perspectivas y aplicaciones.....	64
ANEXOS.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	72

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Clasificación leucemias agudas.</b>	21
<b>Tabla 2. Alteraciones citogenéticas en pacientes con leucemia promielocítica</b>	23
<b>Tabla 3. Resumen de características diagnosticas LMA NOS modificada de Ricard Brunning</b>	23
<b>Tabla 5. Estratificación del riesgo de pacientes con LMA por de acuerdo con las alteraciones genéticas según las recomendaciones de la European Leukemia Net año 2017.</b>	36
<b>Tabla 6. Características de las líneas celulares derivadas de leucemias mieloide aguda y leucemia linfoide aguda.</b>	45
<b>Tabla 7. Puntajes de identificación ajustados por BrukerDaltonics a la tecnología MALDI -TOF MS.</b>	50
<b>Tabla 8. Tipos de espectros en crudo obtenidos de acuerdo a las líneas celulares.</b>	51
<b>Tabla 9. MSP generados por cada una de las líneas celulares</b>	53
<b>Tabla 10. Gráficas de PCA</b>	67
<b>Tabla 11. Gráficas de dendrograma</b>	69
<b>Tabla 12. Gráficas de mapas de calor por línea celular</b>	71

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Descripción técnica de MALDI-TOF MS</b> .....	43
<b>Figura 2. Modelo de hematopoyesis con las diferentes líneas celulares</b> .....	47
<b>Figura 3. Proceso de extracción de proteínas en líneas celulares</b> .....	48
<b>Figura 4. Comparación MSP</b> .....	52
<b>Figura 5. Espectros línea celular REH y REH_R (Región)</b> .....	55
<b>Figura 6. Validación línea K562</b> .....	56
<b>Figura 7. Validación línea REH</b> .....	56
<b>Figura 8. Validación línea celular OCI-AML3</b> .....	57
<b>Figura 9. Validación línea celular U-937</b> .....	57
<b>Figura 10. Dendrograma MSP outgroup línea celular CaCo2 adenocarcinoma colón. ....</b>	58
<b>Figura 11. Dendrograma MSP outgroup línea celular DU145 cáncer de próstata</b> .....	59

## Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
LA	Leucemias agudas
LMA	Leucemia mieloide aguda
LLA	Leucemia linfoide aguda
EM	Espectrometría de masas
MALDI-TOF	Tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz por espectrometría de masas
SELDI- TOF	Surface-enhanced laser desorption/ionization
EMR	Enfermedad mínima residual
RNA	Ácido ribonucleico
FISH	Hibridación in situ fluorescente
SNC	Sistema nervioso central
MSP	Biblioteca principal de espectros (Main Spectra Library)
SEER	The Surveillance, Epidemiology and End Results
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
SNC	Sistema nervioso central

## 1. Resumen

Las leucemias agudas (LA) son un grupo de neoplasias hematopoyéticas, caracterizadas por la proliferación maligna de blastos que tienen la capacidad de infiltrar sangre periférica, médula ósea, otros órganos y sistemas. La leucemia linfocítica aguda predomina en la población infantil, mientras que la leucemia mieloide aguda es más frecuente en adultos, el diagnóstico de leucemias agudas requiere de un grupo de trabajo interdisciplinario que integra a la morfología, estudio del inmunofenotipo, inmunohistoquímica de biopsia de médula ósea, citogenética y estudios de biología molecular, recientemente con la aparición de las ciencias ómicas se ha revolucionado el estudio de diversas enfermedades, entre ellas las leucemias agudas, la proteómica tiene un rol importante en la identificación de nuevos biomarcadores que fortalecen la medicina de precisión en este tipo de neoplasias, con el análisis del proteoma se ha descrito que se pueden clasificar y discriminar los diferentes subtipos de leucemia aguda, una de las técnicas más usadas es MALDI TOF MS (tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz por espectrometría de masas).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el desempeño de la tecnología MALDI TOF MS en la identificación de líneas celulares derivadas de leucemia linfocítica aguda B (Reh) y leucemias mieloides agudas (K562, OCI-AML3 y U937), mediante la obtención y análisis de los espectros de masas obtenidos mediante MALDI TOF MS en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda y de leucemia linfocítica aguda B, así como evaluar la capacidad de discriminación entre sí. Para ello se realizó extracción de proteínas, análisis y comparación de cada una de las líneas celulares por MALDI TOF MS.

Se encontró que la tecnología MALDI-TOF MS fue eficiente para diferenciar líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda y linfocítica aguda, con un buen análisis y una adecuada selección de espectros se lograron crear MSP derivados de las bibliotecas con la capacidad de discriminar las diferentes líneas celulares.

Con la restricción de un rango de masas en la línea celular linfocítica Reh, se observó que en la región entre 7000 y 13500 m/z se retienen los picos más significativos y se eliminan picos con un comportamiento similar, evitando identificaciones cruzadas entre las líneas celulares.

El apoyo diagnóstico a futuro de MALDI-TOF MS, beneficia a los laboratorios responsables de leucemias agudas en la reducción de tiempos, recursos e inicio temprano de terapias que repercuten en la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

## 2. Abstract

Acute leukemias (AL) are a group of hematopoietic neoplasms, characterized by the appearance of malignant blasts that have the ability to infiltrate peripheral blood, bone marrow, other organs and systems. Acute lymphoid leukemia predominates in children, while acute myeloid leukemia is more frequent in adults, the diagnosis of acute leukemia requires an interdisciplinary work group that integrates morphology, immunophenotype study, bone marrow biopsy immunohistochemistry, cytogenetics and molecular biology studies, recently with the appearance of omic sciences the study of various diseases has been revolutionized, including acute leukemias, proteomics has an important role in the identification of new biomarkers that strengthen precision medicine in this type of neoplasms, with the analysis of the proteome it has been described that the different subtypes of acute leukemia can be classified and discriminated, one of the most used techniques is MALDI TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight by spectrometry mass).

The objective of this work was to evaluate the performance of MALDI TOF MS technology in the identification of cell lines derived from acute lymphoid leukemia B (Reh) and acute myeloid leukemias (K562, OCI-AML3 and U937), by obtaining and analyzing the mass spectra obtained by MALDI TOF MS in cell lines derived from acute myeloid leukemia and acute lymphoid leukemia B, as well as to evaluate the ability to discriminate between them. For this, protein extraction and analysis of each of the cell lines by MALDI TOF MS was performed.

It was found that the MALDI-TOF MS technology was efficient to differentiate cell lines derived from acute myeloid and acute lymphoid leukemia, since with good analysis and an adequate selection of spectra, MSP derived from the libraries with the ability to discriminate the different cell lines.

With the restriction of a range of masses in the Reh lymphoid cell line, it is ruled out that in the region between 7000 and 13500 m/z the most significant peaks are retained and peaks with a similar behavior are eliminated, preventing cross-line identifications between the cell lines.

The future diagnostic support of MALDI-TOF MS benefits the laboratories responsible for acute leukemias in reducing time, resources and early initiation of therapies that have an impact on improving the quality of life of patients.



### 3. Alcance y definición del problema de investigación

Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas malignas con características clínicas, morfológicas, inmunológicas y moleculares heterogéneas. La diferenciación y clasificación entre leucemias linfoides y mieloides se realiza mediante el empleo de herramientas de laboratorio especializadas como la citometría de flujo multiparamétrica. Para el diagnóstico, clasificación y caracterización de estas neoplasias, se requiere de la combinación de estudios de morfología, patología, citometría de flujo, inmunohistoquímica, técnicas citogenéticas y de biología molecular. En la actualidad, la clasificación de LA publicada por la Organización Mundial de la Salud, en el año 2016, integra estos criterios y ha definido varias categorías de leucemias que incluyen la “Leucemia mieloide aguda y neoplasias relacionadas” y las leucemias agudas linfoides agudas incluyendo la “Leucemia linfoblástica B/linfoma y Leucemia linfoblástica T/linfoma”. (1) (2)

El diagnóstico morfológico tiene como fundamento la identificación microscópica celular mediante una adecuada coloración de Wright y junto con la experticia del observador es el primer eslabón en el diagnóstico de LA (3), así mismo en la primera etapa diagnóstica se encuentra la citometría de flujo que permite analizar células y partículas individuales a alta velocidad, suspendidas dentro de un fluido que interacciona con una fuente de luz. Su uso clínico es el análisis multiparamétrico de poblaciones celulares (inmunofenotipo) con elevada sensibilidad y especificidad, importante en el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas. Por otra parte, las técnicas de citogenética convencional y de biología molecular son útiles en la estratificación de riesgo de las LA, se aplican en la rutina clínica en la definición del pronóstico y pueden predecir la respuesta de los pacientes a la terapia convencional. (4)

La correcta identificación de las células blásticas tumorales tanto en morfología hematológica medular como en el inmunofenotipo son imperativas para un adecuado y oportuno diagnóstico de las LA, para la selección de terapias y se emplean como parte de las estrategias de seguimiento de la enfermedad.

Recientemente el estudio de la proteómica ha cobrado gran fuerza en el diagnóstico temprano de algunas enfermedades, pronóstico y monitoreo del desarrollo de estas. La proteómica se aplica en la caracterización, expresión, estructura, funciones, interacciones y modificaciones post-traduccionales del proteoma. La proteómica es una de las ciencias más importantes para comprender la función de los genes, brindando más información sobre los procesos celulares que la genómica y el estudio de RNA mensajero. Por ejemplo, este último no brinda información para deducir la expresión de una proteína en específico, esto debido a que durante el *splicing* se eliminan todos los intrones de manera que los exones se reorganicen de diferentes maneras dando lugar a varias proteínas a partir de un solo gen.)(5)

Para entender adecuadamente la biología de una neoplasia hematopoyética, es importante resaltar, que si bien el genoma es constante, el proteoma por el contrario presenta una diversidad estructural, debido a modificaciones post traduccionales en diferentes procesos celulares aportando gran información sobre la heterogeneidad de las células neoplásicas. (6) Una de las aplicaciones más interesantes ha sido la comprensión de la biología de neoplasias hematológicas como las LA. De manera particular, la técnica de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), ha sido una herramienta fundamental en la investigación de biomarcadores en cáncer, para la clasificación de tumores, evaluación de pronóstico y monitoreo de respuesta a medicamentos. Dentro de sus ventajas, se encuentra que al ser una técnica versátil, de fácil uso, rápida y rentable, importante para la detección de un amplio espectro de biomoléculas a bajas concentraciones, su aplicación repercute en reducción del tiempo de análisis y finalmente reducción de costos de hospitalización, mejora de la calidad de vida de los pacientes y reducción de la mortalidad, como en el caso preciso de la evaluación de enfermedad mínima residual post-tratamiento.(7,8)

Los estudios en LA por Hegedus y cols, han mostrado que la espectrometría de masas se puede utilizar con éxito para analizar proteínas expresadas diferencialmente entre LMA y LLA. Estos resultados sugieren que las diferencias en el proteoma pueden mejorar la comprensión de las etiologías de las leucemias y ayudar en el proceso de diagnóstico. Si bien, esta herramienta proteómica aún no se emplea en la rutina clínica para diagnóstico, puede orientarse a futuro para identificar biomarcadores que permitan entender de manera integral la biología de estas patologías hematológicas. (9)

Una de las técnicas ampliamente usadas en el diagnóstico y caracterización de LA es la citometría de flujo, sus ventajas son destacables como el estudio de poblaciones celulares heterogéneas, análisis de subpoblaciones en pocos minutos, alta precisión y purificación de subpoblaciones pequeñas o complejas, análisis simultáneo de múltiples parámetros, sin embargo esta herramienta es costosa y los equipos requieren calibración y compensación de fluorescencias para su uso, así como mantenimiento preventivo y correctivo por ingeniería. La técnica MALDI TOF se destaca por su bajo costo en suministros, mejoras en tiempos de procesamiento, su precisión general del 95% respecto a resultados obtenidos por biología molecular es una de las ventajas más significativas, el tiempo de respuesta es inferior a 10 minutos, pero desafortunadamente no es una herramienta adecuada para detectar una baja cantidad de células en muestras paucicelulares como líquido cefalorraquídeo, por ejemplo. (10,11)

Investigaciones recientes muestran que la combinación de MALDI-TOF con otras técnicas como la citometría de flujo da la oportunidad de analizar diferentes subpoblaciones celulares en LMA. Así como apoyar de manera significativa estudios genómicos. Aunque el análisis proteómico de muestras de plasma humano parece convertirse en una prueba de rutina en un futuro próximo,

la proteómica basada en espectrometría de masas en muestras de leucemias agudas para ensayos clínicos parece requerir más consenso e investigaciones. (12)

En consecuencia, este estudio obedece a la necesidad de comparar los espectros para LMA y LLA con MALDI-TOF MS para optimizar la identificación de blastos tumorales, dada la nula disponibilidad en centros de referencia oncológicos de bibliotecas de espectros para clasificar la leucemia.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 Leucemias agudas (LA)**

#### **4.1.1 Definición**

Las LA corresponden a un grupo de neoplasias de origen hematopoyético que se derivan de la proliferación neoplásica de células madre hematopoyéticas comprometidas o no en su diferenciación hacia linaje mieloide o linfoide. Desde el punto de vista de la biología de la enfermedad, estas células son portadoras de diversas alteraciones genéticas y moleculares, que conducen a la alteración de las rutas de señalización celular, los mecanismos de muerte celular, a la interacción de estas células con el microambiente, al desarrollo de mecanismos de resistencia y desde el punto de vista clínico, al fallo de la médula ósea y a daño tisular (13). Para la adecuada clasificación de la leucemia intervienen diferentes disciplinas con el objetivo de ofrecer un diagnóstico correcto. Un diagnóstico temprano, así como una clasificación precisa de la leucemia son factores determinantes para un tratamiento y pronóstico precisos. De esta manera, el uso de nuevas técnicas con alta precisión y sensibilidad serán útiles tanto en el diagnóstico oportuno, así como en el aporte de información novedosa que contribuya a definir y mejorar la estratificación del pronóstico y la selección de terapias adecuadas. (1)

De manera particular, la leucemia mieloide aguda (LMA) resulta de anomalías genéticas en los precursores de las células madre mieloides con bloqueo en los procesos de diferenciación celular y la proliferación conduciendo a que en la médula ósea se acumulen y expandan células tumorales (blastos y otras células más comprometidas en etapas más avanzadas de la diferenciación celular) infiltrando la médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) con capacidad de infiltración extramedular en órganos como la piel, el hígado, el bazo, ganglios linfáticos, etc. (13) Mientras que las leucemias linfoides agudas (LLA) se caracterizan por comprometer precursores linfoides de origen B o de origen T, desde el punto de vista epidemiológico, es el tipo de leucemia más frecuente en la población infantil, especialmente en niños menores de 6 años, sin embargo se describe un segundo pico en pacientes mayores de 60 años. (14)

## **4.2 Epidemiología de las leucemias agudas**

Según la literatura la LMA afecta principalmente a adultos, se ha documentado que constituye alrededor del 80% de todos los casos de leucemias en adultos. En estados Unidos y Europa, la incidencia reportada es de 3-5 casos/100.000 habitantes (15), según la American Cancer Society se espera que en el 2022, en Estados Unidos, se diagnostiquen cerca 6.660 nuevos casos de LLA (incluyendo adultos y niños) y que se produzcan alrededor de 1560 muertes causa de esta entidad (16), la población infantil es la más afectada por este tipo de leucemia, mientras que la LMA afecta principalmente a adultos y se estima que para este mismo año sean diagnosticados cerca 20.050 nuevos casos de LMA, la mayoría será en adultos y alrededor de 11 540 muertes por LMA, casi todo será en adultos. (17)

De acuerdo con el programa *The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)* del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos,(20)proporciona información sobre estadísticas de cáncer en la población americana, en su reciente entrega para el año 2022 se estiman 60.650 nuevos casos de leucemia, aportando el 3.2% de todos los nuevos casos de cáncer, las muertes estimadas son cercanas a 24.000, 3.9% de todas las muertes de cáncer. (20)

Los reportes demográficos de GLOBOCAN de marzo de 2021, muestran que en Colombia la leucemia se encuentra en el noveno lugar de incidencia con 3367 nuevos casos reportados, con 2 419 muertes, aportando así el 4.4% de todas las muertes de cáncer en el país, la incidencia por sexo es mayor en hombres.(18)

Según el Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, a 1 de septiembre de 2021 hay 11 tipos de cáncer priorizados por el Ministerio de Salud y protección social, la LLA representa el noveno lugar de frecuencia con el 1,06% la LMA se encuentra en el último lugar de frecuencia con el 0,61% de los nuevos casos reportados en hombres y mujeres y en todos los rangos de edades. A fecha del 30 de abril de 2021, se reportaron 1238 casos de leucemia linfocítica aguda en población adulta. (19)

La mediana de edad en adultos al diagnóstico es de aproximadamente 65 años, se destaca que la incidencia aumenta con la edad con aproximadamente 2 casos/100.000 habitantes en menores de 65 años, mientras que en mayores de 65 años la incidencia es de 20 casos/100.000 habitantes. De esta manera, la edad se asocia de manera negativa al pronóstico. La relación de presentación de leucemia mielocítica aguda en hombre/mujer es de aproximadamente 5:3. (21)

En algunos grupos de pacientes se han detectado como factores causales la quimioterapia previa o ciertas exposiciones ambientales como químicos, exposición a radiación o tabaco, sin embargo, en la gran mayoría de los casos se debe a alteraciones cromosómicas o genéticas (22). En pacientes adultos, la aparición de la LMA puede resultar de la evolución clonal de

desórdenes previos como síndrome mielodisplásico, síndromes mieloproliferativos, hemoglobinuria paroxística nocturna o anemia aplásica. (23)

La LLA se presenta en aproximadamente el 60% de los casos en pacientes menores de 20 años, se reporta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres. La tasa de supervivencia es cercana al 90%, la mayoría de las muertes por LLA ocurre en adultos. Se ha descrito que esta neoplasia puede ser el resultado de exposiciones endógenas, exógenas y susceptibilidad genética.(24)

### 4.3 Clasificación

Anteriormente, en el año 1976 el grupo cooperativo Franco Estadounidense Británico (FAB) clasificaba a las leucemias agudas de acuerdo a hallazgos morfológicos (como se describe en la tabla 3) y reacciones citoquímicas presentes en los blastos, sin embargo, con la aparición y fortalecimiento de nuevas herramientas diagnósticas como el cariotipo, inmunofenotipo y con el desarrollo de la biología molecular, desde 2008 la OMS ha realizado una nueva clasificación incluyendo dichas ayudas diagnósticas, en 2016 se realiza una actualización, siendo este el actual esquema de clasificación, como se muestra en la tabla 1: (25)

**Tabla 1. Clasificación leucemias agudas.**

<b>Leucemia mieloide aguda y neoplasias relacionadas</b>
LMA con anomalías genéticas recurrentes
▪ LMA con t(8;21) (q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
▪ LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
▪ LPA con <i>PML-RARA</i>
▪ LMA con t(9;11) (p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
▪ LMA con t(6;9) (p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
▪ LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
▪ LMA (megacarioblástica) con t(1;22) (p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
▪ LMA con <i>NPM1</i> mutado
▪ LMA con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i>
LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia
Neoplasias mieloides relacionadas con el tratamiento
<b>LMA, NOS</b>
▪ LMA con diferenciación mínima
▪ LMA sin maduración
▪ LMA con maduración

▪ Leucemia mielomonocítica aguda
▪ Leucemia monoblástica/monocítica aguda
▪ Leucemia eritroide pura
▪ Leucemia megacarioblástica aguda
▪ Leucemia basófila aguda
▪ Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down
▪ Mielopoyesis anormal transitoria (MAT)
▪ Leucemia mieloide asociada con el síndrome de Down
<b>Leucemia/linfoma linfoblástico B</b>
Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS
Leucemia/linfoma linfoblástico B con anomalías genéticas recurrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(9;22) (q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> reorganizado
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(12;21) (p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B con hiperdiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico B con hipodiploidía
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(5;14) (q31.1;q32.3) <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B con t(1;19) (q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B, similar a <i>BCR-ABL1</i> *
Leucemia/linfoma linfoblástico B con <i>iAMP21</i> *
<b>Leucemia/linfoma linfoblástico T</b>

*Modificado de American Society of Hematology, de Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127:2391.*

La leucemia promielocítica aguda (LPA), anteriormente clasificada como LMA-M3, ahora pertenece al grupo de LMA con anomalías genéticas recurrentes. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de promielocitos tumorales en la MO portadores de la t(15;17) (q22;q21) en aproximadamente el 98% de los pacientes. Producto de esta alteración cromosómica se origina la proteína de fusión PML/RARa. En el año 1993 se relacionó la región 17q21 en todas las alteraciones cromosómicas como en la t(11;17)(q23;q21) y t(5;17)(q35;q21) (las demás traslocaciones se describen con sus respectivos genes de fusión en la tabla 2), razón por la cual se infirió que en esta región cromosómica se regulan funciones relacionadas con la hematopoyesis normal, hoy se sabe que en esta región se codifica el gen para el receptor alfa del ácido retinoico, la alteración de la misma es vital para entender la patogénesis de la

enfermedad. En el cromosoma 15 se ubica el gen PML (Leucemia promielocítica). Este reordenamiento da como resultado un gen de fusión PML/RARalfa, bloqueando la diferenciación mieloide en el estadio de promielocito. (26–28)

**Tabla 2. Alteraciones citogenéticas en pacientes con leucemia promielocítica**

Traslocación	Genes de fusión
t(15;17) (q24.1;q21.2)	PML/RARA
t(11;17) (q23;q21.1)	PLZF/RARA
t(5;17) (q35;q21.1)	NPM/RARA
t(11;17) (q13;q21.1)	NuMA/RARA
t(17;17) (q21;q21)	STAT5B-RARA
t(X;17) (q11;q21.1)	BCOR/RARA

Modificado de Lavau C, Dejean A. The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*.1994;8(10):1615-21

#### 4.4 Diagnóstico

Ante la sospecha clínica de LA, el diagnóstico se realiza por un grupo interdisciplinario que incluye: la evaluación morfológica, inmunofenotipo, análisis citogenético y pruebas genéticas moleculares. De acuerdo a la clasificación vigente de la OMS del año 2016, para el diagnóstico requiere la presencia de al menos 20% de blastos en SP o en MO, o la presencia de anomalías genéticas únicas que se encuentran en la médula ósea independientemente del recuento de blastos. (29)

La biopsia de MO proporciona información diagnóstica como la celularidad, evaluación de células hematopoyéticas e infiltración por blastos de LMA, determinados con ayuda de coloraciones de inmunohistoquímica que aportan información diagnóstica y pronóstica. Para que la muestra de biopsia sea óptima y útil, el Colegio Americano de Patólogos (CAP) y la Sociedad Americana de Hematología recomienda que la muestra sea de al menos 1 cm y debe contener regiones hematopoyéticas intactas, evitando regiones corticales o subcorticales. (30)

**Tabla 3. Resumen de características diagnosticas LMA NOS modificada de Ricard Brunning**

	Hallazgos morfológicos	Inmunofenotipo
Leucemia mieloide aguda indiferenciada (LMA M0)	Blastos ≥ 20%, sin evidencia de diferenciación. MPO	Blastos ≥ 20%, CD13, CD33 y/o CD117+, ausencia de marcadores

		negativa, ausencia de bastones de Auer.	linfoides específicos, TdT +/-.
Leucemia mieloide aguda sin maduración (LMA M1)		Blastos $\geq 20\%$ - $90\%$ , $< 10\%$ de promielocitos, formas intermedias y neutrófilos. MPO positiva $\geq 3\%$ , bastones de Auer +/-.	Blastos $\geq 20\%$ , CD13, CD33 o CD117+.
Leucemia mieloide aguda con maduración (LMA M2)		Blastos $\geq 20\%$ , $\geq 10\%$ de promielocitos y neutrófilos, monocitos $< 20\%$ , bastones de Auer +/-, displasia frecuente en neutrófilos	Blastos $\geq 20\%$ CD13, CD33 o CD117+.
Leucemia mielomonocítica aguda LMA (M4)		Blastos $\geq 20\%$ , $\geq 20\%$ de neutrófilos y precursores monocíticos, células monocíticas positivas para esterasa no específica, monocitosis en sangre periférica, bastones de Auer +/-.	Los blastos expresan de forma variable CD13, 33 y 117. Número variable de células que expresan marcadores monocíticos CD14, CD4, CD116, CD11b, CD11c, 36, 64, lisozima.
Leucemias monocíticas agudas		$\geq 20\%$ de mieloblastos, monoblastos y promonocitos; $> 80\%$ de células monocíticas de la MO, predominio de promonocitos y monocitos; positividad para esterasa no específica de; Cuerpos de Auer +/-.	Las células monocíticas expresan de forma variable CD14, CD4, CD11c, CD64, CD68, CD36 y lisozima. CD33 puede expresarse de forma brillante. CD13 y CD117 expresados de forma variable.
- Leucemia monocítica aguda diferenciada (LMA M5b)			
Leucemia monoblástica aguda (LMA M5a)		$\geq 20\%$ de mieloblastos, monoblastos y promonocitos; $\geq 80\%$ de células monocíticas en MO, predominantemente monoblastos; positividad para esterasa no específica, MPO negativa; Cuerpo de Auer raros.	Las células monocíticas expresan de forma variable CD13, CD33 y CD117. Las células expresan CD4, CD36, CD64, CD11c y lisozima.
Leucemias eritroide pura (LMA M6)		$\geq 80\%$ del linaje eritroide en MO; Predominio de	Las células más maduras pueden



			proeritroblastos y eritroblastos basófilos; citoplasma vacuolado y PAS+; núcleo megaloblastoide; sin aumento significativo de mieloblastos; Cuerpos de Auer -.	expresar glicoforina A y hemoglobina A. Generalmente CD36+ pero no específico.
Leucemia megacarioblástica aguda (LMA M7)			≥20% de las células de la MO son mieloblastos y/o megacarioblastos; con evidencia de megacariocitos displásicos más maduros. Los micromegacariocitos pueden ser numerosos tanto en MO como en SP.	Células megacariocíticas CD41 y/o CD61 +; Factor VIII + en cortes de tejido en megacariocitos en maduración.
Leucemia basofílica aguda (LMA M8)			≥20% de blastos; evidencia de diferenciación a basófilos por microscopía óptica o electrónica. Los basófilos generalmente son positivos con tinciones metacrómicas.	Los blastos expresan CD13, CD33 y con frecuencia marcadores tempranos de hematopoyesis, CD34 y HLA-DR.
Panmielosis aguda con mielofibrosis			Generalmente pancitopenia; anisopoiquilocitosis de glóbulos rojos mínima o nula; MO hiper celular con grado variable de hiperplasia de varios linajes mieloides; la displasia puede ser marcada particularmente en megacariocitos; aumento de células inmaduras, incluidos blastos; mielofibrosis moderada a marcada.	Grado variable de reactividad de las células de la MO con anticuerpos frente a MPO, lisozima, hemoglobina A, glicoforina A, factor VIII y CD61.

Sarcoma mieloide	Masa extramedular de blastos con grado variable de maduración; algunos blastos MPO+ y / o lisozima +; los eosinófilos inmaduros y maduros pueden ser prominentes; promielocitos y neutrófilos más maduros cloroacetato esterasa +; con poca frecuencia masa tumoral compuesta por células monocíticas, eritroblastos o células megacariocíticas.	Los blastos expresan de forma variable CD13, CD33 y CD117. Los tumores monoblásticos expresan lisozima y marcadores monocíticos; marcadores linfoides -.
------------------	--	--

*Modificado de Brunning RD. Classification of acute leukemias. Semin Diagn Pathol. 2003 Aug;20(3):142-53.*

El papel de la citogenética convencional radica en su importancia pronóstica a nivel general de las LA, actualmente soporta la clasificación y estratificación, así como la elección de la terapia inicial y posterior a la remisión. Mediante esta técnica se han descrito anomalías clonales en el 40% al 50% de los pacientes con LMA.(30)

Las pruebas genéticas moleculares y técnicas como el FISH deben considerarse complementarias a un análisis citogenético convencional adecuado. A menos que el análisis citogenético sea subóptimo debido a una mala morfología cromosómica o a células insuficientes para el análisis o no tenga éxito debido a la falta de crecimiento, el análisis FISH es una tecnología costosa. En general, se han propuesto enfoques algorítmicos para usar citogenética convencional y FISH. (30)

El análisis por citometría de flujo debe ser preciso para distinguir la LMA aguda, la LLA T, la LLA B y la leucemia aguda de linaje ambiguo. (30)

Uno de los retos en las LA es entender adecuadamente y con precisión la biología de estas neoplasias con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores que aporten al diagnóstico y definición del pronóstico, así como comprender desde el punto de vista de la biología de la enfermedad, los mecanismos de leucemogénesis, lo que repercute en el desarrollo de nuevas terapias. De manera particular, en los últimos 20 años con el desarrollo de la proteómica se han incentivado estudios que pretenden estudiar con mayor profundidad la expresión, estructura y función de las proteínas involucradas en la biología y evolución de estas enfermedades. (8,31)

Un estudio de Kwak y cols publicado en 2004, reportó ocho proteínas que se expresaron de manera diferencial en los sueros de 12 pacientes diagnosticados con LMA, en comparación con sueros de 12 individuos sanos. Se logran identificar 7/8 proteínas, dentro de las cuales se encontraban reguladas a la alza en LMA, la variante de genes de cadena pesada de inmunoglobulina, subunidad 1 del proteosoma 26S, subunidad 1 de la ATPasa 1 y Haptoglobina-1. Desde el punto de vista funcional, estas proteínas participan en el proceso de leucemogénesis, progresión del ciclo celular, apoptosis, reparación del daño al ADN y angiogénesis entre otras. De otro lado, las siguientes proteínas se encontraron reguladas a la baja:  $\alpha$ -2-HS-glicoproteína, proteína asociada al complemento SP-40, 40, producto del gen RBP4, lipoproteína C-III y una proteína desconocida con un punto isoeléctrico de 5,58; de manera general sus funciones más importantes se relacionan con regulación de la proliferación celular, protección contra la apoptosis y contra la lisis regulada por complemento. (32)

Cui JW y cols, publicaron en el año 2004 un estudio donde se analizaron los perfiles proteicos de la LMA y la LLA, encontrando por primera vez que las proteínas relacionadas con el linaje mielóide Mrp8 y Mrp14 marcaban la diferenciación de la LMA con la LLA. La Hsp de 27 kDa y otras proteínas que están altamente expresadas en LLA pueden desempeñar un papel importante en la distinción de la LMA de la LLA (33)

Muchas de las proteínas propias de linaje identificadas en LLA o LMA tienen funciones en diferentes procesos celulares, incluyendo la génesis tumoral, la transducción de señales, la transcripción, etc. Por ejemplo, la mieloperoxidasa se ratifica como el marcador específico de LMA, se conoce ahora que proporciona resistencia inherente de los mieloblastos a la vincristina al degradarla en presencia de peróxido de hidrógeno como se describió en estudios de Ozgen y cols publicado en el año 2000(34). Se identificaron también proteínas propias de LMA que a diferencia de los casos de LLA no se evidenciaba su incremento, la glioxalasa I y fosfoglicerato quinasa con funciones relacionadas con la resistencia a la quimioterapia. La UP1, regulada al alza en la LMA, en comparación con la LLA, es conocida por incentivar el alargamiento de los telómeros y la estabilización de la longitud de los telómeros, sus funciones también involucran la inmortalización de las células somáticas, lo que implica que su alta expresión podría contribuir al rápido crecimiento de los blastos. Las proteínas altamente expresadas en la LLA, como Op18 y HSP 27, pueden ser marcadores útiles para la LLA. Se destaca, la mayor expresión de Op18 en LLA en comparación con LMA(33)

Braoudaki *et al* en su estudio publicado en el año 2011, encontraron que las proteínas MOES, EZRI e AIFM1 deberían considerarse como biomarcadores de LMA. MOES y EZRI son miembros de la familia de proteínas ezrin-radixin-moesin (ERM) implicadas en la integridad estructural de las microvellosidades y en la transducción de señales al citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de las células de los mamíferos participa en varias actividades celulares vitales, que implican determinar y alterar la forma, el movimiento, la división celular, la comunicación

entre células, el anclaje celular y la organización del medio intracelular (Trofatter et al. 1993), en consecuencia, la alteración en los niveles de expresión de MOES o EZRI podría afectar el control del crecimiento celular. (35)

En el año 2012, Foss et al en su estudio identificaron que la proteína portadora de fosfato mitocondrial y subunidad beta de glucosidasa 2, son biomarcadores de LA independiente del linaje. En particular, la nicastrina fue útil para distinguir la LMA de la LLA. Es importante destacar que la nicastrina es una proteína que pertenece al complejo gamma secretasa, una proteína de cisteína intramembrana que controla la proteólisis de Notch. La identificación de altos niveles de nicastrina en la LMA aumenta la posibilidad de señalización Notch desregulada en la patogénesis. Dada la disponibilidad de inhibidores de la gammasecretasa, este hallazgo puede tener importantes implicaciones terapéuticas. (36)

Wang et al, en su publicación en 2013, identificaron en 15 niños con diagnóstico de LLA, que la proteína glutatión S-transferasa P (GSTP) estaba regulada al alza en las muestras de los pacientes estudiados, esta proteína es un miembro de la familia de las GST, juega un papel importante en la biotransformación por conjugación de compuestos electrofílicos a glutatión se asocia con tumores malignos. GSTP también ha sido considerado como un biomarcador y a futuro una posible diana terapéutica. (37)

La prohibitina (PHB) se conoce que tiene funciones relacionadas con la diferenciación celular, reconocida por su función de chaperona, en el acompañamiento de otras proteínas de la membrana mitocondrial, la morfogénesis y potencialmente asociada con la leucemogénesis, los autores encontraron esta proteína está regulada al alza en LLA. (37)

La peroxirredoxina 4 (PRDX4), un miembro de la familia de las peroxirredoxinas desempeña muchas funciones, como la supresión de tumores, la proliferación, la diferenciación y la señalización celular. En el estudio de Wang y cols esta proteína se encontró regulada a la baja, contribuyendo así a la leucemogénesis.(37). La proteína ribosómica ácida 60s P0 es un componente esencial del tallo ribosómico eucariótico y está involucrada en el proceso de traducción. Su nivel en LLA usualmente se ha encontrado disminuido como lo demostraron es este estudio. La actina citoplasmática es una proteína del citoesqueleto. El estudio también reveló disminución de la proteína en pacientes con LLA. La proteína FLJ26567 es una proteína de estructura y función poco claras. En el estudio, se encontró regulada a la baja. (37)

Uno de los aportes más importantes de estos trabajos es incentivar el estudio a profundidad de las proteínas frecuentemente expresadas en LLA para establecer nuevos biomarcadores en el

diagnóstico de LLA y a futuro el estudio de nuevas dianas terapéuticas a partir de la expresión diferencial proteica. (37)

**Tabla 4. Estudios proteómicos comparativos en LA**

Proteína	LMA		LLA		Función	Tipo de muestra	Metodología	Ref.
	Up	Down	Up	Down				
Variante de cadena pesada de inmunoglobulina	X				Reconocimiento de antígenos.	Sueros de 12 pacientes con LMA	2-DE	Kwak JY et al (32)
Subunidad 1 de la proteosoma 26S ATPasa subunidad 1	X				Degradación dependiente del ATP de proteínas ubiquitinadas. Progresión del ciclo celular, apoptosis, la reparación del daño al ADN-. Se asocia con leucemogénesis.			
Haptoglobina -1	X				Estimula la angiogénesis Inhibe la síntesis de prostaglandinas, promueve la cristalización del colesterol y tiene efectos antiinflamatorios o inmunosupresores.			
A-2-HS-glucoproteína		X			Proteína de adhesión celular que se une a las células inmaduras del linaje granulocítico.			

Proteína asociada al complemento SP-40		X			Regulación de la proliferación celular. Protege las células contra la apoptosis y contra la citólisis por complemento.			
Producto del gen RBP4		X			Proteína de unión al retinol que regula el transporte de retinol en el plasma sanguíneo.			
Lipoproteína C-III		X			Homeostasis de triglicéridos.			
Proteína desconocida		X						
Cadena ligera reguladora de miosina-2 (MLC-2)	X		X		Unión al monómero de actina. Regulación negativa del crecimiento celular.	Aspirados de MO de un grupo de 61 pacientes de 18 a 64 años.	2-DE (MALDI-TOF-MS) MS (ESI-MS/MS).	Cui J-W et al. (33)
Cadena ligera reguladora de la miosina-3 (MLC-3)	x		x		Formación de miofibrillas. Migración de linfocitos.			
Mrp 14		X			Actividades proinflamatorias, antimicrobianas, de recolección de oxidantes e inductoras de apoptosis			

Mrp8		X			Reclutamiento de leucocitos, la promoción de la producción de citoquinas y quimiocinas, y la regulación de la adhesión y migración de leucocitos. Actúa como una molécula de alarma o patrón molecular asociado al peligro (DAMP).			
TIP (TNF inhibitory protein)	X				Inhibidor de la apoptosis.			
Proteína G	X				Regulación a la baja del supresor de Ras1.			
Mieloperoxidasa	X				Proporciona una resistencia inherente de los mieloblastos a la vincristina al degradar la VCR en presencia de peróxido de hidrógeno.			
Glioxalasa I Fosfoglicerato cinasa 1	X				Resistencia a los medicamentos.			
UP1	X				Promueve el alargamiento y estabilización de los			

					telómeros de la longitud de los telómeros, y se correlaciona con la inmortalización de las células somáticas.			
Oncoproteína 18 (Op18)			X		Previene el ensamblaje y promueve el desmontaje de microtúbulos. Importante la proliferación celular.			
HSP27			X		Desempeña un papel en la resistencia al estrés y la organización de actina.			
Antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA)				X	Participa en el control de la replicación del ADN. Desempeña un papel clave en la respuesta al daño del ADN (DDR) al estar convenientemente posicionado en la horquilla de replicación para coordinar la replicación del ADN con las vías de reparación del ADN y tolerancia al daño al ADN.			



MOES ZRI	X				Proteínas principales de unión a actina. Participan en la integridad estructural de las microvellosidades y en la transducción de señales al citoesqueleto de actina.	Muestras de MO y SP de cinco pacientes pediátricos (rango de edad: 1-15 años) con LMA.	Electrofor esis bidimensi onal en gel e identificación de proteínas mediante espectrom etría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF).	Braou daki et al (35)
AIFM1	X				Regulación de apoptosis. Desempeña un papel crítico en la muerte celular picnótica independiente de la caspasa.			
Glutación S-transferasa P (GSTP)			X		Importante en la biotransformación mediante la conjugación de compuestos electrofílicos con glutatión.	Aspirados de MO de 15 niños con LLA.	2-DE Adquisició n y análisis de imágenes de gel MALDI-TOF MS	Wang et al (37)
Peroxiredoxi na 4 (PRDX4)				X	Proliferación, diferenciación y la señalización celular. Regula la actividad del factor de transcripción NF-κB.			
Prohibitina (PHB)			X		Diferenciación celular, el acompañamiento de otras proteínas de la			

					membrana mitocondrial y la morfogénesis. Potencialmente asociada con la leucemogénesis.			
Proteína ribosómica acida 60s P0				X	Participa en el proceso de traducción de proteínas.			
Actina citoplasmática				X	Motilidad celular y la contracción Regulan la transcripción y motilidad génica y la reparación del ADN dañado.			
Triosafofosfato isomerasa 1 (TPI-1) la piridoxina-5'-fosfato oxidasa (PNPO)				X	Participan en el metabolismo de proteínas y glucosa.			
FLJ26567				X	Desconocida			
Proteína portadora de fosfato mitocondrial y subunidad beta de glucosidasa 2	X		X		Marcadores de enfermedad independientes del linaje. Transición de permeabilidad mitocondrial Transducción de señales intracelulares	Repositorio de leucemia FHCRC (AML, ALL) o de donantes voluntarios en FHCRC (MNC, CD34+).	Tiempo de vuelo de desorción/ionización láser mejorado en superficie (SELDI-TOF) LC-MS/MS	Foss et al (36)
Nicastrina	X				Controla la proteólisis de Notch,			

					la identificación de altos niveles de nicastrina en la LMA aumenta la posibilidad de una señalización de Notch desregulada en la patogénesis de la LMA.			
--	--	--	--	--	---	--	--	--

#### 4.5 Pronóstico

La clasificación de los pacientes con diagnóstico de LMA en grupos de riesgo es muy útil para predecir la respuesta a la terapia convencional, así como la supervivencia. La estratificación de riesgo viene dada por características citogenéticas y genéticas específicas, por un lado, el sistema de clasificación pronóstica del Consejo de Investigación Médica (MRC-C) apoya la estratificación de acuerdo a anomalías cromosómicas, mientras que el sistema europeo de *Leukemia Net* (ELN-C) se basa en presencia de mutaciones genéticas para realizar dicha clasificación, así como se detalla en la tabla 5. (38)

Los grupos se estratifican de la siguiente manera:

- Riesgo favorable: Pacientes con resultados presuntamente buenos con protocolos terapéuticos de quimioterapia convencional. Las alteraciones cromosómicas asociadas a riesgo favorable incluyen: t(8;21); inv(16)(p13;q22); t(16;16)(p13;q22) y t(15;17)(q24.1;q21.1) (asociada a leucemia promielocítica aguda). Aproximadamente el 40% de los pacientes clasificados como riesgo favorable presentan cariotipo normal.
- Grupo de riesgo desfavorable: Pacientes con resultados adversos, probablemente candidatos a trasplante alogénico de células madre. Las alteraciones cromosómicas descritas en este grupo incluyen: del (5q); add (5q); del (7q); add (7q); monosomías 5 o 7; inv(3)(q21;q26); t(3;3)(q21;q26); t(6;11)(q27;q23); t(10;11)(p11-13;q23); t(9;22)(q34;q11); anomalías 17p o monosomía 17; cariotipos complejos descritos como al menos 4 anomalías no relacionadas.
- Grupo de riesgo intermedio: Pacientes que no califican para riesgo favorable o desfavorable. (13)

**Tabla 4. Estratificación del riesgo de pacientes con LMA por de acuerdo con las alteraciones genéticas según las recomendaciones de la European Leukemia Net año 2017.**

<b>Categoría de riesgo*</b>	<b>Anomalia genética</b>
<b>Favorable</b>	t(8;21) (q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16) (p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITDbajo</i>
	<i>CEBPA</i> mutado bialélico
<b>Intermedio</b>	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3-ITDalto</i>
	Wild type <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i> o con <i>FLT3-ITDbajo</i> (sin lesiones genéticas de riesgo adverso)
	t(9;11) (p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	t(6;9) (p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> reorganizado
	t(9;22) (q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1) -5</i> o del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Cariotipo complejo, cariotipo monosómico
	Wild type <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITDalto</i>
	<i>RUNX1</i> mutado

	ASXL1 mutado
	TP53 mutado

**Tomado de:** Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. *Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. Blood* 2016.

Es importante destacar que los perfiles pronósticos pueden ser complementados con biomarcadores proteicos, de manera que se pueden fortalecer y construir mejores sistemas de clasificación. Estudios realizados por *Nicolas et al* evidenciaron que los perfiles proteómicos pueden complementar clasificaciones citogenéticas particularmente en pacientes de riesgo intermedio, sugiriendo así la identificación de biomarcadores a fin de comprender mejor la biología de la leucemia mieloide aguda y a futuro promover el desarrollo de terapias blanco, de acuerdo con perfiles proteómicos (39)

Otros factores importantes en el pronóstico de la enfermedad incluye: edad, estado funcional del paciente, enfermedad mínima residual y antecedente de neoplasia hematológica previa al LMA. De acuerdo con lo anterior, pacientes menores a 50 años, ECOG  $\leq 2$ , EMR negativa y pacientes sin antecedente de desorden hematológico corresponden a un grupo de buen pronóstico, mientras que pacientes  $> 50$  años, ECOG  $\geq 2$ , EMR positiva y pacientes con antecedente de desorden hematológico presentan factores desfavorables en el curso de la enfermedad. (40)

En cuanto a factores pronósticos en LLA se destaca la presencia de la t(9;22)(q34.1;q11.2) con fusión BCR-ABL1, se ha detectado en aproximadamente el 25% de pacientes adultos, se asocia con frecuencia con mal pronóstico, rutinariamente esta anomalía se detecta mediante un cariotipo convencional, sin embargo se debe complementar con técnicas genéticas-moleculares como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y FISH (Hibridación fluorescente in situ), en respuesta a una adecuada estratificación del riesgo, el paciente recibirá terapia dirigida, en este caso inhibidores de la tirosinas quinasas. (41)

Existen otras alteraciones genéticas claves en la estratificación de riesgo de la LLA-B como anomalías en los genes PAX5, JAK1, JAK2, IKZF1, CRLF2, NOTCH1 y FBXW7. (18). Por un lado, las alteraciones en el factor de transcripción necesario para la diferenciación de linfocitos B conocido como PAX5 se asocia a la leucemogénesis, su papel pronóstico es variable. (41)

*El gen IKZF1* codifica para la proteína de unión a los dedos de zinc IKAROS y se relaciona con mal pronóstico en la LLA B. (19) Alteraciones en el gen CRLF2 se asocian con mal pronóstico en LLA-B y frecuentemente resulta de fusiones de CRLF2 con genes asociados, como el gen de cadena pesada de inmunoglobulina (IGH) o P2RY8.(41)

## 4.6 Tratamiento

El tratamiento estándar de las LA depende de su clasificación, de su perfil inmunofenotípico y genético, así como la clasificación del riesgo. El tratamiento de la LMA incluye por un lado una terapia de inducción inicial, con el objetivo de lograr remisión completa, con enfermedad mínima residual negativa y por otro lado una terapia posterior a la remisión. Los factores que influyen en la elección del tratamiento de inducción inicial son: evaluación del estado funcional del paciente y estado biológico de la enfermedad teniendo en cuenta estratificación pronóstica. Las dos terapias de inducción frecuentemente utilizadas en la leucemia mieloide aguda incluyen:

- 1) Quimioterapia citotóxica con o sin terapias dirigida.
- 2) Agentes hipometilantes con o sin terapias dirigidas. (42)

El tratamiento de la LLA incluye 3 fases: Inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. Adicionalmente se administra también terapia profiláctica dirigida al sistema nervioso central (sistema nervioso central), con el objetivo de evitar la infiltración por blastos. (24)

## 4.7 Terapia de inducción de remisión

Esta primera etapa de la terapia dura aproximadamente de cuatro a seis semanas, tiene como objetivo reducir la carga tumoral inicial y restaurar la hematopoyesis. La terapia se compone de un glucocorticoide (prednisona o dexametasona), vincristina y asparaginasa, con o sin antraciclina. Este esquema tradicional para la LLA funciona adecuadamente en pacientes con riesgo estándar si se administra un tratamiento intensificado posterior a la remisión. Los pacientes con riesgo alto o muy alto reciben cuatro o más medicamentos. (43)

La prednisolona se emplea tradicionalmente en el tratamiento con LLA, pero la dexametasona se ha venido usando más de manera paulatina debido a su mejor desempeño en el control de la leucemia en el SNC. (43)

Dada la naturaleza pronóstica en pacientes *BCR-ABL1* positivo, el suministro de terapia temprana de inhibidores de la tirosina quinasa han logrado tasas de remisión completa superiores al 90%. (43)

## 4.8 Terapia de consolidación

La siguiente etapa en la terapia se administra después de la inducción de la remisión para erradicar los blastos linfoides. En esta fase generalmente se suministran altas dosis (aproximadamente 1-8 g/m<sup>2</sup>) de metotrexate con mercaptopurina, vincristina y glucocorticoides, asparaginasa durante 20-30 semanas y terapia de reinducción con agentes similares a los utilizados durante la remisión-inducción. (44)

La terapia de reinducción ha mostrado ser determinante en los protocolos de LLA. La terapia de reinducción intensificada con vincristina y asparaginasa ha demostrado mejorar el resultado de los pacientes con LLA de alto riesgo. (44)

#### **4.9 Terapia de mantenimiento**

Esta etapa dura aproximadamente 2 años e incluye principalmente mercaptopurina diaria y metotrexate semanal, vincristina y dexametasona.

La mercaptopurina y la tioguanina son análogos estructurales de la hipoxantina y la guanina, respectivamente, e inhiben la síntesis de novo de purinas. La tioguanina requiere menos pasos para formar el metabolito activo nucleótidos de tioguanina y tiene una mayor citotoxicidad in vitro para los linfoblastos. Dosis altas de mercaptopurina (75 mg/m<sup>2</sup>/día) se relacionan con el desarrollo de neoplasias secundarias y con bajas tasas de adherencia, lo que repercute en eventos de recaída. (44)

#### **4.10 Estudios proteómicos en leucemias agudas**

En los últimos 20 años, con la aparición y fortalecimiento de las ciencias ómicas, se ha revolucionado el estudio de diferentes enfermedades, particularmente las infecciosas, sin embargo, se han descrito nuevas aplicaciones en enfermedades de alto interés en salud pública como el cáncer incluidas las leucemias. Así mismo, las multiómicas (genómica, proteómica, transcryptómica y metabolómica) son imperativas en el estudio integral en la investigación traslacional (45)

#### **4.11 Proteómica**

Una de las ciencias más completas y útiles para el estudio del cáncer es la proteómica, encargada de estudiar la identidad, niveles de expresión y modificaciones postraduccionales de las proteínas en cualquier muestra biológica(6) . Esta ciencia ha tomado fuerza y protagonismo en el estudio de vías de señalización en LA que permitan entender adecuadamente la biología del tumor, interpretando el flujo de información en múltiples redes complejas que interactúan en la célula; diferentes estudios han demostrado que la proteómica es útil para monitorear la progresión, predecir recurrencia y orientar el tratamiento dirigido fortaleciendo de esta manera la medicina personalizada.(46)

Desde el punto de vista de la medicina traslacional, el enfoque proteómico ha tomado mayor interés, debido a su capacidad de detectar e identificar biomarcadores de carácter proteico, útiles en la etapa inicial del diagnóstico, permitiendo una mejor clasificación pronóstica, incidiendo de esta manera en el tratamiento. En el caso de las LMA los avances terapéuticos han sido pocos, exceptuando a la leucemia promielocítica, a diferencias de otras neoplasias

hematopoyéticas y de otros tipos de cáncer, por lo que en este tipo de neoplasia la utilidad es destacable.

Como se describió anteriormente, de acuerdo al perfil citogenético las LMA se clasifican en tres grupos: favorable, desfavorable e intermedio, los dos primeros grupos se encuentran bien definidos, mientras que en el último grupo se ubican los pacientes que no pertenecen a los grupos restantes. De acuerdo con Grimwade D y cols, cerca del 50% de los pacientes con diagnóstico de LMA se ubican en el riesgo intermedio, por lo que una caracterización más allá de las anomalías cromosómicas, empleando herramientas como la proteómica es determinante para completar escalas diagnósticas y pronósticas. (47)

Si bien en los últimos años la investigación genómica ha avanzado en el estudio de las LA, aun es deficiente para entender los cambios celulares como las modificaciones postraduccionales, ofreciendo información acerca de la biología del tumor, incluso más allá de la genómica, los aportes de esta ciencia como mutaciones y expresiones génicas, no brindan opciones terapéuticas claras, dado que la terapia se dirige a proteínas en vez de genes.

En 2017 Hu, Chenyue W y Amina A. Qutub, en su capítulo de libro *Proteomics in Acute Myeloid Leukemia* en IntechOpen, hacen referencia a la analogía con una película. La genómica la definen como la copia del guión, la proteómica es la película construida a partir del guión, donde intervienen diferentes actores, directores, escenarios y efectos especiales, en consecuencia juzgar y lograr entender la película solo con el guión resulta difícil, teniendo en cuenta que la ejecución importa y solo se crea una opinión después de verla, la proteómica puede capturar la acción real en las células que salen del alcance de la genómica.(48)

#### 4.12. Herramientas proteómicas:

##### 4.12.1. Métodos basados en anticuerpos

En este grupo se ubican técnicas tradicionales como la ELISA y el Western, cuyo fundamento para la identificación de proteínas dependen directamente de la disponibilidad de anticuerpos y así cuantificar los niveles de expresión de proteínas.(49)

##### 4.12.2. Métodos basados en gel

Electroforesis en gel bidimensional 2DE o 2D-PAGE, se ha descrito como la primera técnica proteómica, emplea corriente eléctrica para separar proteínas en un gel en función de su carga y su masa. Este método se usa para separar proteínas para posteriormente analizar el perfil de expresión de proteínas por medio de espectrometría de masas. (49)



#### 4.12.3. Métodos basados en cromatografía

Se puede utilizar para separar, purificar e identificar proteínas de interés en muestras biológicas de acuerdo a la carga, hidrofobicidad, interacción biológica y afinidad, para finalmente emplear espectrometría de masas para la completa identificación. (49)

#### 4.12.4. Espectrometría de masas (EM):

Los primeros estudios reportados del uso de espectrometría de masas se documentan en el año 1975, cuando los investigadores Anhalt y Fenselau sugirieron que la identificación bacteriana podría darse a partir de biomarcadores. Sus estudios se fundamentaron en la combinación de métodos de pirolisis y espectrometría de masas para la clasificación taxonómica de diferentes bacterias, sin embargo, aquellas que se encontraban estrechamente relacionadas no lograron caracterizarse del todo. (50)

En el año 2002 el ingeniero químico japonés Tanaka ganó el premio nobel de química por su trabajo relacionado con la desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI), así como por su investigación en el desarrollo de métodos para analizar moléculas grandes mediante espectrometría de masas, utilizando proteínas ribosómicas bacterianas propias y reproducibles que llevan a la identificación precisa a nivel de género y especie, brindando así una utilidad destacada en la microbiología clínica, gracias a la generación de bibliotecas de espectros con cepas de referencia, el rango de masas varía entre 2-20 kDa y permiten la generación de espectros de masa únicos para la especie determinada (51)

La EM se ha venido utilizando para cuantificar e identificar moléculas desconocidas mediante la digestión, ionización y captura de proteínas para la detección de estas moléculas en función de la masa- carga ( $m/z$ ). (51)

Los espectrómetros de masas constan de tres componentes básicos como se muestra en la figura 1:

- Fuente de iones: Para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa
- Analizador de masas: Encargado de separar los iones en relación a su masa-carga ( $m/z$ ), utilizando una elevada energía cinética, durante el trayecto de la zona de vuelo. Las moléculas se separan de acuerdo a su masa/ carga
- Detector de iones: Con la función de monitorizar los iones separados por el analizador de masas, a partir de la información recolectada por el detector se genera un espectro

de masas, donde la masa de los iones de la muestra es calculada a partir del tiempo de vuelo. En el eje y del espectro de masas se muestra la abundancia relativa y en el eje x muestra el número de iones de la relación  $m/z$  (intensidad).

Es importante destacar que estos tres elementos se mantienen en un ambiente de vacío.(52)

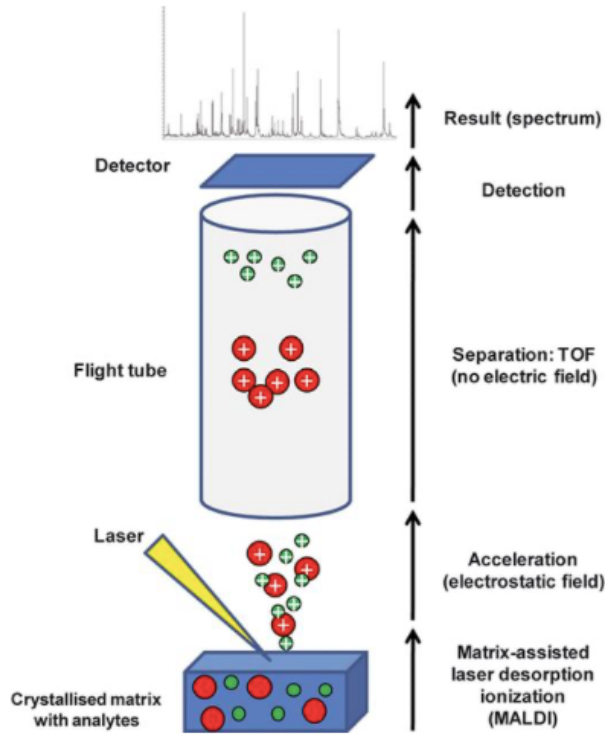
El procesamiento de la muestra se puede hacer de dos maneras, utilizando muestras directas, sin previa extracción de proteínas, o productos de una previa extracción de proteína. Esta extracción se utiliza para muestras, con estructuras celulares complejas que requieren una lisis de membranas con ácidos orgánicos fuertes o por lisis mecánica.

Una vez se obtiene el tipo de muestra que se va a utilizar para el análisis, esta se ubica en la placa metálica de acero y luego se adiciona una sustancia denominada matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico), que actúa como proveedor de protones en la muestra. Luego del secado a temperatura ambiente, la muestra y la matriz se cristalizan para su posterior procesamiento. (53)

Se introduce la placa metálica en el espectrómetro de masas, allí la muestra es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser (54). La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, causados por la absorción de la energía del haz, permite una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra con mínima fragmentación. Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición de la muestra mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga ( $m/z$ ) con alta precisión y especificidad.(48)

Finalmente, el perfil espectral de la muestra se compara con una base de datos de espectros construidas a partir de líneas celulares o cepas de referencia, permitiendo la identificación de la muestra.(54)

La espectrometría de masas ha revolucionado la ciencia, así como la comprensión del cáncer y ahora de las LA. Se ha destacado como una herramienta imperativa en estudios de proteómica, tomando fuerza en el estudio clínico y en las ciencias biológicas. (48)



**Figura 1. Descripción técnica de MALDI-TOF MS**

Tomado de: Antony Croxatto, Guy Prod'hom, Gilbert Greub, Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 2, March 2012, Pages 380–407 (55)

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el desempeño de la tecnología MALDI TOF en la identificación de líneas celulares derivadas de leucemia linfocítica aguda B y leucemias mieloides agudas.

### **5.2 Objetivos específicos**

#### **Objetivo 1:**

Obtener y analizar los espectros de masas obtenidos mediante MALDI TOF en líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda y de leucemia linfocítica aguda B.

#### **Objetivo 2:**

Evaluar la capacidad de discriminación entre leucemias mieloides agudas y leucemia linfocítica aguda B a partir de los perfiles de espectros de masas obtenidos mediante MALDI TOF.

## 6 Metodología

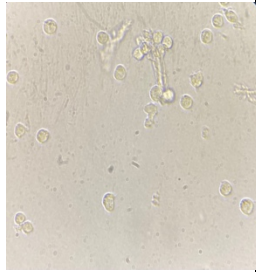
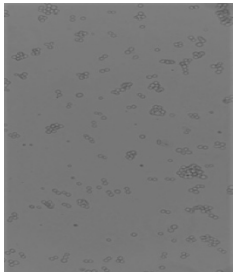
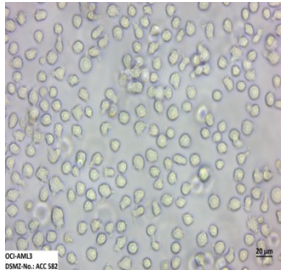
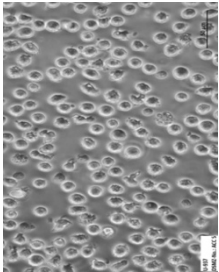
### 6.1 Cultivo de Células Leucémicas

Las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda: K562, OCI-AML3 y U937 y la línea celular derivada de leucemia linfóide aguda: REH son cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 5% suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml). Las células se mantienen en una incubadora humidificada al 5% CO<sub>2</sub> y 37°C.

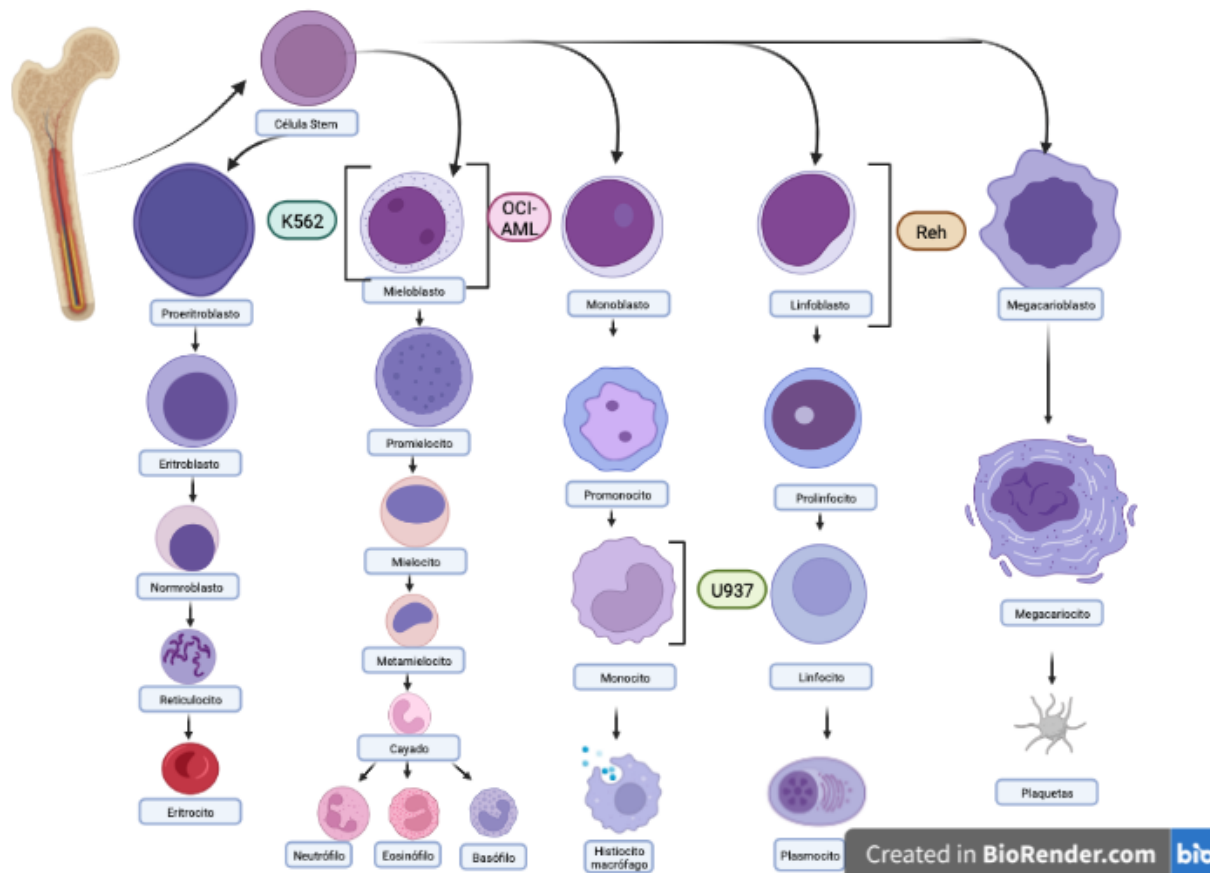
Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron proporcionadas por el Grupo de Inmunobiología y Biología celular de la Pontificia Universidad Javeriana. Sus características principales y de origen se describen en la tabla 6 y en la figura 2.

Para el procesamiento de las células, estas se cuantificaron en cámara de Neubauer y se evaluó su viabilidad utilizando azul tripán. La concentración celular utilizada para el análisis por MALDI-TOF MS fue de 100.000 células/ml.

**Tabla 5. Características de las líneas celulares derivadas de leucemias mieloide aguda y leucemia linfóide aguda.**

	REH	K-562	OCI AML-3 (Ontario Cancer Institute-Acute Myeloid Leukemia- 3)	U937
<b>Morfología</b>	Linfoblastos (56)	Mieloblastos (57)	Mieloblastos (58)	Macrófagos Monocito(59)
<b>Imagen</b>				
<b>Derivada de</b>	SP (56)	MO (57)	SP (58,59)	Efusión Pulmonar(59)
<b>Origen</b>	Paciente pediátrica de género femenino de 15	Mujer de 53 años con leucemia mieloide crónica	Hombre de 57 años LMA clasificación M4. (58)	Hombre de 37 años blanco con linfoma histiocítico. (59)

	años con LLA en la primera recaída. Leucemia linfoide aguda; no-T; no-B(58)	en crisis blástica terminal.(57)		
<b>Marcadores celulares expresados</b>	CD3-, CD10+, CD13-, CD19+, CD34-, CD37-, CD38+, cyCD79a+, CD80-, CD138+, HLA-DR+, sm/cylgG -, sm/cylgM -, sm/cykappa -, sm/cylambda.(58)	CD7 (25%), CD3-, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD71+, CD235a+ (58)	CD3-, CD4+, CD8-, CD10-, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, CD30-, CD34-, CD41+, CD42+, CD68+, CD117-. (58)	CD3-, CD4+, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34 -, CD54 +(58)



**Figura 2. Modelo de hematopoyesis con las diferentes líneas celulares.**

En esta figura se evidencia la jerarquía de la hematopoyesis normal la cual parte desde la célula madre multipotente y de la cual se derivan a través de procesos de diferenciación celular las diversas poblaciones celulares de linaje mielocítico y linfocítico.

En el proceso de transformación maligna relacionado con múltiples alteraciones genéticas que afectan genes reguladores de la diferenciación celular, muerte celular y distintas rutas de señalización, se presentan bloqueos madurativos con expansión de poblaciones celulares que hacen parte del clon o clones malignas.

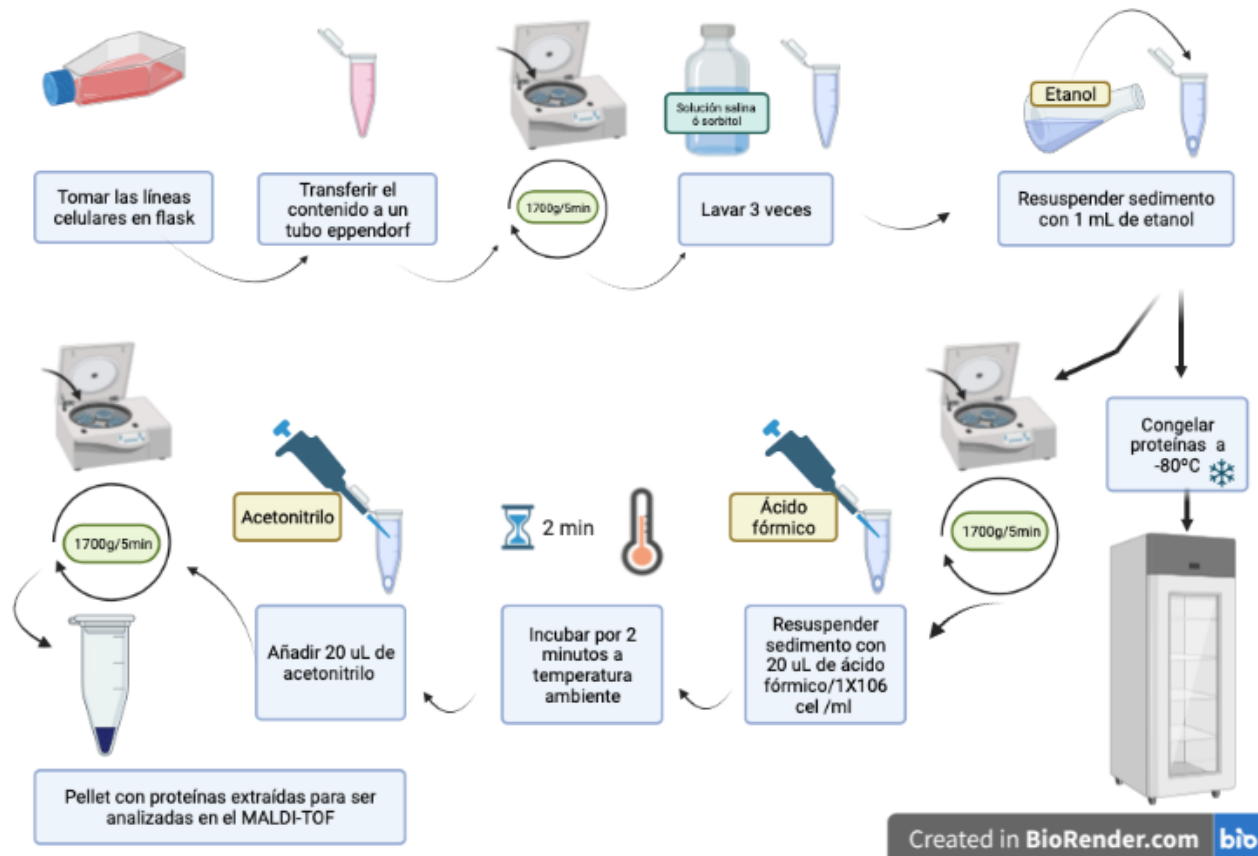
De manera particular, la línea K562 se deriva de células madre mielocíticas y de células de linaje eritroide como parte de la población leucémica. Las líneas OCI-AML y U937 comprometen células de linaje monocítico y la línea celular Reh compromete células de linaje linfocítico B.

De acuerdo a la tabla 6, se ubicaron en la figura las diferentes líneas celulares empleadas en el presente estudio, de acuerdo a la morfología descrita en la literatura.

## 6.2 Protocolo de extracción de proteínas

La extracción de proteínas para el análisis en MALDI-TOF MS se fundamentó de la siguiente manera: lavado de las líneas celulares con PBS, sorbitol o solución salina, resuspensión del

sedimento con etanol, se guardaron dos viales: uno a  $-80^{\circ}\text{C}$  (a fin de garantizar la preservación de las muestras y facilitar la posterior extracción de proteínas)(60) y en el otro vial se continuó la extracción de proteínas con alcoholes orgánicos, como ácido fórmico y acetonitrilo (20  $\mu\text{L}$ ), finalmente se toma 1  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra y se pone en la placa de acero del MALDI-TOF MS, se deja secar y luego se pone 1  $\mu\text{L}$  de matriz HCCA (Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico).(61) En la figura 3 se describe de manera detallada la metodología empleada.



**Figura 3. Proceso de extracción de proteínas en líneas celulares**

### 6.3 Obtención de los espectros en Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

Como control negativo se utilizó medio de cultivo RPMI en el que se realizó extracción de proteínas, así mismo de manera simultánea, se realiza montaje de medio de cultivo RPMI puro, en cada montaje realizado.

Una vez extraídas las proteínas a partir de las líneas celulares de LA se procedió con la obtención de los espectros en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Proteómica y Miosis Humanas de la Pontificia Universidad Javeriana por medio de MALDI-TOF MS (matrix-



assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) Biotyper (Bruker Daltonics).

Es importante destacar que el principio básico de la tecnología MALDI-TOF MS se basa en la espectrometría de masas para la identificación de proteínas principalmente ribosomales y en menor medida citosólicas como por ejemplo proteínas de unión al DNA y proteínas de choque térmico, a través de la creación de espectros específicos.(62)

Las muestras se ubican en la placa de acero conductora y se superpone con la matriz, una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, produciendo la cristalización de la muestra, de esta manera se forma un depósito sólido que provee protones fundamentales para la ionización de la muestra, luego de la cristalización se inicia el análisis en el espectrofotómetro de masas y se lleva a cabo la ionización mediante pulsos de rayos láser UV, se forman iones en fase gaseosa y se produce una fragmentación mínima, luego se produce una aceleración de partículas en el vacío a través de un campo eléctrico, el tiempo que cada partícula tarda en llegar al detector se define como tiempo de vuelo dependiente de la masa y carga de la proteína, una vez el equipo ha detectado las proteínas abundantes de la muestra se produce una huella espectral única para la muestra analizada, la identificación de la misma se determina de manera automática gracias a un software que compara el perfil de espectros de la muestra con la base de datos de referencia.(62) (63)

#### **6.4 Análisis en MALDI-TOF MS**

El instrumento utilizado fue MALDI –TOF MS BrukerBiotyper. El análisis se llevó a cabo con dos softwares: FC Control Flex 3.4 y Flexanalysis 3.4 , con la finalidad de adquirir y analizar el espectro respectivamente.

Los puntajes reportados por el equipo se clasifican colorimétricamente en los siguientes rangos como se muestra en la tabla 7.

- El rango entre 0.000-1.699 (color rojo), se interpreta como no identificación de la línea celular con las otras disponibles para la comparación (el software no encontró una similitud significativa con los espectros de la biblioteca)
- El rango entre 1.700-1.999 (color amarillo), se interpreta como probable identificación de cada una de las líneas celulares con las otras líneas celulares disponibles en el software. (El software encontró una similitud ligeramente significativa con los espectros de la biblioteca)

- El rango entre 2.000-3.000 (color verde) se interpreta como identificación completa de la línea celular en estudio (El software encontró una similitud altamente significativa con los espectros de la biblioteca)

**Tabla 6. Puntajes de identificación ajustados por BrukerDaltonics a la tecnología MALDI –TOF MS.**

Score	Interpretación
2.000-3.000	Identificación altamente probable
1.700-1.999	Probable identificación
0.000-1.699	No identificación

Los puntajes empleados son establecidos por el fabricante de la tecnología, el rango de masa típico (m/z) es de 2-20 kDa, la disponibilidad de bases de datos dedicadas a la identificación de las muestras, son características de MALDI-TOF MS que la ubican como una alternativa lucrativa para la identificación de proteínas. El primer sistema MALDI-TOF MS capaz de identificación microbiana, denominado "MALDI Biotyper", fue desarrollado por Bruker Daltonics. El MALDI Biotyper consistía en una plataforma básica MALDI-TOF, softwares de operación y análisis, una base de datos in situ y un método sencillo para la extracción/preparación de muestras(64–67)

La lectura de la placa de acero se realizó mediante el instrumento Microflex LT MALDI- TOF MS (BrukerDaltonics, Leipzig, Germany). Equipado con un láser de 200 Hz. Los espectros se registran en el modo positivo lineal con una frecuencia de láser de 200 Hz dentro de un rango de masas de 400 a 40.000 Da. La tensión de IS1 era 20 kV, la tensión de IS2 se mantuvo a 18,6 kV, la tensión de la lente fue de 6 kV, y el tiempo de retardo de extracción fue de 40 ns.

Se utilizaron 15 tomas laser de manera manual para cada pozo de la placa del MALDI, se acumularon y se guardaron un mínimo de 6 de espectros individuales por cada línea celular.

### **6.5 Construcción de la biblioteca:**

Para la construcción de la biblioteca, se generaron datos de espectros de masas utilizando FlexControl versión 3.4. Se consideraron espectros de mayor calidad (bajo nivel de ruido y picos reconocibles) analizados con el software Flexanalysis para la creación de una biblioteca combinada de espectros principales (MSP) con un mínimo de 30 espectros por línea celular. Se crearon espectros compuestos para la biblioteca utilizando la función de "creación MSP" de los espectros de referencia MALDI Biotyper versión 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Se seleccionaron los mejores 30 espectros obtenidos para cada línea celular en un rango de 3500-15000 m/z, correspondientes a cada una de las líneas celulares (REH, K562, OCI3 y U937), de diferente pase y diferentes días de montaje. Se empleó Flex Analysis ® para seleccionar los espectros con picos más definidos y con mayor altura.

Posteriormente mediante Maldi Biotyper ® se crean los MSP (Main Spectra Library) para cada línea celular, generando para cada una de ellas gráfico de análisis de componentes principales (PCA), mapa de calor y dendrograma PCA.

## 6.6 Validación de la biblioteca de líneas celulares derivadas de LMA y LLA.

Para la validación de la biblioteca se emplearon 100 espectros de pases diferentes obtenidos durante la fase experimental de las líneas celulares en estudio.

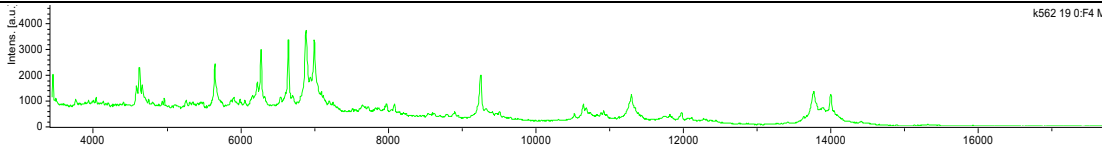
Se tomaron 100 espectros de masas distintos a los empleados en la biblioteca con pase distinto de las diferentes líneas celulares.

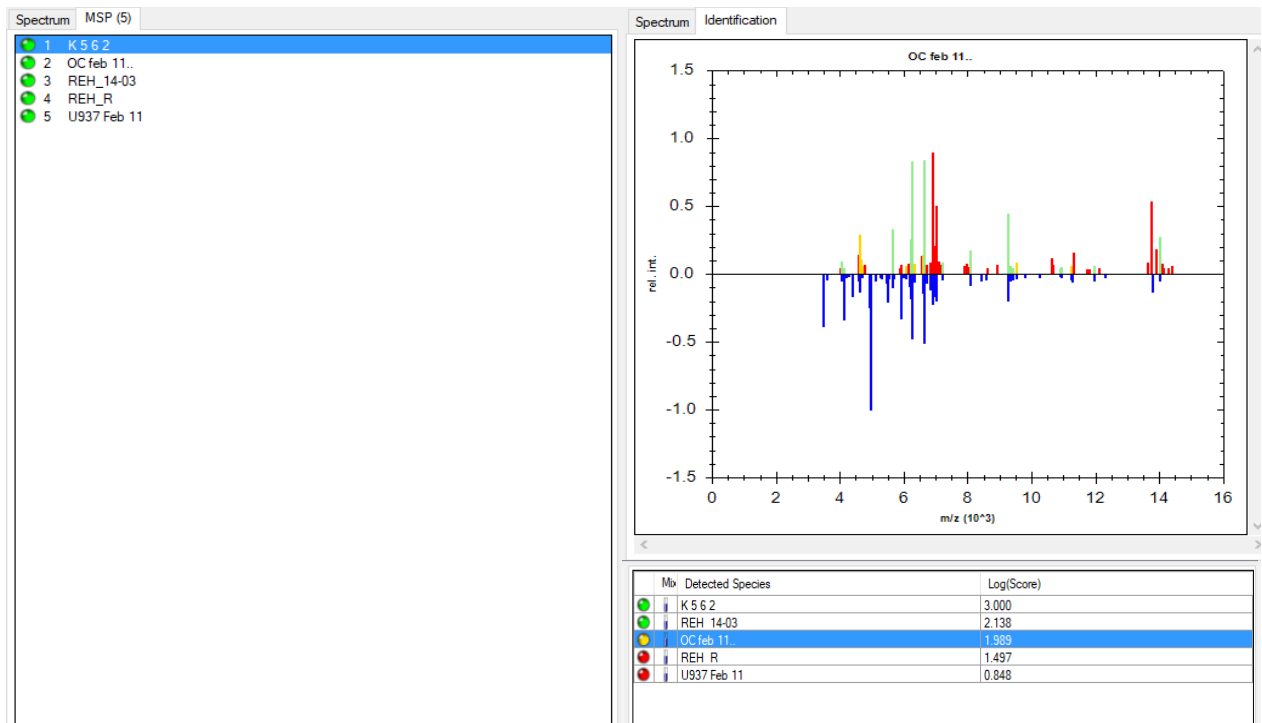
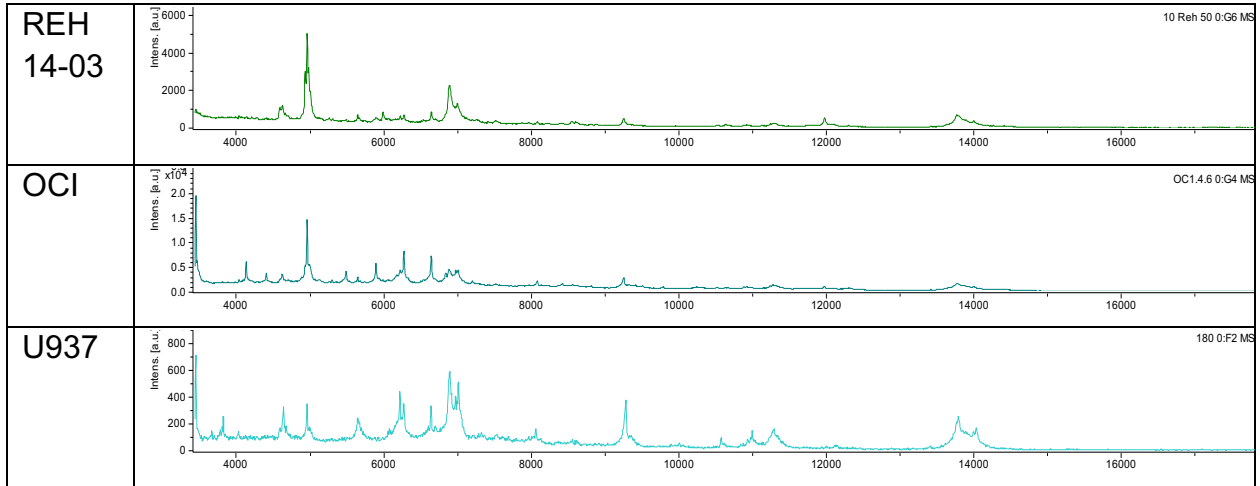
## 7 RESULTADOS

### 7.1 Construcción de la biblioteca

Los tipos de espectros obtenidos de cada una de las líneas celulares se muestran en la tabla 8, el rango m/z ( $10^3$ ) fue de 3500 a 15000 (región completa) para las líneas celulares derivadas de LA (K561, OCI-AML3, REH y U937), para la construcción de la biblioteca se eligieron los 30 espectros de mejor calidad por cada una de las líneas celulares, luego del análisis con dendrograma PCA, gráficas PCA y mapa de calor se crearon 4 MSP (Tabla 10,11 y 12). Sin embargo como se observa en la figura 4, al realizar la comparación entre las 4 líneas celulares, no se logran diferenciar las líneas celulares K562 y REH 14-03 (región completa), con scores superiores a 2.000 para éste último MSP, así mismo en la figura 6 a la 12, en los dendrogramas MSP se observa mayor distancia entre el MSP K562 y REH, razón por la cual se decide emplear una región más corta de 7000 y 13500 m/z, donde hay picos diferenciales con el MSP K562.

**Tabla 7. Tipos de espectros en crudo obtenidos de acuerdo a las líneas celulares.**

Línea celular	Tipo de espectro en crudo
K562	



**Figura 4. Comparación MSP**

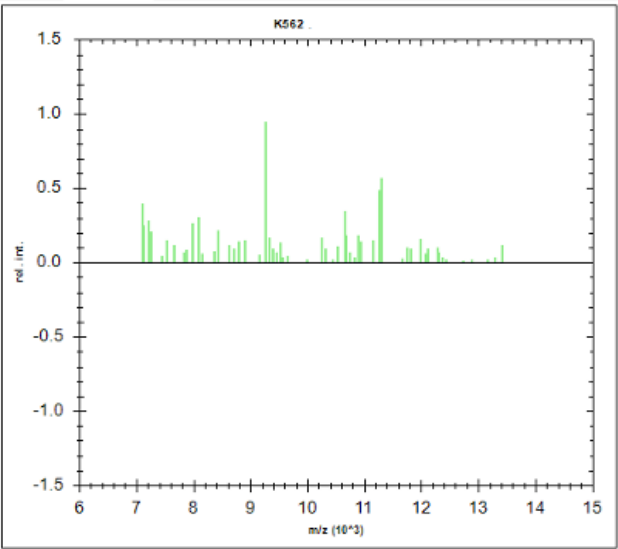
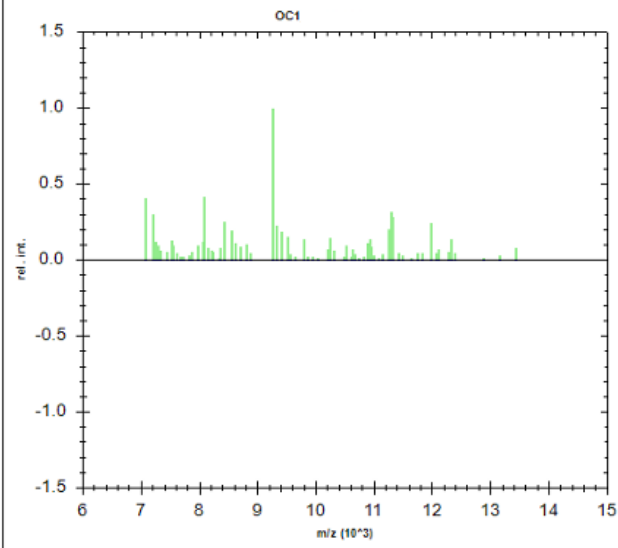
Al comparar los MSPs obtenidos (en un rango 3000-15000 m/z) de las cuatro líneas celulares, se evidenció que al tomar este rango tan amplio no se logra diferenciar adecuadamente la línea K562 y la línea REH. El score entre ellas dio muy similar y no se observa identificación diferenciada entre estas dos líneas celulares, como se observa en la figura 4.

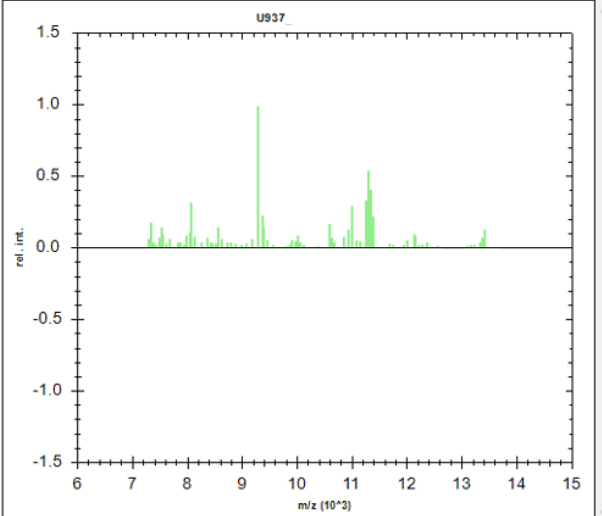
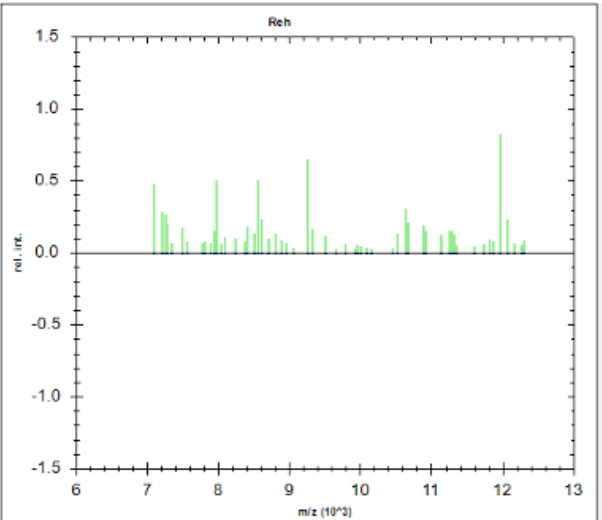
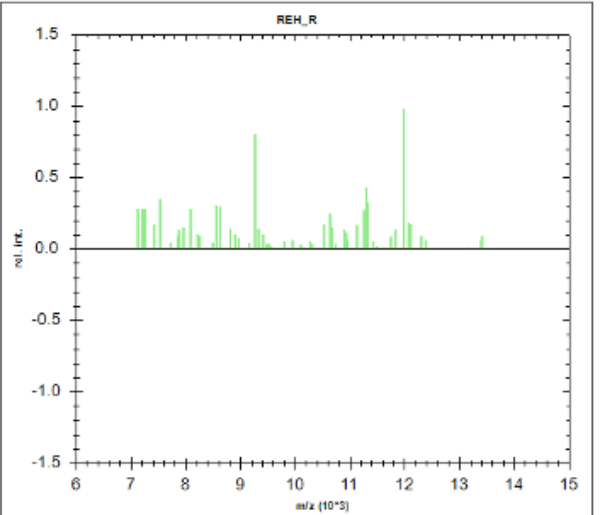
Se mejora la calidad de la biblioteca reduciendo el rango de espectros entre 3500-7000 m/z ya que al analizar los diferentes espectros, es en esta región que se evidenciaba mayor diferencia entre las líneas celulares K562 y REH.

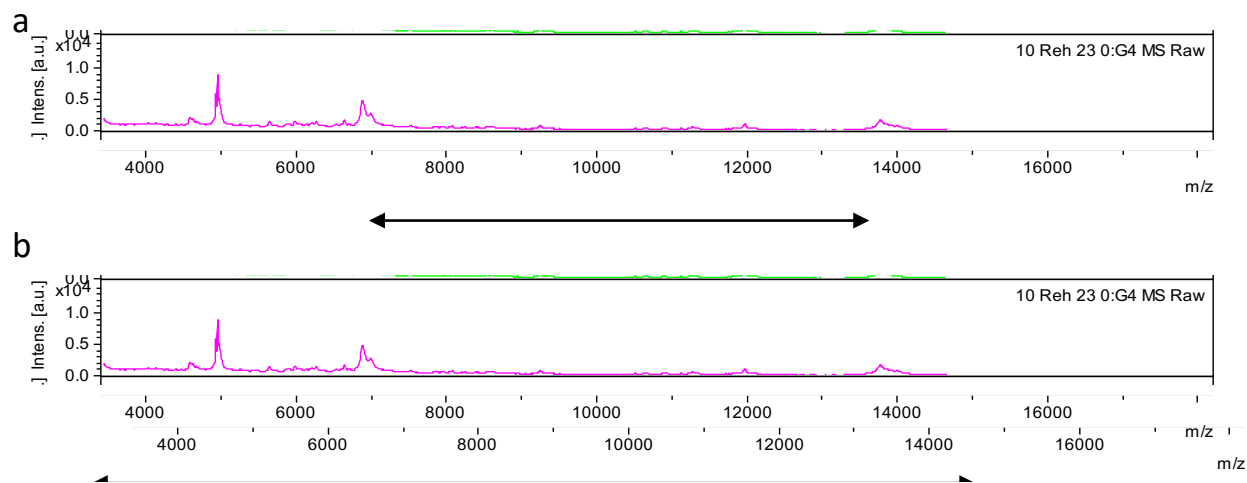
Para optimizar la identificación, se procede a cambiar el rango m/z ( $10^3$ ) de los MSPs de cada una de las líneas. El rango seleccionado para las líneas K562, OCI-AML3 y U937 fue 3500 a 15.000, mientras que para la línea celular derivada de LLA: REH el rango fue de 3500-7000, ya que en este rango, las cuatro líneas compartían entre sí menor cantidad de picos.

Se realizó ajuste de los rangos m/z ( $10^3$ ) a fin de optimizar la identificación entre las leucemias agudas, sin embargo en el caso de la línea celular de leucemia linfocítica aguda REH, se realizó la identificación con los rangos m/z originales (3500-15000).

**Tabla 8. MSP generados por cada una de las líneas celulares**

Línea celular	Rango m/z	MSP generados de la biblioteca
K562	3500-15000	
OCI-ALM3	3500-15000	

U937	3500-15000	
REH 14-03	3500-15000	
REH_R, empleada para la diferenciación con K562	7000-13.500	

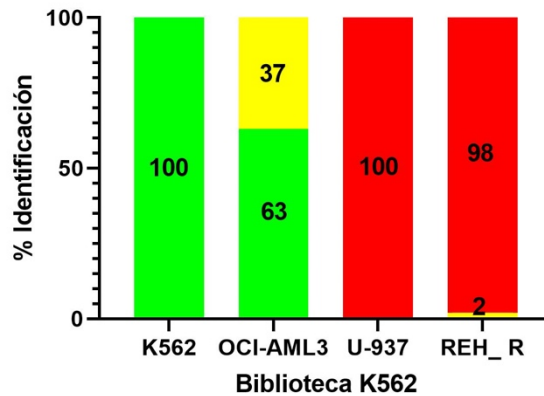


**Figura 5. Espectros línea celular REH y REH\_R (Región)**

En la parte a, se observa la región entre 7000 y 13500 m/z, correspondiente al MSP REH, región útil para realizar la diferenciación con la línea celular derivada de LMA (K562), por el contrario en la parte b se emplea la fracción completa (3500-15000 m/z) necesaria para la validación del MSP de la línea celular derivada de LLA (REH), útil para la diferenciación con las líneas celulares OCI y U937.

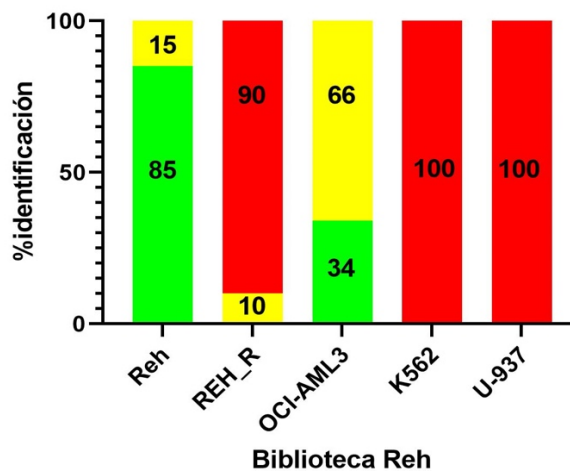
## 7.2 Validación

Para la línea K562, el 100% de los espectros validados tuvieron una identificación correcta con un rango de score entre 2.262 y 2.551, la segunda opción de identificación fue la línea celular OCI3 con 63% (score superior a 2.000) y del 37% con scores un poco más bajos (varían entre 1.724-1.998), con la línea celular REH (región 7000-13500 m/z) hubo 2% de identificación en rangos de 1.711 y 1.839, y el 98% no presentó identificación de la misma manera sucedió con la línea celular U937 (Figura 6).



**Figura 6. Validación línea K562**

Para la línea REH, el 100% de los espectros validados tuvieron una identificación correcta para la línea con scores altos, distribuidos de la siguiente manera: 85% con un rango de score entre 2.006 y 2.435 y 15% con scores que varían entre 1.850 y 1996; la segunda opción de identificación fue la línea celular OCI3 con 66% (scores entre 1.655-1998) y del 34% con scores que varían entre 2.000 y 2.257, con las líneas celulares K562 y U937, no hubo identificación, con la modificación en la región de la línea celular linfóide REH hubo 10% de identificación en rangos de 1.713 y 1.870, mientras que en el 90% restante no hubo identificación (Figura 7).

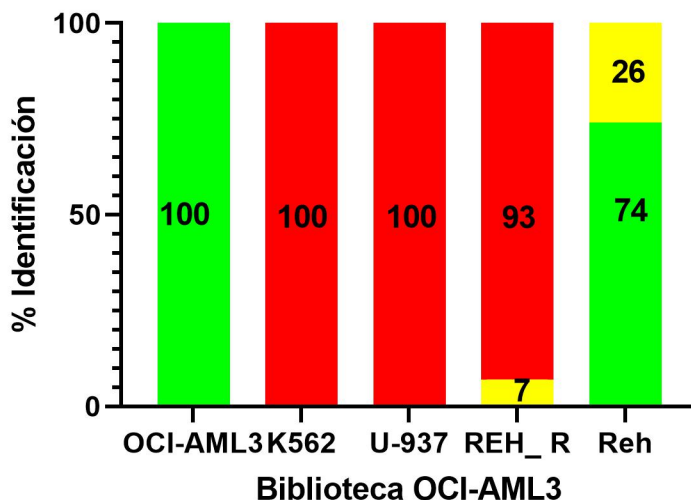


**Figura 7. Validación línea REH**

Para la línea específica de OCI-AML3, el 100% de los espectros validados tuvieron una identificación correcta para la línea con score superior a 2.000, la segunda opción de

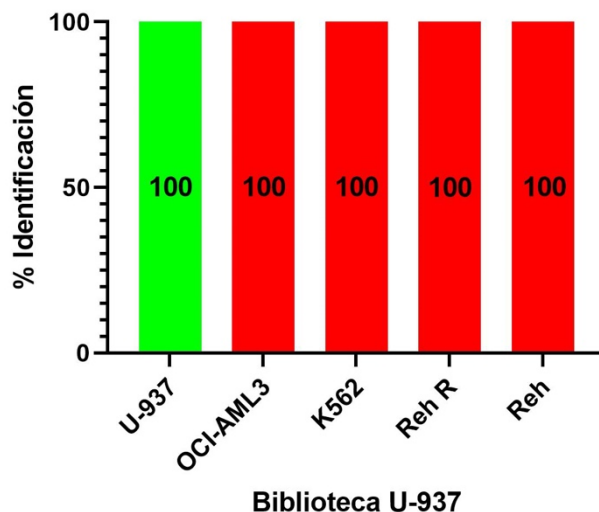


identificación fue la línea celular REH (región completa) con 74% (score superior a 2.000) y del 26% con scores un poco más bajos (varían entre 1.791-1.983), con las líneas celulares K562 y U937 hubo nula identificación, con la línea celular REH (región 7000-13500 m/z) hubo 7% de identificación en rangos de 1.700 y 1.808, y el 93% no presentó identificación (Figura 8).



**Figura 8. Validación línea celular OCI-AML3**

Para la línea específica de U-937, el 100% de los espectros validados tuvieron una identificación correcta para la línea con score superior a 2.000, las demás líneas celulares no presentaron identificación (Figura 9).

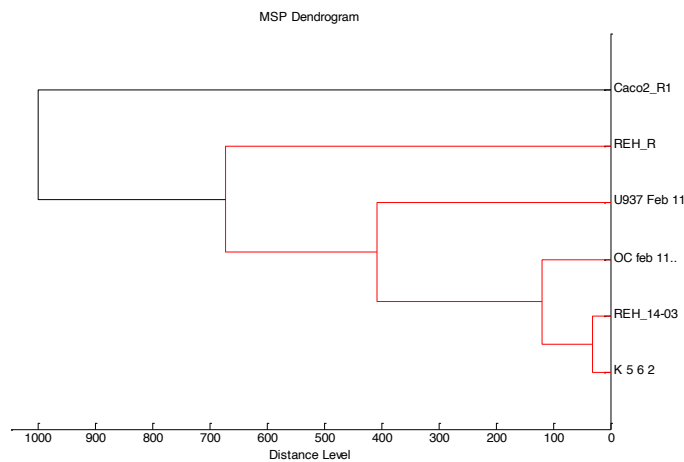


**Figura 9. Validación línea celular U-937**

### 7.2.1 Validación final

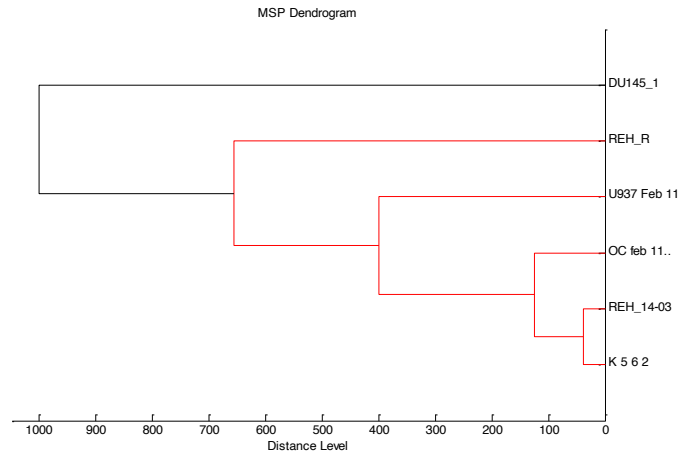
Se realizó *outgroup*, que es un grupo de organismos o líneas celulares distantes filogenéticamente con las líneas celulares hematopoyéticas derivadas de leucemias agudas, en este caso se usaron líneas celulares de tumores sólidos no hematopoyéticos CaCo2 y DU145, línea celular de adenocarcinoma de colón y línea celular de cáncer de próstata respectivamente, se mostró un dendrograma que no evidencia identificación cruzada de las diferentes líneas celulares derivadas de LA con líneas celulares tumorales de neoplasias sólidas no hematopoyéticas.

La importancia de usar *outgroup* en el presente estudio es establecer un punto de comparación para el grupo interno en este caso las líneas celulares derivadas de LA lo que permite determinar las relaciones evolutivas del grupo interno.



**Figura 10. Dendrograma MSP outgroup línea celular CaCo2 adenocarcinoma colón.**

El nivel de distancia que separaba la línea celular del adenocarcinoma rectal (CaCo2) de las líneas celulares hematopoyéticas derivadas de LA fue grande y se lograron diferenciar los dos tipos de líneas celulares: tanto la línea celular de adenocarcinoma de colón como de las líneas celulares hematopoyéticas derivadas de LA, así mismo se forman dos clados de las líneas celulares derivadas de LMA (U937,OCI y K562) y la línea celular derivada de LLA (REH\_R).



**Figura 11. Dendrograma MSP outgroup línea celular DU145 cáncer de próstata.**

En la línea celular de cáncer de próstata (DU145) el nivel de distancia que separaba las líneas celulares hematopoyéticas derivadas de LA fue grande y se lograron diferenciar los dos tipos de líneas celulares: tanto la línea celular de cáncer de próstata como de las líneas celulares hematopoyéticas derivadas de LA, así mismo se forman dos clados de las líneas celulares derivadas de LMA (U937,OCI y K562) y la línea celular derivada de LLA (REH\_R), mostrando divergencia entre ellas.

## 8. Discusión

De acuerdo a la Clasificación de los tumores de los tejidos hematopoyético y linfóide de la WHO 2016, el diagnóstico de LA se basa en hallazgos morfológicos, inmunofenotipo, genéticos y genómicos, que en conjunto pueden lograr un diagnóstico oportuno que repercute en el temprano inicio de la terapia, reduciendo así la tasa de mortalidad en los pacientes (1) sin embargo, en las últimas dos décadas con la aparición de la proteómica se ha demostrado que una de las aplicaciones más interesantes de ésta ciencia es precisamente clasificar las leucemias agudas sin error, la espectrometría de masas de péptidos y proteínas mediante desorción/ionización láser ultravioleta asistida por matriz se ha convertido en una herramienta ideal gracias a tres características: alta sensibilidad, capacidad para la determinación de masas muy precisa y el potencial para brindar la información estructural de las moléculas bajo investigación, lo que resultaría ser muy útil en el acercamiento diagnóstico de leucemias agudas.(68)

Actualmente la caracterización de biomoléculas grandes como proteínas mediante espectrofotómetro de masas es bien conocida en la identificación de microorganismos, sin embargo MALDI-TOF MS ha tenido utilidades más versátiles en el campo de la hematología y en el cáncer, puntualmente en la identificación de biomarcadores que apoyan un diagnóstico efectivo, monitoreo y predicción de la respuesta al tratamiento.(5)

En la tabla 4 se resumen los estudios proteómicos comparativos que muestran la capacidad que para clasificar las leucemias agudas, una de las técnicas más usadas fue MALDI-TOF-MS, se buscó identificar perfiles de proteínas que soporten la diferenciación entre leucemias agudas mieloides y linfoides, lo que mejora la comprensión de la biología de éstas dos neoplasias.(69)

El presente estudio es el primero realizado con el fin de identificar y comparar los espectros de LA realizado por MALDI- TOF MS. Existe un estudio similar realizado en niños con diagnóstico de LMA y LLA antes de recibir tratamiento, así mismo se utilizaron líneas celulares linfoides: REH y 697; línea celular mielóide: Kasumi; y línea celular de leucemia bifenotípica mielomonocítica: MV4;11, la tecnología empleada fue SELDI-TOF (*surface-enhanced laser desorption/ionization*), donde hallaron una proteína diferencial de 8,3 kDa, que corresponde a una ubiquitina truncada, presente únicamente en las líneas celulares linfoides REH y 697, ésta proteína diferencial es sugerida como potencial biomarcador que puede apoyar la diferenciación entre LMA y LLA, sin embargo es necesario ampliar estudios para dilucidar la importancia de ésta proteína en la etiología de la leucemia linfóide aguda infantil.(8).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el desempeño de la tecnología MALDI TOF MS en la identificación de líneas celulares derivadas de leucemia linfóide aguda B y leucemias mieloides agudas. Se emplearon líneas celulares derivadas de leucemias agudas, por un lado se empleó la línea K562 debido a su capacidad proliferativa e invasiva, si bien originalmente fue

aislada de un paciente con diagnóstico de leucemia mieloide crónica, su transformación blástica le confiere características de comportamiento agudo, adicionalmente se encuentra en un estadio de diferenciación muy temprano, su uso es bien conocido en el estudio de progenitores mieloides. (70) La línea celular REH, muestra características como la alta tasa de multiplicación en cultivo celular lo que la diferencia de otras líneas celulares linfoides.(71)

La línea celular derivada de leucemia mieloide aguda OCI-MLA3, muestra características fenotípicas típicas de la LMA con mutación en el gen que codifica para nucleofosmina (NPM) que le confiere potencial proliferativo, esto debido a la interacción entre dos proteínas: NPM y ARF/p53, a fin de proteger de la degradación a la proteína ARF/p53 se da la asociación entre éstas dos proteínas nucleolares, la proteína ARF/p53 participa en el desencadenamiento de la detención del ciclo celular y los programas apoptóticos en respuesta al estrés oncogénico, la proteína NPM cuando sufre mutaciones en el exón 12 del gen *NPM1* cambia su localización, se ubica en el citoplasma de manera aberrante desestabilizando a la proteína ARF (72)(73), lo que resulta en la resistencia a la apoptosis por daño UV o por hipoxia (74)

Así mismo esta línea celular alberga la mutación D3Amut que actúa como un inductor de transición epitelio mesénquima (EMT), importante en la plasticidad de las células cancerosas y la diseminación metastásica, la mutación D3Amut conduce a la desmetilación del TWIST1 facilitando así la migración celular leucémica aberrante. (75)

La línea celular U-937 es importante en la investigación biológica de las LMA por la facilidad de mantener en cultivo, así como su estadio de maduración de macrófago, son células derivadas de progenitores neoplásicos monocíticos y bioquímicamente difieren del perfil citotóxico de una leucemia mieloide aguda monocítica, esto puede ser explicado por la naturaleza de la neoplasia: Leucemia/linfoma histiocítico difuso(76) .

En la construcción de la biblioteca con los cuatro MSP inicialmente no hay diferenciación entre las líneas celulares derivadas de LMA (K562) y de LLA-B (REH) cuando se emplea el fragmento completo (3500-15000 m/z). Por esta razón, se requirió restringir el rango de masas de 7000 a 13500 m/z, identificando que en esta región se retienen picos más significativos y, al mismo tiempo, se eliminan picos con un comportamiento similar, como se muestra en la figura 5.

En cuanto a la líneas celulares derivadas de LMA: K562 y OCI, los resultados de la validación identifican en su totalidad la línea K562, como segunda opción se identificó la línea celular OCI como se evidencia en la figura 5, obteniéndose scores muy cercanos entre ellas. Para el análisis del resultado en esta línea celular es imperativo tener en cuenta que se empleó la región restringida del rango de masas de la línea celular linfóide REH, porque con la región completa no generó diferenciación, con la región restringida realizó diferenciación, respaldando así el potencial de MALDI-TOF MS en la diferenciación de líneas celulares de leucemias agudas.

Respecto a la línea celular REH, presenta identificación en el 100% en la validación, sin embargo como segunda opción con scores superiores a 2.000 (34%) y scores entre 1.655-1998 (66%) se encuentra la línea celular OCI. En la tabla 8 se muestran los diferentes tipos de espectros de acuerdo a cada línea celular, por lo que presentan similitud de picos altos alrededor de 5.000 m/z y en otras regiones del espectro, lo que puede explicar el resultado. Es importante destacar que se empleó la región completa, que al compararla con la región (REH\_R) no genera identificación, posiblemente por la eliminación de picos de comportamiento similar a la hora de restringir el rango de masas. Respecto a las líneas celulares derivadas de LMA K562 y U937 no hubo identificación con ellas, es decir no hubo identificación cruzada, los scores fueron menores a 1.699, lo que demuestra la capacidad de MALDI-TOF MS para la discriminación de las líneas celulares mieloides de las linfoides.

La línea celular derivada de LMA OCI-AML3, muestra identificación del 100% en la validación, como segunda opción se encuentra la línea celular REH (fragmento completo: 3500-15.000m/z), sin embargo cuando se emplea la región restringida (REH\_R) logra una diferenciación destacable, lo que sugiere emplear el rango de 7000-13.500m/z para la validación general de las líneas generales, dado el rendimiento mostrado en la mayoría de líneas celulares analizadas. No se observa identificación con las líneas celulares K562 y U937, ratificando una vez más la capacidad de discriminación de MALDI-TOF MS.

La heterogeneidad biológica de la línea celular U937 tiene su origen en la naturaleza del tumor: Leucemia/linfoma histiocítico difuso, el tejido en el que fue aislada: efusión pulmonar y el estadio de maduración en el que se encuentra: macrófago, lo que puede explicar distancia en los dendrogramas MSP con las demás líneas celulares, así como los resultados en la diferenciación con las mismas, teniendo en cuenta que el estadio de maduración de ellas son células blásticas.

Como se observa en la validación de las bibliotecas REH y OCI-AML3, las segundas opciones de identificación fueron OCI-AML3 y REH, respectivamente con scores muy cercanos, es importante tener en cuenta que éstos scores fueron diseñados para identificación microbiana y no para líneas celulares derivadas de leucemias agudas, por lo que se sugiere en estudios futuros establecer scores propios para líneas celulares en estudio.

En la validación final se incluyeron diferentes MSP de líneas celulares tumorales humanas no hematopoyéticas como outgroup, con el objetivo de analizar las diferencias y similitudes entre sí, no se evidenció identificación cruzada ni interferencia con ninguna de ellas.

## 9. Conclusiones

- El rendimiento de la tecnología MALDI-TOF MS para diferenciar líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda y linfocítica aguda (K562, U937, OCI3 y REH) fue eficiente, ya que con buen análisis y una adecuada selección de espectros se crean MSP derivados de las bibliotecas con la capacidad de discriminar las diferentes líneas celulares.
- Con la restricción de un rango de masas en la línea celular linfocítica REH, se observó que allí se retienen los picos más significativos y se eliminan picos con un comportamiento similar, evitando identificaciones cruzadas entre las líneas celulares.
- El apoyo diagnóstico a futuro de MALDI-TOF MS, beneficia a los laboratorios responsables de leucemias agudas en la reducción de tiempos, recursos e inicio temprano de terapias que repercuten en la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

## 10. Perspectivas y aplicaciones

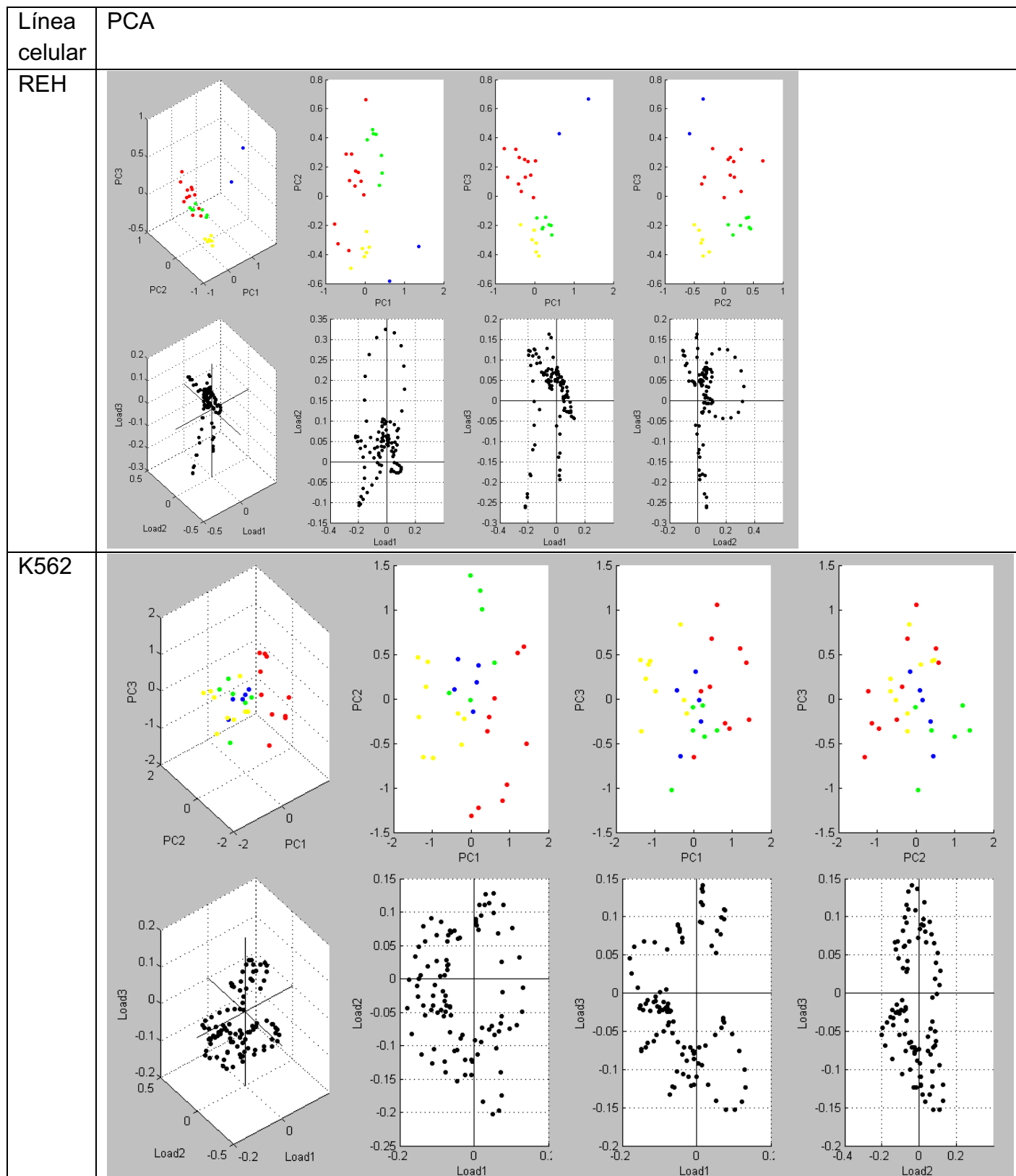
Para darle continuidad a este estudio se sugiere realizar la comparación entre las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda y de leucemia linfocítica aguda B en muestras de sangre periférica o aspirado de médula ósea a fin de respaldar los resultados presentados en este estudio, de manera interesante sería útil la identificación y diferenciación de los diferentes subtipos de LMA y LLA mediante MALDI-TOF MS, para a futuro convertirse en una herramienta estándar en el análisis y diagnóstico de leucemias agudas.

Teniendo en cuenta la complejidad en la biología de las leucemias agudas, se sugiere ampliar estudios proteómicos profundos que contemplen el análisis de la expresión de proteínas que explique el estado de actividad funcional de las células, repercutiendo en la identificación de marcadores de actividad proteica para proporcionar una mejor estratificación del riesgo, así como para proporcionar orientación terapéutica dirigida en leucemias agudas.

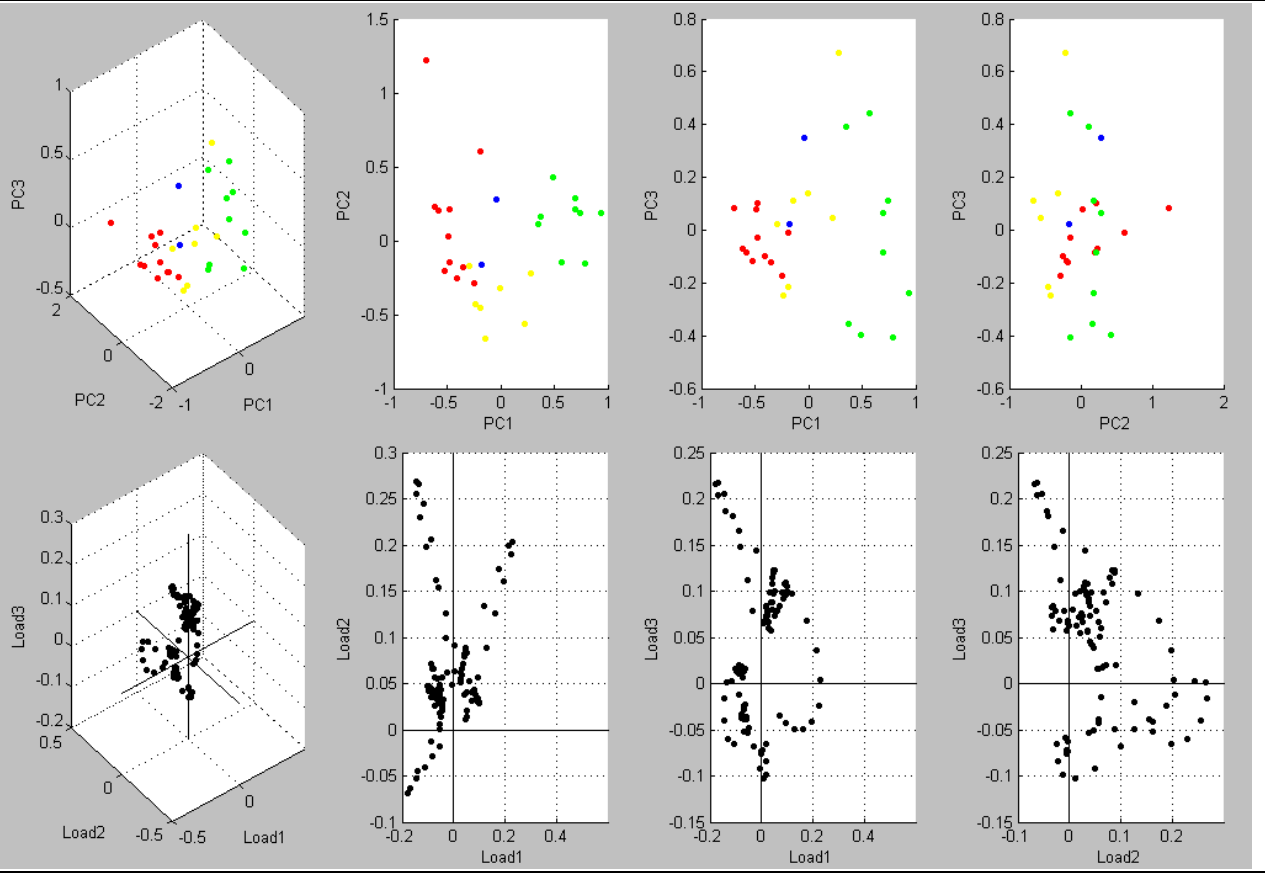
La aplicación más importante es la disponibilidad de la librería en centros de diagnóstico que tengan en sus instalaciones el instrumento Microflex LT MALDI- TOF MS, con el objetivo de realizar un screening en muestras de sangre periférica o médula ósea que tengan sospecha clínica de leucemia aguda.



# ANEXOS



# OCI3



U937

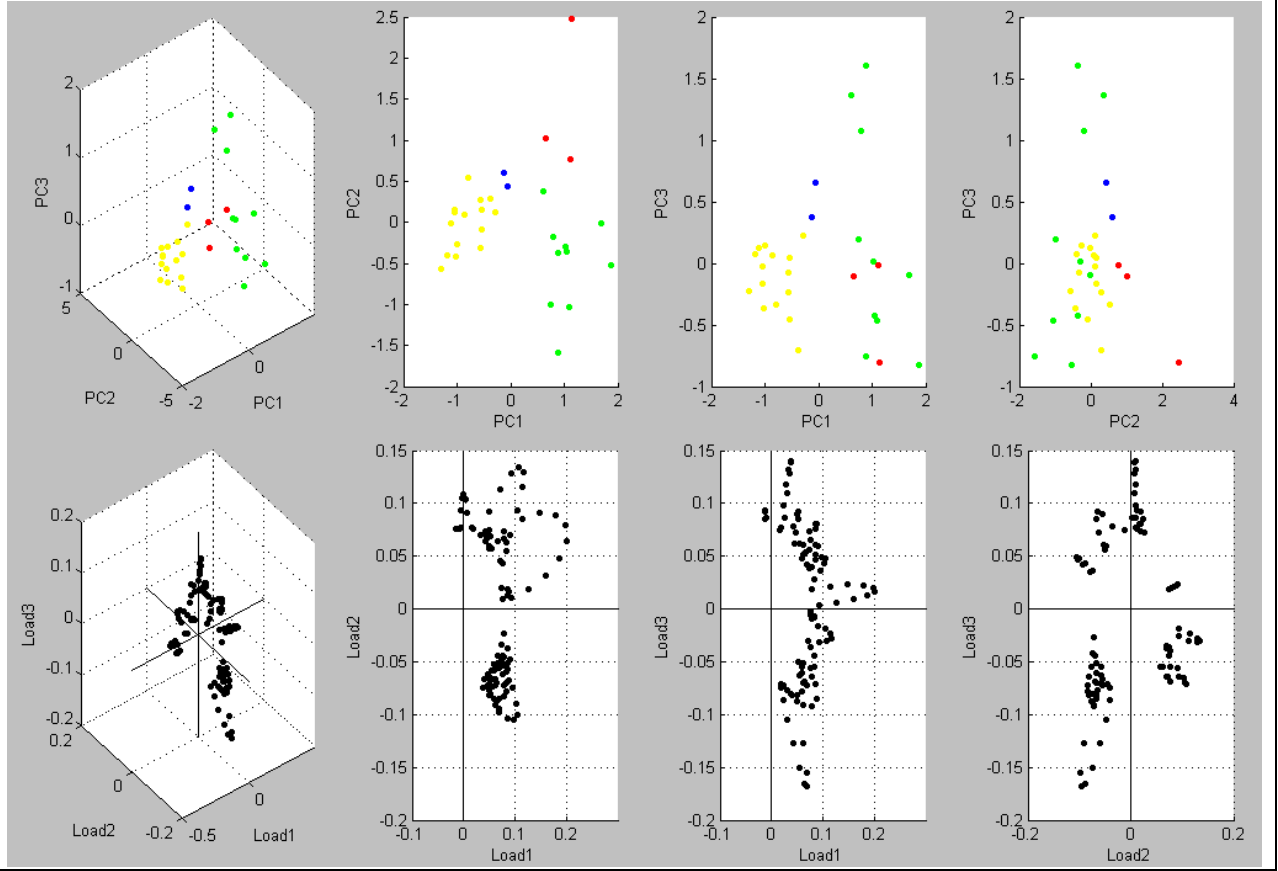
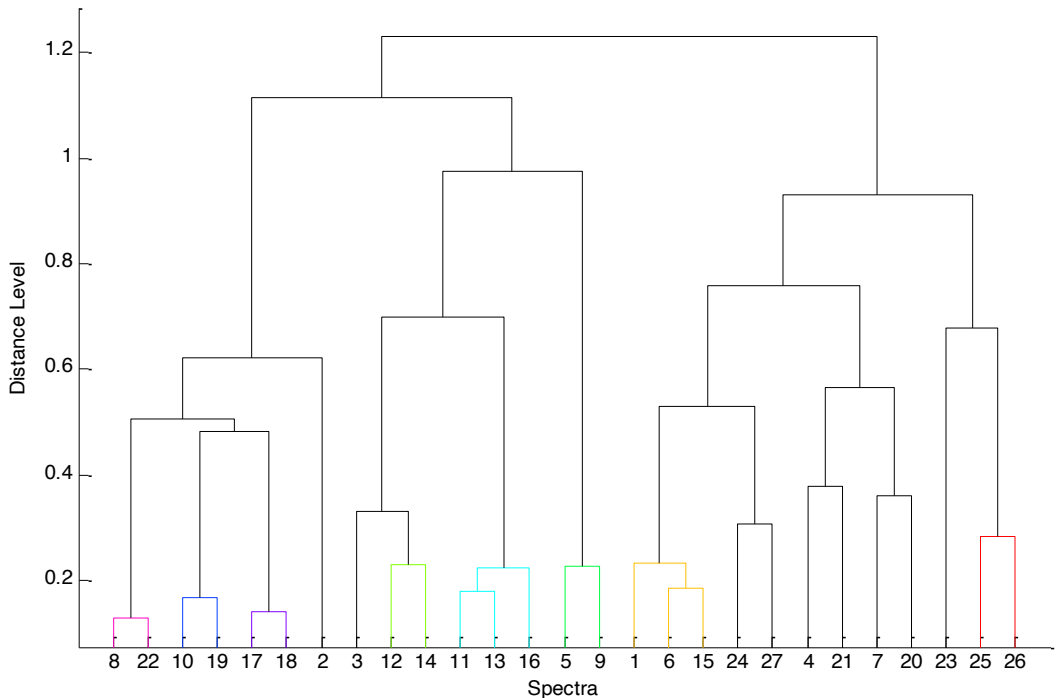
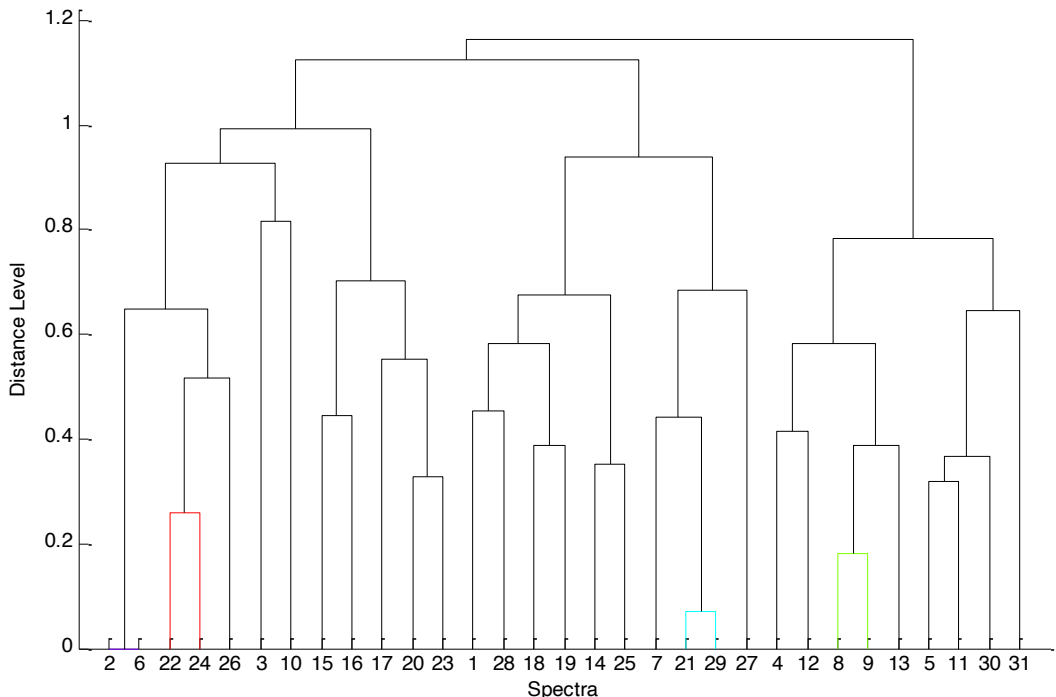
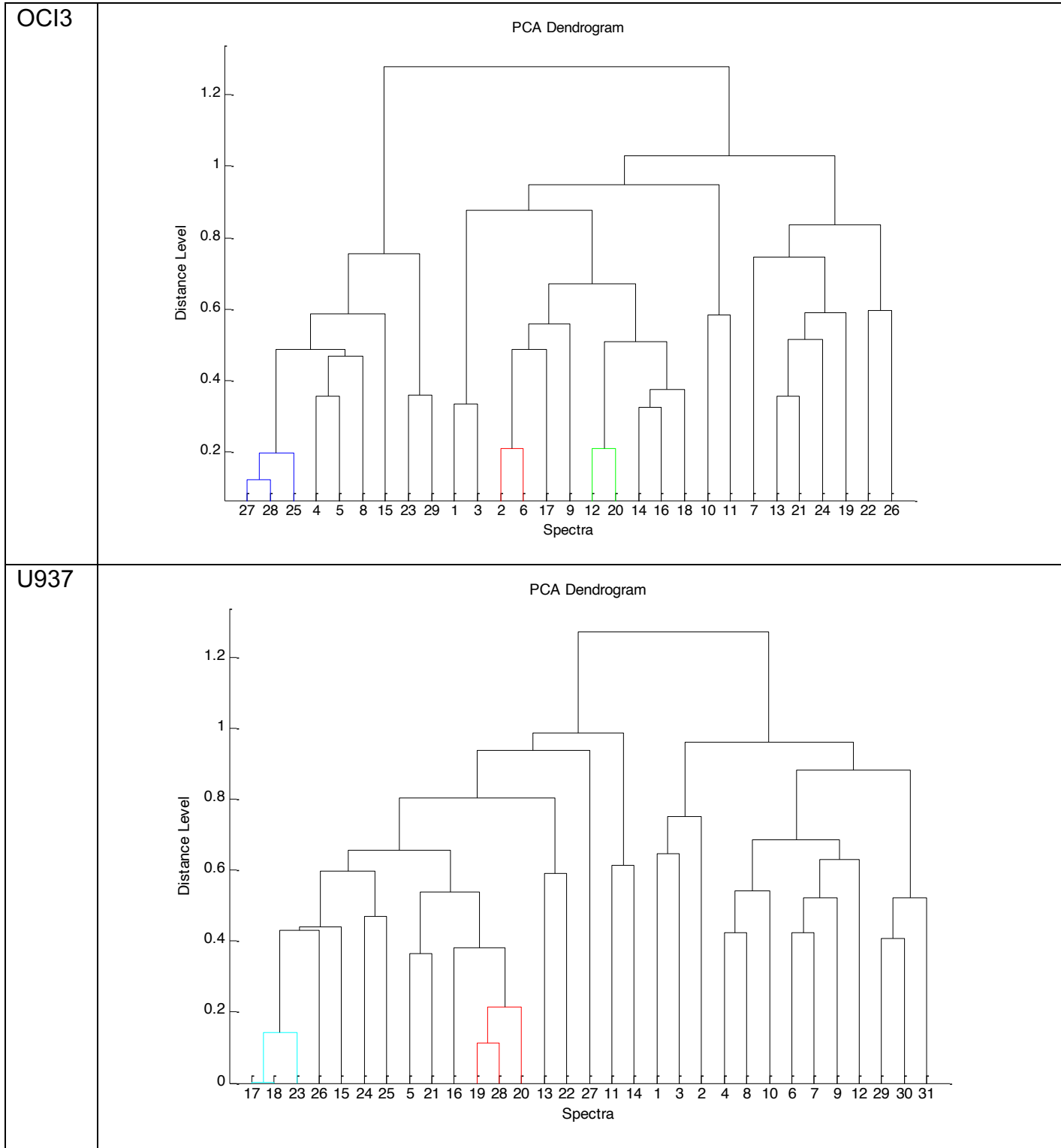


Tabla 9. Gráficas de PCA

Línea celular	Dendrograma
REH	<p style="text-align: center;">PCA Dendrogram</p> 
K562	<p style="text-align: center;">PCA Dendrogram</p> 



**Tabla 10. Gráficas de dendrograma**

Línea celular	Mapa de calor, gel normalized
REH	
K562	

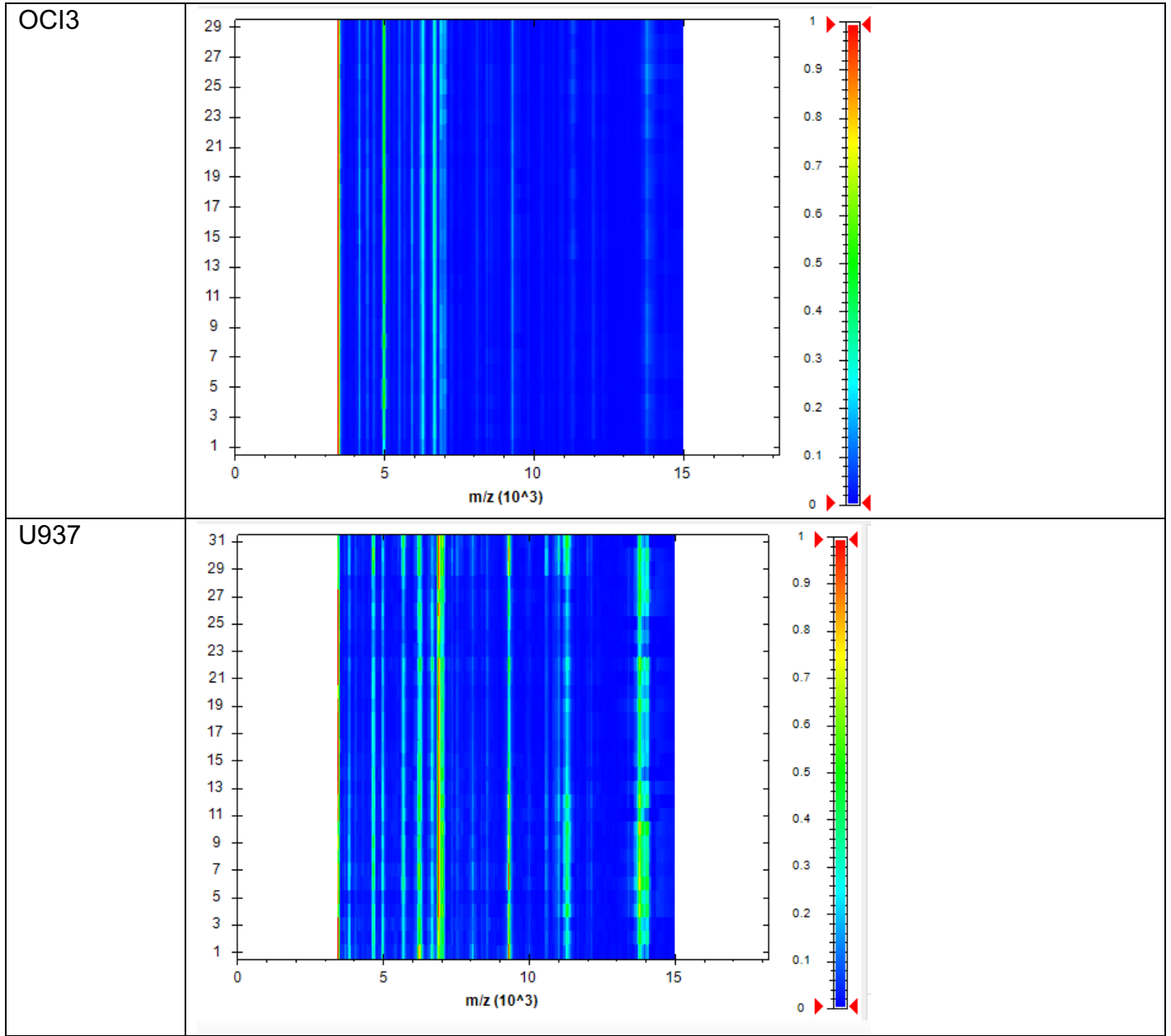


Tabla 11. Gráficas de mapas de calor por línea celular

## BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* [Internet]. 2016 May 19 [cited 2022 Mar 26];127(20):2391–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27069254/>
3. Parra-Ortega I et al. Concordancia entre el análisis morfológico y el inmunofenotipo. [cited 2022 Mar 26]; Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)[www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
4. Suárez VM, Suárez VM, Pérez LO del V, Domínguez GD, Abraham CM. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de las leucemias agudas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* [Internet]. 2015 Apr 10 [cited 2022 Mar 26];31(3). Available from: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/313>
5. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Jun 6];55(2):182–96. Available from: <https://academic.oup.com/chromsci/article/55/2/182/2333796>
6. Castellanos L, González LJ, Gabriel Padrón Y. PROTEÓMICA INTRODUCCIÓN. ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS.
7. García MO, Oviaño M, Belén G, Sánchez R, de Dios J, Pérez C, et al. Emilia Cercenado Mansilla Rafael Cantón Moreno.
8. Bai J, He A, Zhang W, Huang C, Yang J, Yang Y, et al. Potential biomarkers for adult acute myeloid leukemia minimal residual disease assessment searched by serum peptidome profiling. *Proteome Sci* [Internet]. 2013 Aug 3 [cited 2022 Mar 27];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23915341/>
9. Hegedus CM, Gunn L, Skibola CF, Zhang L, Shiao R, Fu S, et al. Proteomic analysis of childhood leukemia. *Leukemia* 2005 19:10 [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2022 Mar 26];19(10):1713–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/2403897>
10. Advantages & Disadvantages - Flow Cytometry [Internet]. [cited 2022 Apr 16]. Available from: <https://flowcytometry.weebly.com/advantages--disadvantages.html>
11. MALDI-TOF Advantages and Disadvantages [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <https://nursinganswers.net/essays/malдитof-advantages-disadvantages-3265.php?vref=1>
12. Hernandez-Valladares M, Bruserud Ø, Selheim F. The Implementation of Mass Spectrometry-Based Proteomics Workflows in Clinical Routines of Acute Myeloid Leukemia: Applicability and Perspectives. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 2 [cited 2022 Apr 16];21(18):1–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32957646/>
13. Clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of acute myeloid leukemia - UpToDate [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: [https://www.uptodate-com.ezproxy.javeriana.edu.co/contents/clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-acute-myeloid-leukemia?search=acute%20leukemia&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate-com.ezproxy.javeriana.edu.co/contents/clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-acute-myeloid-leukemia?search=acute%20leukemia&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)



14. Cancer Statistics Review, 1975-2015 - SEER Statistics [Internet]. [cited 2022 Mar 26]. Available from: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/)
15. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2008 May [cited 2022 Mar 27];19(4):379–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18064533/>
16. Key Statistics for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) [Internet]. [cited 2022 Jun 24]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>
17. Key Statistics for Acute Myeloid Leukemia (AML) [Internet]. [cited 2022 Jun 24]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html>
18. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2022 Jun 4]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
19. Leucemias en Colombia, ¿cuál es el panorama de la enfermedad en la población adulta? | Cuenta de Alto Costo [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://cuentadealtocosto.org/site/cancer/leucemias-en-colombia-cual-es-el-panorama-de-la-enfermedad-en-la-poblacion-adulta/>
20. Leukemia — Cancer Stat Facts [Internet]. [cited 2022 Jun 11]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>
21. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Jan [cited 2022 Mar 27];67(1):7–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28055103/>
22. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* [Internet]. 2016 Jan 7 [cited 2022 Mar 27];127(1):29–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26660431/>
23. Micol JB, Abdel-Wahab O. Collaborating constitutive and somatic genetic events in myeloid malignancies: ASXL1 mutations in patients with germline GATA2 mutations. *Haematologica* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2022 Mar 27];99(2):201. Available from: </pmc/articles/PMC3912947/>
24. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2022 Mar 27];381(9881):1943–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23523389/>
25. Brunning RD. Classification of acute leukemias. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2003 [cited 2022 Mar 27];20(3):142–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14552428/>
26. López-Pedreira C, Villalba JM, Siendones E, Barbarroja N, Gómez-Díaz C, Rodríguez-Ariza A, et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* [Internet]. 2006 [cited 2022 Mar 27];6 Suppl 1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16521150/>
27. Lavau C, Jansen J, Dejean A. The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia. *Pathol Biol (Paris)*. 1995;43(3):188–96.
28. Mejía-Buriticá L, Torres-Hernández JD, Vásquez G de J. Acute promyelocytic leukemia. State of the art. *Iatreia*. 2021;34(1):42–53.
29. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2010 Feb;24(1):35–63.

30. Arber DA, Borowitz MJ, Cessna M, Etzell J, Foucar K, Hasserjian RP, et al. Initial Diagnostic Workup of Acute Leukemia: Guideline From the College of American Pathologists and the American Society of Hematology. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 27];141:1342–93. Available from: [www.archivesofpathology.org](http://www.archivesofpathology.org)
31. López-Pedreira C, Villalba JM, Siendones E, Barbarroja N, Gómez-Díaz C, Rodríguez-Ariza A, et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* [Internet]. 2006 [cited 2022 Mar 27];6 Suppl 1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16521150/>
32. Kwak JY, Ma TZ, Yoo MJ, Hee Choi B, Kim HG, Kim SR, et al. The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2022 Mar 27];32(9):836–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15345285/>
33. Cui JW, Wang J, He K, Jin BF, Wang HX, Li W, et al. Proteomic analysis of human acute leukemia cells: insight into their classification. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2022 Mar 27];10(20):6887–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501966/>
34. Gaiger A, Linnerth B, Mann G, Schmid D, Heinze G, Tisljar K, et al. Wilms' tumour gene (wt1) expression at diagnosis has no prognostic relevance in childhood acute lymphoblastic leukaemia treated by an intensive chemotherapy protocol. *European Journal of Haematology*. 1999;63(2):86–93.
35. Braoudaki M, Tzortzatou-Stathopoulou F, Anagnostopoulos AK, Papathanassiou C, Vougas K, Karamolegou K, et al. Proteomic analysis of childhood de novo acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome/AML: correlation to molecular and cytogenetic analyses. *Amino Acids* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 Mar 27];40(3):943–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20711619/>
36. Foss EJ, Radulovic D, Stirewalt DL, Radich J, Sala-Torra O, Pogossova-Agadjanyan EL, et al. Proteomic classification of acute leukemias by alignment-based quantitation of LC-MS/MS data sets. *J Proteome Res* [Internet]. 2012 Oct 5 [cited 2022 Mar 27];11(10):5005. Available from: [/pmc/articles/PMC3564549/](http://pmc/articles/PMC3564549/)
37. Wang D, Lv YQ, Liu YF, Du XJ, Li B. Differential protein analysis of lymphocytes between children with acute lymphoblastic leukemia and healthy children. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2013 Feb [cited 2022 Mar 27];54(2):381–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22812402/>
38. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* [Internet]. 2017 Jan 26 [cited 2022 Mar 27];129(4):424–47. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/129/4/424/36196/Diagnosis-and-management-of-AML-in-adults-2017-ELN>
39. Nicolas E, Ramus C, Berthier S, Arlotto M, Bouamrani A, Lefebvre C, et al. Expression of S100A8 in leukemic cells predicts poor survival in de novo AML patients. *Leukemia* 2011 25:1 [Internet]. 2010 Nov 12 [cited 2022 Mar 27];25(1):57–65. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2010251>
40. Gardin C, Chaibi P, de Revel T, Rousselot P, Turlure P, Micléa JM, et al. Intensive chemotherapy with idarubicin, cytosine arabinoside, and granulocyte colony-stimulating factor (C-CSF) in patients with secondary and therapy-related acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1997;11(1):16–21.

41. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Mar 27];144(3):393–410. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26276770/>
42. Acute Myeloid Leukemia: A Review - PubMed [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32236160/>
43. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2019 Sep 19 [cited 2022 Mar 27];60(11):2606–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092071/>
44. Aldoss I, Stein AS. Advances in adult acute lymphoblastic leukemia therapy. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2022 Mar 27];59(5):1033–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28745565/>
45. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Vol. 30, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2012. p. 635–44.
46. Sparbier K, Wenzel T, Dihazi H, Blaschke S, Müller GA, Deelder A, et al. Immuno-MALDI-TOF MS: New perspectives for clinical applications of mass spectrometry. Vol. 9, *Proteomics*. 2009. p. 1442–50.
47. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 2017 18:1 [Internet]. 2017 May 5 [cited 2022 Mar 27];18(1):1–15. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1215-1>
48. Hu CW, Qutub AA. Proteomics in Acute Myeloid Leukemia. *Myeloid Leukemia* [Internet]. 2017 Dec 20 [cited 2022 Mar 27]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/57071>
49. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2022 Mar 27];55(2):182–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28087761/>
50. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio* [Internet]. 2018 [cited 2022 Mar 27];22(1):35–45. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922018000100035&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922018000100035&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
51. Parker CE, Warren MR, Mocanu V. Mass Spectrometry for Proteomics. *Neuroproteomics* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Mar 27];71–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56011/>
52. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica* [Internet]. 2012 [cited 2022 Mar 27];30(10):635. Available from: </pmc/articles/PMC7103318/>
53. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Mar 27];30(2):140–6. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182013000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

54. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Mar 27];23:17–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28504240/>
55. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2022 Jun 11];36(2):380–407. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/2/380/565595>
56. Reh | ATCC [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-8286>
57. K-562 | ATCC [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-243>
58. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-22>
59. U-937 | ATCC [Internet]. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1593.2>
60. Tansey WP. Freeze-thaw lysis for extraction of proteins from Mammalian cells. *CSH Protocols* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2022 Jun 18];2006(7):pdb.prot4614-pdb.prot4614. Available from: <https://europepmc.org/article/med/22484670>
61. Serafim V, Shah A, Puiu M, Andreescu N, Coricovac D, Nosyrev AE, et al. Classification of cancer cell lines using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and statistical analysis. *International Journal of Molecular Medicine* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Jun 18];40(4):1096–104. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2017.3083/abstract>
62. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(AUG):791.
63. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2013 Jul [cited 2022 Jun 20];26(3):547. Available from: [/pmc/articles/PMC3719498/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2419498/)
64. (PDF) Guide for the interpretation of MALDI-TOF (Bruker Daltonics) results: Alternatives for microorganism identification. 2da. ed. Buenos Aires: ANLIS; UBA, 2020. [Internet]. [cited 2022 Jun 18]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/340256855\\_Guide\\_for\\_the\\_interpretation\\_of\\_MALDI-TOF\\_Bruker\\_Daltonics\\_results\\_Alternatives\\_for\\_microorganism\\_identification\\_2da\\_ed\\_Buenos\\_Aires\\_ANLIS\\_UBA\\_2020](https://www.researchgate.net/publication/340256855_Guide_for_the_interpretation_of_MALDI-TOF_Bruker_Daltonics_results_Alternatives_for_microorganism_identification_2da_ed_Buenos_Aires_ANLIS_UBA_2020)
65. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2022 Jun 18];33(3):589–609. Available from: <http://www.labmed.theclinics.com/article/S0272271213000103/fulltext>
66. Holland RD, Duffy CR, Rafii F, Sutherland JB, Heinze TM, Holder CL, et al. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal Chem* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2022 Jun 18];71(15):3226–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10450164/>

67. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola B la, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2022 Jun 21];49(4):543–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19583519/>
68. Hillenkamp F, Karas M. [12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology*. 1990 Jan 1;193(C):280–95.
69. Fasih Ramandi N, Faranoush M, Ghassempour A, Aboul-Enein HY. Mass Spectrometry: A Powerful Method for Monitoring Various Type of Leukemia, Especially MALDI-TOF in Leukemia's Proteomics Studies Review. *Crit Rev Anal Chem* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 17]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499652/>
70. Kong D, Aoki S, Sowa Y, Sakai T, Kobayashi M. Smenospongine, a Sesquiterpene Aminoquinone from a Marine Sponge, Induces G1 Arrest or Apoptosis in Different Leukemia Cells. *Marine Drugs* [Internet]. 2008 [cited 2022 Jun 12];6(3):480. Available from: </pmc/articles/PMC2579737/>
71. Rosenfeld C, Goutner A, Venuat AM, Choquet C, Pico JL, Dore JF, et al. An effective human leukaemic cell line: Reh. *European Journal of Cancer* (1965). 1977;13(4–5):377–9.
72. Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW, et al. Nucleophosmin (B23) Targets ARF to Nucleoli and Inhibits Its Function. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2022 Jun 21];25(4):1258. Available from: </pmc/articles/PMC548001/>
73. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) Mutations in Adult and Childhood Acute Myeloid Leukemia: Towards Definition of a New Leukemia Entity. *Hematol Oncol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jun 20];27(4):171. Available from: </pmc/articles/PMC3069851/>
74. Quentmeier H, Martelli MP, Dirks WG, Bolli N, Liso A, MacLeod RAF, et al. Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *LEUKEMIA* [Internet]. 2018 [cited 2022 Jun 12];19(10):1760–7. Available from: <https://air.unimi.it/handle/2434/602653>
75. Xu J, Zhang W, Yan XJ, Lin XQ, Li W, Mi JQ, et al. DNMT3A mutation leads to leukemic extramedullary infiltration mediated by TWIST1. 2016;
76. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: A review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of Leukocyte Biology*. 1985;37(4):407–22.