



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MEXICO
CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INCORPORA A LA UNAM

**“ANÁLISIS DEL TRANSCRITO PML-RAR α EN
PACIENTES CON LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA
AGUDA QUE SE ENCUENTRAN EN TRATAMIENTO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

GABRIELA PAREDES ARREGUÍN

DIR. DE TESIS: DR. SERGIO GUTIÉRREZ CASTELLANOS.
M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER.

México, D.F.

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER

VOCAL: Q.F.B. JAVIER ARAIZA SANTIBAÑEZ

SECRETARIO: M. EDUARDO DEL REY PINEDA

1er SUPLENTE: DR. GUILLERMO DEL REY PINEDA

2ndo SUPLENTE: Q.F.B. GERARDO GARCÍA CAMACHO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA DE TESIS

**LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA ESPECIAL DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO GUTIÉRREZ CASTELLANOS

ASESOR INTERNO: M. JUAN ANTONIO GIMÉNEZ SCHERER

SUSTENTANTE: GABRIELA PAREDES ARREGUÍN

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por no abandonarme nunca, por haberme permitido lograr esta meta tan importante para mí y por haber puesto en mi vida a personas tan maravillosas que a continuación mencionaré.

A mis Padres: Todos sus esfuerzos, desvelos, consejos y todo su apoyo se ven reflejados ahora. Esta tesis es dedicada a mis padres, porque sin ustedes yo no sería nada. Espero no fallarles nunca. Los amo con todo mi corazón.

A mi abuelito Pepe: Que desde el cielo me ha guiado siempre. Pepe, este logro también es tuyo.

A mi Familia, mis tíos Patricia Arreguín, Francisco Mejía, Lourdes Arreguín, Teresita Vázquez, mis padrinos Teresa y José Luis Vallarino, mis primos Alejandra Mejía, Elsa Ávila, Arturo Ramírez, Arturo Zapata, mis sobrinos Mariana y Diego Ramírez Mejía, Arturo y Alejandro Zapata Ávila. Todos ustedes que son pieza fundamental en mi vida.

A mi Maestro, Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos: Que depositó su confianza en mí para llevar a cabo este proyecto de tesis, por transmitirme sus conocimientos. Gracias por enseñarme que la sabiduría va de la mano de la honestidad y humildad. Mi mas sincera admiración y respeto.

Al Dr. Juan Antonio Giménez Scherer: Por haberme dado la oportunidad de conocerme, por su infinita ayuda tanto profesional como personal y por confiar en mí siempre.

A mis compañeros del Laboratorio de Hematología Especial; Laurita, Lupita, Erick y Benjamín: Por haberme hecho grata la estancia durante la realización de esta tesis. Gracias por su ayuda y por transmitirme sus conocimientos y por esos excelentes momentos de alegría dentro del laboratorio.

Mis mas sinceros agradecimientos al Dr. Luis A. Meillón García, a la M en C. Rocío Godínez Quezada, a la Dra. Cinthya Gómez, Dra. Carolina Cobos del Servicio de Hematología Especial del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI del IMSS: Por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto de tesis.

A mis profesores, Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez, M. Eduardo del Rey Pineda, Dr. Guillermo del Rey Pineda, Q.F.B. Gerardo García Camacho: Por todas sus enseñanzas durante la carrera y por su ayuda en la revisión de esta tesis.

Y a ti Aldo: Por animarme y apoyarme en todo momento, por impulsarme a ser mejor cada día y por estar a mi lado.

A todos ustedes, muchas gracias.

LA REALIZACIÓN EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE
HEMATOLOGÍA ESPECIAL DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CENTRO MÉDICO NACIONAL
SIGLO XXI DEL INSITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASÍ MISMO EL MATERIAL Y EQUIPO NECESARIO FUE PROPORCIONADO POR EL INSITUTO
MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCION

Hematopoyesis

Leucemias Agudas

Definición. Criterios diagnósticos y diagnóstico diferencial

Epidemiología y etiología

Manifestaciones clínicas y de laboratorio

Leucemias agudas mieloblásticas

Morfología y citoquímica. Clasificación FAB.

Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC)

LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (M3)

Tratamiento de la Leucemia promielocítica aguda en el adulto

II. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

III. JUSTIFICACIÓN

IV. OBJETIVO GENERAL

V. OBJETIVOS PARTICULARES

VI. HIPÓTESIS

VII. MATERIAL Y METODOS

VIII. RESULTADOS

Calidad del RNA

Estandarización de la RT-PCR

Determinación de la expresión del gen PML-RAR α , transcritos (*bcr1*, *bcr2*, *bcr3*) en pacientes con LMA-M3 por PCR anidado

Determinación de la expresión del gen *bcr* en pacientes con LMA-M3 por RT-PCR.

IX. DISCUSIÓN

X. CONCLUSIONES

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Palabras clave: Leucemia promielocítica aguda; gen PML-RARalfa; RT-PCR.

ABREVIATURAS

abl	Protooncogen abl (Abelson)
ATP	Trifosfato de adenosina
ATRA	ácido <i>all-trans</i> -retinoico
bcr	Protooncogen bcr (región de puntos de ruptura)
BCR1	isoforma larga, rompimiento entre el intrón 6 en el gen PML (427 pb)
BCR1 v	isoforma larga variante (464 pb)
BCR2	isoforma variante, rompimiento entre el exón 6 en el gen PML (+/- 427 pb)
BCR3	isoforma corta, rompimiento entre el intrón 3 en el gen PML (393 pb)
BCR3 v	isoforma corta variante (338pb)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CID	Coagulación intravascular diseminada
CMN	Células mononucleares
CTH	Célula totipotencial hematopoyética
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico
kb	Kilobase
kD	Kilodaltones
LMA	Leucemia mieloide aguda

LPA	Leucemia promielocítica aguda
MIH	Microambiente inductivo hematopoyético
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos
pM	Picomoles
PML-RAR α	Locus promielocítico - Receptor α de retinoides
RC	Remisión completa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa inhibidor	Compuesto inhibidor de enzimas naturales que destruyen el RNA
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa

RESUMEN

La leucemia promielocítica aguda (LPA) constituye el 10-15% de las leucemia mieloides agudas (LMA).

En la LPA se ha identificado una anomalía citogenética característica en alrededor del 90% de casos, la $t(15;17)$. Esta translocación produce una fusión de especies de RNA mensajero PML-RAR α , que pueden ser detectados por amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa (RT-PCR). Este método se estableció por ser rápido y sensible para el diagnóstico de la LPA. Se conocen tres transcritos diferentes PML-RAR α , dependiendo del sitio de rompimiento en el gen PML, si el rompimiento es en el intrón 6 produce una isoforma larga (bcr1, 55% de los casos) o en el exón 6 produce una isoforma variante (bcr2, 5%) o en el intrón 3 produce una isoforma corta (bcr3, 40%).

La expresión de transcritos PML-RAR α , fue investigada en 30 pacientes adultos usando la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa (RT-PCR). Se procesaron muestras de médula ósea o sangre periférica. Los leucocitos totales se purificaron y se extrajo RNA, sintetizando cDNA para llevar a cabo el PCR-anidado.

Una vez estandarizada la técnica de RT-PCR con 2 μ g de hexámeros y 2 μ g RNA se encontró que el 80% de nuestros pacientes (24 casos) fueron negativos siguiendo el tratamiento con ATRA y quimioterapia y 20% (6 casos) expresaron el rearrreglo PML/RAR α de la isoforma bcr1.

Podemos concluir que la alta tasa de casos negativos (80%) indica que el esquema de tratamiento para nuestros pacientes fue adecuado.

La incidencia solamente de la isoforma bcr1, indica que probablemente dicha isoforma es más resistente al tratamiento que las isoformas bcr2 y bcr3.

SUMMARY

Acute Promyelocytic Leukemia (APL) constitutes 10-15 % of AML.

APL contains a cytogenetic anomaly involved 90% of the cases, *t(15;17)*. This translocation yields a fusion messenger RNA species that can be detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

This assay is now established as a rapid and sensitive method for diagnosis of APL. There are three PML-RAR α different transcripts, it depends on the breakpoint in PML gene, breakpoints within intron 6 produce a long PML-RAR α isoform (bcr1) (55%) whereas breakpoints within intron 3 of PML results in a shorter form (bcr3) (5%) or within exon 6 produce a variant isoform (bcr2, 40%).

The presence of PML-RAR α transcripts was investigated in 30 adult patients using a reverse transcription-polymerase chain reaction. The bone marrow and peripheral blood samples were prepared. The leukocytes were purified; RNA was extracted and to perform the RT-PCR assay, cDNA was synthesized.

Once standardized RT-PCR's assay with 2 μ g of hexamers and 2 μ g RNA we found that 80% of the patients (24 cases) were negative following the treatment with ATRA and chemotherapy and 20% (6 cases) expressed the rearrangement PML-RAR α isoform bcr1.

We concluded that the high percentage of negative cases (80%) shows that the treatment given to the patients were the correct.

The bcr1 isoform, shows that probably this isoform is more resistant than the others isoforms bcr2 and bcr3.

I. INTRODUCCION:

I.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis se define como la serie de fenómenos concatenados que se inician a nivel unicelular con la autoduplicación, seguidos de diferenciación y maduración, culminando con la producción de elementos formes sanguíneos funcionales. Se considera la diferenciación como la secuencia de hechos genéticos que permiten a una célula sintetizar productos específicos, los que le confieren potencialidad para determinada función. La maduración es la secuencia de fenómenos bioquímicos y morfológicos iniciados por la diferenciación y que confieren capacidad funcional a la célula. Tanto las células estromales como las hematopoyéticas en el ser humano tienen un precursor común, la célula totipotencial hematopoyética (CTH). Las propiedades que definen a la CTH son su capacidad de autoduplicación, la que resulta en progenies con las mismas características de la CTH primitiva (unidad formadora de colonias de blastos UFC-B1), y la de dar origen a todos los elementos formes sanguíneos, que incluyen los de la serie mieloide como los eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos/mastocitos), monocitos/macrófagos y plaquetas, así como los linfocitos T y B y células plasmáticas de linaje linfoide. ⁽¹⁾

Los factores de crecimiento hemolinfopoyéticos son indispensables en el proceso de formación de células sanguíneas y se dividen en interleucinas (IL) y factores estimulantes de colonias (FEC). Las características generales de estas citocinas incluyen: estructura glicoproteínica, actividad *in vitro* e *in vivo* a bajas concentraciones, que son producidas por diferentes tipos de células, generalmente regulan más de una línea celular y muestran efecto aditivo o sinérgico con otros factores de crecimiento, modulan la expresión de genes reguladores productores de citocinas y con frecuencia actúan en la contraparte neoplásica de las células normales. De todos los factores de crecimiento hemolinfopoyéticos reconocidos, es quizá la IL-3 la más investigada hoy en día por la capacidad que posee de estimular múltiples líneas celulares, así como la síntesis de inmunoglobulinas (Igs). ⁽¹⁾ Figura 1.

I.2 Leucemias Agudas.

Definición. Criterios diagnósticos y diagnóstico diferencial.

Las leucemias agudas son proliferaciones malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico, cuya acumulación progresiva se acompaña de una disminución en la producción de los elementos mieloides normales. ⁽⁴⁾

El diagnóstico se basa en la observación de una blastosis medular que iguale o supere el 30% de la totalidad celular, ya que el hallazgo de algunas células blásticas, tanto en médula ósea como en sangre periférica, no indica necesariamente la existencia de leucemia aguda. La blastosis medular suele oscilar entre el 50 y 100% y su aspecto varía según el tipo morfológico. El diagnóstico correcto

requiere el examen simultáneo de la sangre y de la medula ósea y ocasionalmente la biopsia medular. ⁽⁴⁾

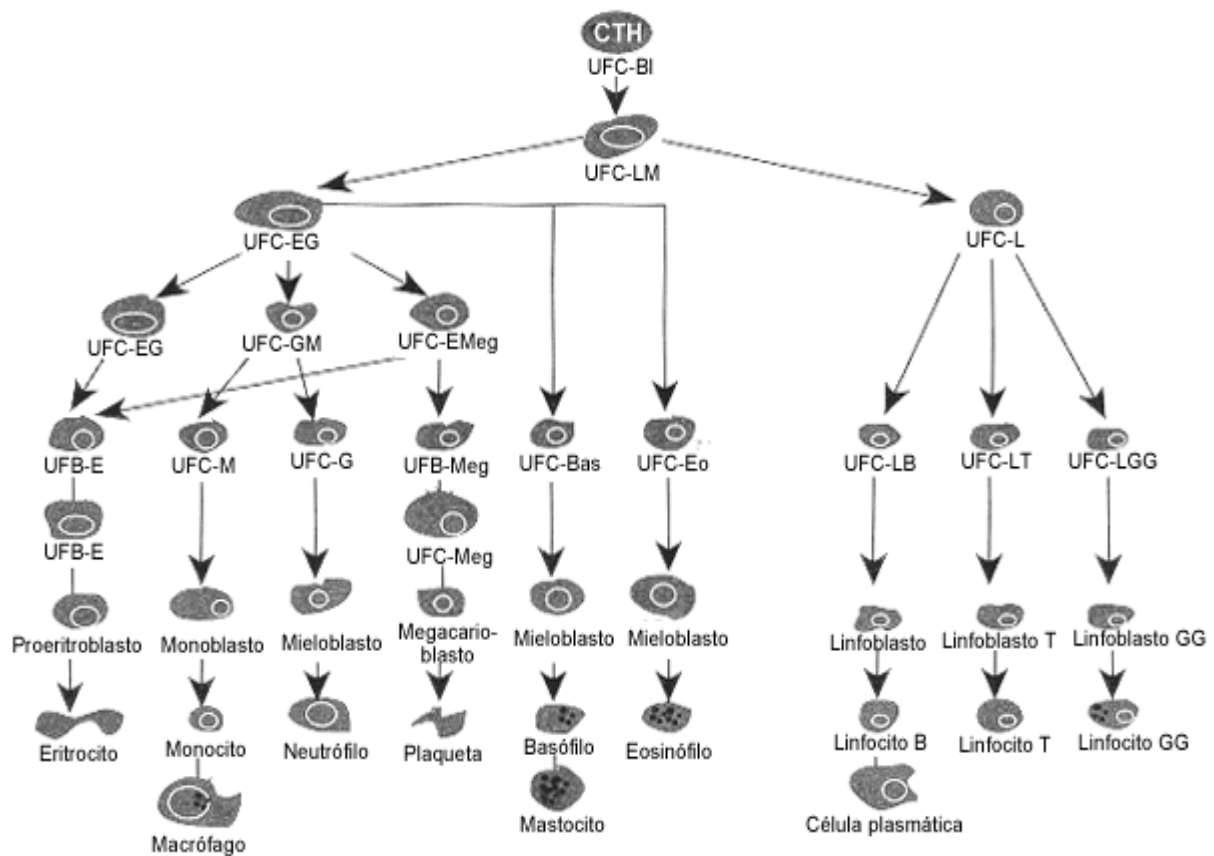


Figura 1. Representación esquemática de la Hematopoyesis.

CTH = célula totipotencial hematopoyética. UFC= unidad formadora de colonias. UFB = unidad formadora de brotes. BI= blastos. LM = linfocito mielocítico. GEMM = granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos. L = linfocito. EG = eritrocitos y granulocitos, megacariocitos. M = monocitos. G = granulocitos. Meg = megacariocitos. Bas = basófilos. Eo = eosinófilos. LB = linfocitos B. LT = linfocitos T. LGG = linfocitos grandes granulares. (Ruiz Arguelles, 1998 y Villareal M, 1992)

Junto con la infiltración se constata una disminución o desaparición de las células hematopoyéticas normales, con ausencia de los elementos de estadio madurativo intermedio (hiato leucémico). En las formas mieloides suelen aparecer acentuados signos morfológicos disgranulopoyéticos, como hipogranularidad, asincronismo madurativo núcleo-citoplásmico y núcleos de aspecto pelgeroide. ⁽⁴⁾

El estudio morfológico óptico, citoquímico, ultraestructural, inmunológico y citogenético detallado es fundamental para etiquetar el tipo de leucemia aguda. La amplia metodología de estudio de las células blásticas se resume en la tabla 1.

El diagnóstico diferencial debe establecerse con diversas entidades. Desde el punto de vista morfológico, la mayor posibilidad de confusión se presenta frente a la mononucleosis infecciosa u otras reacciones leucemoides linfocíticas. Las metástasis medulares masivas del neuroblastoma o del cáncer anaplásico de pulmón, entre otros, pueden dar una imagen de leucemia aguda.

Tabla 1. Técnicas de estudio de las células blásticas. (J.Sans-Sabrafen, 1994)

<i>Morfología óptica convencional</i>
<i>Citoquímica óptica</i> Mieloperoxidasa, sudán negro, cloroacetatoesterasa, esterasas inespecíficas (inhibición con FNa), reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS), fosfatasa ácida y sus isoenzimas, 5-nucleotidasa.
<i>Microscopia electrónica de transmisión y de barrido</i>
<i>Citoquímica e inmunocitoquímica ultraestructural</i> Mieloperoxidasa, peroxidasa plaquetaria, fosfatasa ácida
<i>Bioquímica</i> Lisozima sérica y urinaria
<i>Citogenética</i> Alteraciones cromosómicas cuantitativas y estructurales (Técnicas de bandeo)

Inmunología

Detección de diversos componentes y antígenos citoplásmicos y de membrana: cadena μ intracitoplasmática, inmunoglobulinas de superficie, TdT, HLA-DR, CD34, C-Kit, antígenos mieloides y monocíticos (CD13, CD14, CD33, CD15, CD11b, CD11c, CD68), antígenos de timocitos y células T maduras (CD1, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8), antígenos de células B (CD19, CD20, CD22), antígenos plaquetarios (CD41, CD42, CD61, factor VIII, factor plaquetario 4), antígenos eritroides (antiglicoforina, antiespectrina, etc.)

I.2.1 Epidemiología y etiología

El promedio de la incidencia de leucemia aguda en la población general es de 1 a 3 casos por cada 100,000 habitantes al año y se observa un ligero predominio masculino. La leucemia aguda mieloblástica muestra una incidencia que aumenta exponencialmente con la edad. ⁽⁵⁾

La etiología de las leucemias agudas se desconoce. Los factores genéticos tienen una gran importancia, como lo demuestra la mayor probabilidad de desarrollar una leucemia aguda que presentan los hermanos univitelinos de pacientes afectados. ⁽⁶⁾

Entre los factores externos involucrados en el origen de la leucemia aguda, la radiación ocupa un lugar importante. El benzol es el leucemógeno químico más conocido, como se ha demostrado por el aumento de leucemias agudas en trabajadores de industrias que lo manejan. El cloranfenicol y la fenilbutazona

son dos fármacos con posible potencial leucemógeno, aparte de su reconocida implicación en la aplasia medular. ⁽⁶⁾

I.2.2 Manifestaciones clínicas y de laboratorio

Leucemias agudas mieloblásticas

Los síntomas clínicos en las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) se deben al fallo medular por la proliferación leucémica y a la infiltración de diversos órganos y tejidos.

La infiltración medular, que acostumbra a ser masiva en las leucemias agudas *de novo*, provoca citopenias con sus consiguientes manifestaciones sistémicas. Un 80% de pacientes presenta anemia de intensidad variable, de tipo normocítica-normocrómica. La trombocitopenia se registra en el 80-90% de casos, con un 40-60% de pacientes que manifiestan signos hemorrágicos en el momento del diagnóstico, más frecuentes si la cifra de plaquetas es inferior a $20 \times 10^9/L$. La diátesis hemorrágica comprende desde una simple púrpura petequiral hasta una severa coagulación intravascular diseminada (CID). Esta última es especialmente frecuente en la variedad promielocítica (un 75-90% de casos), pero también puede suceder en un 5-25 % de las variedades M1, M2, M4 y M5, mientras que en la leucemia aguda linfoblástica su incidencia es inferior al 5%. Las hemorragias

retinianas son corrientes y en su producción, aparte de la trombocitopenia, se involucran la infiltración leucémica ocular y la anemia intensa. ^{(7) (8)}

La fiebre también es un signo clínico frecuente y se debe, principalmente, a etiología infecciosa. La neutropenia sucede en el 30-50% de enfermos y es la máxima responsable de la infección. La resolución del proceso infeccioso se impone antes de iniciar la quimioterapia, pues en caso contrario, el paciente cuenta con menos de la mitad de probabilidades teóricas de alcanzar la remisión completa.

La mediana de cifra leucocitaria es de $15-20 \times 10^9/L$ y en el 85% de casos se observan blastos en sangre periférica. En un 10% de pacientes, el número de leucocitos supera los $100 \times 10^9/L$, como sucede con mayor frecuencia en las variedades monocítica y mielomonocítica, lo cual puede ocasionar síntomas hiperleucocitósicos en el sistema nervioso central (SNC) y en el pulmón. ⁽⁹⁾

La exploración física de los pacientes con LMA, aparte de las anomalías clínicas causadas por las citopenias e infiltración tisular, demuestra en un 10-25% de casos linfadenopatías y visceromegalias. La hiperuricemia es usual, así como el aumento de la LDH (lacticodehidrogenasa) y ambas anomalías reflejan la masa tumoral leucémica. ⁽⁹⁾

I.3 Leucemias agudas mieloblásticas

Morfología y citoquímica. Clasificación FAB

La clasificación de las leucemias agudas que goza de mayor difusión y aceptación en el ámbito hematológico internacional es la elaborada en 1976 por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB). Esta clasificación se basa, únicamente, en el aspecto morfológico y en el comportamiento citoquímico de las células blásticas antes de establecer cualquier tratamiento terapéutico. ⁽¹⁰⁾

Así fue posible subclasificar las leucemias mieloides agudas en 6 variedades (M1-M6) y las linfoides agudas en tres (L1-L3). Esta clasificación inicial fue sujeta a ampliaciones y matizaciones por el mismo grupo FAB en 1985, con el resultado del reconocimiento de una séptima variedad de leucemia aguda mieloide denominada M7 o leucemia aguda megacarioblástica. Posteriormente, en 1991, se añadió una última variedad, la leucemia aguda con mínima diferenciación mieloide o M0. ⁽¹⁰⁾

El diagnóstico de estas dos variedades requiere la aplicación de técnicas inmunológicas (anticuerpos contra las glicoproteínas plaquetarias en el caso de la M7 y contra antígenos mieloides en la M0) y de citoquímica ultraestructural (reacción de la peroxidasa plaquetaria y de la mieloperoxidasa, para la M7 y M0, respectivamente). La tabla 2 muestra los criterios diagnósticos de las diferentes variedades de leucemias mieloblásticas aceptadas por el grupo FAB. En la tabla 3 se detallan las reacciones citoquímicas más características.

Actualmente, para seguir las nuevas directrices del FAB, se requieren dos recuentos medulares; uno basado en el total de células nucleadas para

determinar el tanto por ciento de células eritroides y otro referido al número de células blásticas sobre el total de células no eritroides. Así, si hay menos de un 50% de precursores rojos sobre el total de células medulares y un 30% o más de

Tabla 2. Clasificación FAB de las leucemias agudas mieloides. (J.Sans-Sabrafen, 1994)

Subtipo FAB	Denominación	Diferenciación predominante	% de células medulares		
			Blastos	Componente granulocítico*	Componente monocítico**
M0	Mieloblástica aguda con mínima diferenciación mieloide	_____	> 30; < 3 % MPO o NS +, MPO + por ultraestructura, CD13 y/o CD33+, marcadores de línea B y T negativos, morfología de blastos tipo L2.		
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	Granulocítica	> 90 > 3 MPO o NS+	< 10	< 10
M2	Mieloblástica aguda con maduración	Granulocítica	30-89	> 10	< 20
M3	Promielocítica	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos de núcleo reniforme o lobulado, múltiples bastones de Auer.		
M3v	Promielocítica (forma microgranular)	Granulocítica	> 30 promielocitos anómalos de núcleo monocitoide y ausencia de granulación o polvillo granular.		
M4	Mielomonocítica aguda	Granulocítica y monocítica	> 30	> 20	> 20
M4eos	Mielomonocítica aguda (variedad eosinófila)	Granulocítica y monocítica	> 30, eosinófilos atípicos con granulación inmadura (basófila) y alteraciones de la segmentación nuclear.		
M5a	Monoblástica aguda	Monocítica	> 30	< 20	> 80 (monoblastos)

M5b	Monocítica aguda	Monocítica	> 30	< 20	< 80 (monoblastos)
M6	Eritroleucemia	Eritrocítica y granulocítica	> 30 eritroblastos, > 50 % de las células nucleadas		
M7	Megacarioblástica	Megacariocítica	> 30; demostración de estirpe megacarioblástica por citoquímica ultraestructural (PPO) o técnicas inmunológicas.		

Promielocitos a polimorfonucleares. ** monoblastos a monocitos; MPO: mieloperoxidasa; NS: negro sudán; PPO: peroxidasa plaquetaria.

Tabla 3. Comportamiento citoquímico de las leucemias agudas mieloides. (J.Sans-Sabrafen, 1994)

Reacción citoquímica	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Mieloperoxidasa	+	++	+++	++	-/+	+	-
Sudán Negro B	+	++	+++	++	-/+	+	-
Cloroacetatesterasa	-/+	++	+++	-/+	-	+	-
Glucógeno	+d	+d	+d y m	+d	+d y m	+d y m	+m
Esterasas inespecíficas (FNA sensibles)	-	-	-	+	++	-	+
Fosfatasa ácida tartratosensible	+ d	+ d	+d	+d	++d	+d	++
Bandas isoenzimáticas	3b	3b	?	3b y 4	↑ 4	3b	?
B-glucuronidasa	+d	+d	+d	+d	++d	++d	
Fosfatasas alcalinas granulocíticas	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

+, ++, +++; diferentes grados de positividad; d: difuso; m: mazacotes b: banda supernumeraria; ↓ ↑ : incremento, desenso.

células blásticas, también sobre el total celular, se diagnostica leucemia mielo-blástica aguda, variedades M1-M5 y M7, y esas dependen del tipo y grado de maduración celular. Por el contrario, si hay un 50% o más de eritroblastos sobre el total de células medulares, pero menos de un 30% de blastos sobre un total de células no eritroides, el diagnóstico resultante es de síndrome mielodisplásico. Sólo en caso de una eritoblastosis del 50% o mayor, la cifra de blastos calculada sobre el total de células no eritroides iguale o supere al 30%, puede establecerse el diagnóstico de variedad M6 o eritroleucemia. Los porcentajes deben establecerse, a ser posible, sobre recuentos de 500 células.

I.3.1 Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC)

La inmunología y la citogenética han proporcionado una información valiosa en el terreno diagnóstico y pronóstico de las leucemias agudas. Un esfuerzo conjunto de especialistas de todas estas disciplinas ha culminado en una nueva clasificación denominada MIC, puesto que tiene en cuenta datos morfológicos, inmunológicos y citogenéticos y gracias a la cual se perfilan nuevas subvariedades de interés clínico-pronóstico. ⁽¹¹⁾ Tabla 4.

La *caracterización inmunofenotípica* se lleva a cabo mediante una amplia batería de anticuerpos monoclonales; algunos de éstos reaccionan con antígenos bien definidos, específicos para una determinada línea celular e, incluso, para un estadio madurativo concreto; otros son menos restrictivos, pero, cuando son

empleados como parte de una serie, también presentan una valiosa contribución diagnóstica y pronóstica al delimitar nuevas variantes y reconocer leucemias con marcadores linfoides y mieloides. El uso de 2 o 3 anticuerpos para cada una de las 3 principales estirpes -B, T y mieloide- permite establecer una clasificación inmunológica de las leucemias agudas que identifica correctamente la estirpe en el 98-99 % de los casos. ⁽¹²⁾

La *citogenética* ofrece una valiosa información desde el punto de vista etiológico, pronóstico y, probablemente, terapéutico. La nomenclatura MIC recoge esta información y consigna el tipo morfológico FAB seguido del signo barra (/) y la anomalía cromosómica específica entre paréntesis [ejemplo: M2/t(8;21)] ⁽¹³⁾(tabla 4). En el análisis citogenético se prefiere el estudio de la medula ósea al de la sangre periférica; se utilizan cultivos cortos, de 24 a 48 horas, e identificación cromosómica con técnica de bandeo, y debe examinarse un número suficiente de metafases (de 20 a 30). ⁽⁴⁾

Según Heim y Mitelman, en el 67% de los pacientes con leucemia aguda mieloblástica se detecta una alteración cromosómica. ⁽¹⁴⁾

Algunas anomalías están estrechamente ligadas a una concreta variedad morfológica como la t(15;17) a la variedad promielocítica, la t(8;21) a la M2 y la inv(16) a la M4 con eosinofilia. Otras, están presentes sin asociarse con una morfología determinada, como la trisomía 8, la monosomía 7 y 5, la pérdida del cromosoma Y, etc. ⁽¹³⁾

Tabla 4. Clasificación MIC de las leucemias agudas mieloblásticas. (J.Sans-Sabrafen, 1994)

Asociación morfología-cariotipo			
Cariotipo	Frecuencia (%)	FAB *	Nomenclatura MIC
t(8;21) (q22;q22)	12	M2	M2/t(8;21)
t(15;17) (q22;q12)	10	M3, M3v	M3/t(15;17)
t/del(11) (q23)	6	M5a(M5b;M4)	M5a/t(11q)
Inv/del(16) (q22)	5	M4eo	M4Eo/inv(16)
t(9;22) (q34;q11)	3	M1(M2)	M1/t(9;22)
t(6;9) (p21-22;q34)	1	M2 o M4 con basofilia	M2/t(6;9)
Inv(3) (q21;q26)	1	M1 (M2, M4, M7) con trombocitosis	M1/inv(3)
t(8;16) (p11;p13)	<0.1	M5b con fagocitosis	M5b/ t(8;16)
t/del(12)(p11-13)	<0.1	M2 con basofilia	M2 Baso/t(12p)
+ 4	<0.1	M4 (M2)	M4/+4
* entre paréntesis las asociaciones menos frecuentes			

Asociación marcadores de membrana-clasificación FAB							
Anticuerpos	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
HLA-DR	+	+	-	+	+	+/-	+/-
CD34	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-
CD33	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD13	+/-	+	+	+	+	-	NR
CD11	-	+	+/-	+	+	-	NR
CD15	-	+	+/-	+	+	+/-	NR
CD14	-	+/-	-	+	+	-	NR
Glucoforina A	-	-	-	-	-	+	-
Glucoproteínas plaquetarias IIb/IIIa, IIIa, Ib	-	-	-	-	-	-	+
NR: no referido							

I.4 LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (M3)

La leucemia promielocítica aguda (LPA) constituye el 10-15% de las LMA. Citológicamente se caracteriza por la presencia de promielocitos patológicos con abundante granulación citoplasmática intensamente azurófila. El núcleo de los promielocitos leucémicos, en caso de ser visible, presenta escotaduras, lobulaciones e incluso, dos segmentos nucleares. Es característica la presencia de inclusiones citoplasmáticas cristalinas del tipo de las *astillas*, que citoquímicamente se comportan como bastones de Auer, de los que difieren, sin embargo, en su ultraestructura. ⁽⁴⁾ Figura 2 y 3.

Se reconoce una variante de la forma clásica hipergranular denominada *variante microgranular* que representa el 25% de las leucemias agudas promielocíticas. Se caracteriza por la ausencia de gránulos observables a nivel óptico y por la presencia de un núcleo de configuración monocitoide o con imagen en hachazo, muy característica. ⁽⁴⁾

En la LPA se ha identificado una anomalía citogenética característica en el 90% de casos, la *t(15;17)*. Este marcador citogenético también es constante en la forma variante. La translocación fusiona el gen PML localizado en el brazo largo del cromosoma 15 con el gen del receptor alfa del ácido retinoico (RAR α)

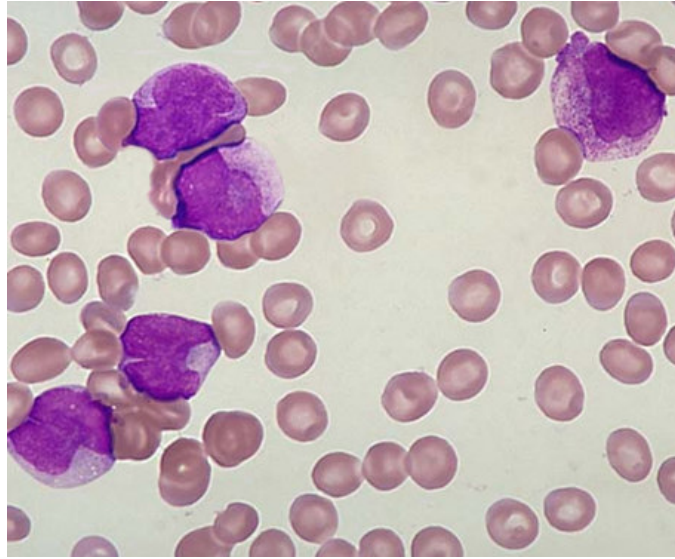


Figura 2. LMA-M3, presencia de promielocitos patológicos con abundantes gránulos con coloración azurófila. Los núcleos tienen una forma irregular, presentando escotaduras o lobulaciones.



Bastones de Auer

Figura 3. Leucemia mieloide aguda, presencia de bastones de Auer.

situado en el brazo largo del cromosoma 17 (Figura 4). Como consecuencia se produce un RNA mensajero que codifica proteínas quiméricas. Precisamente, la presencia del receptor alfa del ácido retinoico es la causa de que el ácido *all-trans-retinoico*, administrado terapéuticamente, sea capaz de inducir la diferenciación de los promielocitos leucémicos, y así se explica el gran número de RC conseguidas por este fármaco. ⁽¹⁵⁾

En clínica, la LPA se asocia con una diátesis hemorrágica atribuida a la coagulación intravascular diseminada que resulta de la liberación de sustancias procoagulantes, contenidas en los gránulos azurófilos de los promielocitos anormales.

Otra característica clínica destacada es el mayor número de RC respecto del resto de variedades FAB y su larga duración, que ha determinado que se considere una LMA de mejor pronóstico.

Los pacientes acostumbran a ser jóvenes, con una mediana de edad de 35 años y en el 80% la cifra inicial de leucocitos es baja. La fiebre sin evidencia clínica de infección y la ausencia de organomegalias son otros hechos diferenciales. En la variante microgranular suele haber más leucocitosis, que puede alcanzar hasta $200 \times 10^9/L$.

El rompimiento en el cromosoma 17 es dentro del gen receptor α ácido retinóico y el rompimiento en el cromosoma 15 es dentro del locus del gen originalmente referido como *MYL* y renombrado PML. El gen puede codificar un factor de transcripción único. La translocación resulta en dos nuevos genes quiméricos o fusionados, $RAR\alpha$ - PML que es activamente transcrito en leucemia promielocítica

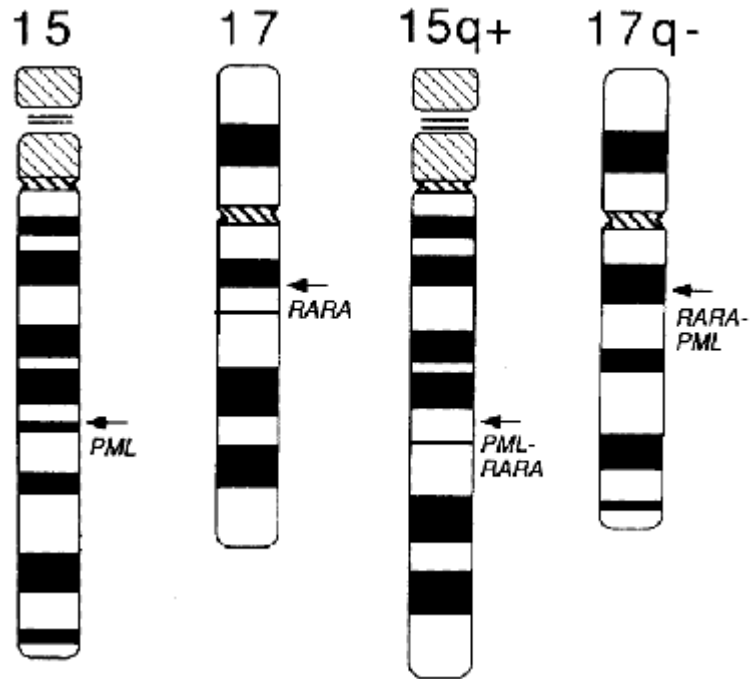


Figura 4. Dendrograma que representa la ubicación de los genes PML y RAR α en los cromosomas 15 y 17 normales (lado izquierdo) y translocados (lado derecho).

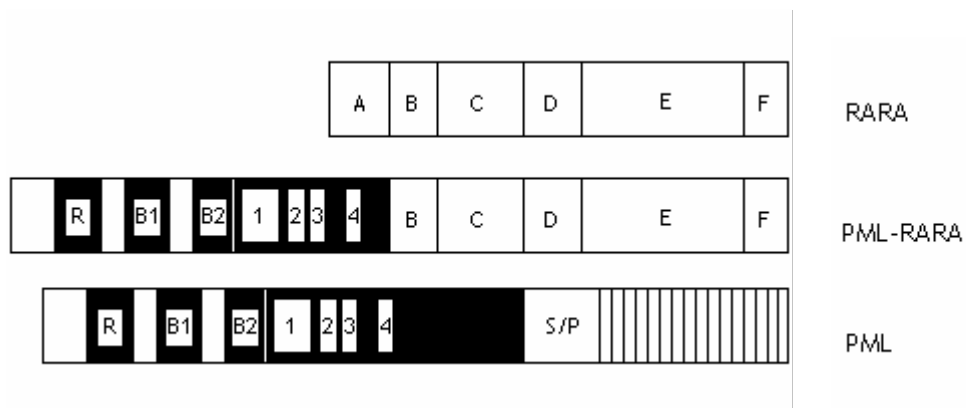


Figura 5. Organización modular del producto translocado de la LPA (PML/RAR α) que es comparado con el tipo silvestre PML y RAR α .

aguda y PML-RAR α que igual puede ser transcrito y puede contar con la aberración en la hematopoyesis.

El gen PML-RAR α tiene dos isoformas que producen un tipo de fusión largo y corto de mRNA respectivamente. El rompimiento del cromosoma 15 de la t(15;17) esta localizado variablemente en tres regiones del locus PML. En el 90% - 95% de los casos es distribuido igualmente entre el intron 6 (rompimiento en la region 1: *bcr1*, forma L) y el intron 3(*bcr3*, forma S) el resto del 5% al 10% de los casos estan localizados en el exon 6 (*bcr2*). ⁽¹⁶⁾ Los pacientes con la isoforma corta (forma S) pueden tener un mal resultado o consecuencia que aquellos con la forma larga (forma L). La reacción en cadena de la polimerasa del mRNA, del gen fusionado puede ser usado para identificar células residuales durante la remisión y puede predecir alguna recaída. El transcrito PML-RAR α puede reproducir la enfermedad en ratones. El efecto transformante específico del producto de la proteína es incierto. Figura 5.

La propensión a hemorragia es una notable característica de este subtipo. La protrombina, tiempos de tromboplastina parcial son prolongados y existe decremento del nivel de fibrinógeno plasmático en muchos casos. La alteración en la coagulación inicialmente se pensó que era el principal resultado de la coagulación intravascular iniciado por liberación procoagulante de los gránulos de los promielocitos leucémicos. La elevación de los complejos trombina-antitrombina, fragmento protrombina 1 + 2 y niveles de fibrinopeptido plasmático A, respaldan esta suposición. El incremento de niveles de productos

de degradación fibrinógeno-fibrina, dímeros D y activación de plasminógeno, indican fibrinólisis. Un decremento de niveles de plasminógeno, incrementan la expresión de annexin II en células leucémicas y reportes de respuesta al ácido tranexámico sostiene un importante papel en la fibrinólisis. La liberación de proteasas no específicas puede contribuir más a la fibrinogenólisis.

Aunque la leucemia promielocítica aguda responde al régimen de quimioterapia para LMA, especialmente a aquellos que contienen un antraciclínico como daunomicina o rubidason, el patrón citológico de respuesta en la médula es a menudo paradójico. La persistencia de promielocitos leucémicos precedieron remisión en ausencia de más terapia, mientras que la inducción de células hipoplásicas de la médula son clásicamente consideradas como requerimiento de remisión de pacientes con LMA. Generalmente si las células leucémicas blásticas persisten después de terapia, siguen recayendo a menos que la hipoplasia fuera inducida por más terapia citotóxica. El patrón inusual de respuesta en leucemia promielocítica aguda se puso en contexto mediante reportes de tratamiento exitoso con los isómeros del ácido retinóico que es sabido que lleva la maduración de los promielocitos leucémicos *in vitro*. En 1988 el éxito del ácido all-*trans*-retinóico en inducción a la remisión fue reportado y confirmado.

La tabla 5 muestra las características principales de la Leucemia Promielocítica Aguda.

Tabla 5. Características principales de la Leucemia Promielocítica Aguda

Leucemia Promielocítica Aguda

Características Citológicas Principales	Características Clínicas Principales	Características Principales de Laboratorio
<ol style="list-style-type: none"> 1. Células leucémicas se asemejan a los promielocitos. Tienen grandes gránulos primarios atípicos y un núcleo con forma de frijol. 2. La presencia de bastones de Auer son comunes. 3. Es positivo cuando es intensa la tinción con peroxidasa. 4. Hay una variante que presenta microgránulos (M3v), presentan el mismo curso y el mismo pronóstico. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Usualmente en adultos. 2. Hemorragias e hipofibrinogemia son comunes. 3. Las células leucémicas maduran en respuesta al, ácido <i>all-trans</i>-retinóico. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Las células contienen la t(15;17) u otra alteración en el cromosoma 17. 2. Las células son HLA-DR-negativo.

(Tomado de Williams, 2001)

I.4.1 Tratamiento de la Leucemia promielocítica aguda en el adulto

Se considera que la leucemia promielocítica aguda (LPA) es una forma de leucemia aguda mieloide de relativo buen pronóstico. El número de remisiones completas conseguido con los tratamientos de inducción tipo 3 + 7, o similares, alcanza el 60-87 % con escasas resistencias primarias (un 0-5%) y sin la fase de aplasia severa constante en el resto de LMA. ⁽¹⁵⁾ No obstante y también a diferencia de las otras variedades, en la mayoría de pacientes existe una coagulopatía que, es causa de una frecuente y precoz mortalidad. Los factores pronósticos que se han relacionado con un curso adverso son la edad superior a 50 años, la hiperleucocitosis, la variante microgranular, la presencia de sangrado activo, una cifra de plaquetas inferior a $10 \times 10^9/L$ y una blastosis en sangre periférica superior a $0.5 \times 10^9/L$. ⁽¹⁵⁾

La introducción del ácido *all-trans-retinoico* (ATRA) ha supuesto un cambio importante en el tratamiento de la LPA. El ATRA provoca una diferenciación madurativa de los promielocitos leucémicos a granulocitos neutrófilos, que son clonalmente patológicos e, incluso, muestran, en ocasiones, bastones de Auer.

La administración de ATRA por vía oral a la dosis habitual, $45 \text{ mg/m}^2/\text{día}$, logra un 84-96 % de remisión completa (RC), con mejoría rápida de la coagulopatía. En las recaídas posquimioterapia, el ATRA también consigue un número muy elevado de RC. Por sí solo no erradica la enfermedad, pues invariablemente los pacientes recaen entre los 5 y 16 meses. ^{(15) (17)}

La combinación de ATRA y quimioterapia parece ofrecer excelentes resultados. Fenaux ha presentado recientemente los resultados del tratamiento de 101 pacientes randomizados con ATRA más quimioterapia o quimioterapia sola, con una fase de consolidación posterior común a los dos brazos. Una mayor supervivencia libre de enfermedad así como un menor porcentaje de leucemia resistente y una menor duración de la coagulopatía eran evidentes en los pacientes tratados con ATRA y quimioterapia. ⁽¹⁸⁾ La estrategia parece ser, por lo tanto, administrar ATRA en primer lugar y consolidar inmediatamente la respuesta con quimioterapia tipo 3 + 7. ⁽¹⁸⁾

Un fenómeno constatado frecuentemente es la hiperleucocitosis que se produce por el tratamiento con ATRA y constituye el denominado *síndrome ATRA*. ⁽¹⁵⁾

La *coagulopatía* en la LPA se ha atribuido clásicamente a la liberación de sustancias procoagulantes presentes en los gránulos azurófilos de los promielocitos. Clínicamente se muestra en forma de coagulación intravascular diseminada (CID) en el 80 % de enfermos y en los que no está presente al diagnóstico aparece poco después de iniciada la quimioterapia o empeora con ésta. Determina una muerte hemorrágica precoz en el 10-20 % de pacientes. Si bien las manifestaciones clínicas y analíticas son las de una CID, el mecanismo es complejo y también comprende fibrinogenólisis (los blastos contienen activador tisular del plasminógeno) y degradación proteolítica del factor von Willebrand. El ATRA mejora rápidamente la coagulopatía en las primeras 48 horas de

tratamiento, aunque esta rápida corrección puede generar, incluso, un estado hipercoagulable que predispone a complicaciones tromboembólicas. ⁽¹⁾

II. PROBLEMA DE INVESTIGACION:

1. ¿Los pacientes con LPA tratados con quimioterapia y ATRA con al menos un año de seguimiento seguirán presentando el rearreglo PML-RAR α ?
2. ¿Será la misma metodología para lograr la expresión del gen fusionado

III. JUSTIFICACION:

1. Es importante implementar una vigilancia molecular en los pacientes con leucemia promielocítica aguda bajo tratamiento con ATRA y quimioterapia, mediante RT-PCR que es una de las técnicas más sensibles y rápidas para detectar la expresión del rearrreglo PML-RAR α . Con esta información, administrar un pronto tratamiento y prevenir una posible recaída.
2. Pacientes en remisión clínica y hematológica, se necesita estandarizar la técnica ya que al haber un tratamiento previo hay poca cantidad de transcritos y el gen no se expresará de la misma forma que en pacientes de novo.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la expresión de los transcritos bcr1, bcr2, bcr3 del oncogén PML-RAR α en pacientes con leucemia Promielocítica aguda en tratamiento, empleando la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa (RT-PCR)

V. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estandarizar la técnica de RT-PCR, para identificar el gen fusionado PML-RAR α .
2. Determinar las condiciones óptimas para obtener [RNA] de calidad.
3. Determinar la concentración óptima de RNA y hexámeros para la estandarización de la RT-PCR.
4. Identificar el gen fusionado PML-RAR α en pacientes bajo tratamiento con quimioterapia y ATRA.

VI. HIPOTESIS:

Los pacientes con LPA en tratamiento durante al menos un año con quimioterapia y ATRA ya no deben presentar el rearreglo *PML-RAR α* .

Criterios de población.

Pacientes adultos con LMA-M3.

Criterios de inclusión.

Se incluyeron 30 pacientes adultos con LMA-M3 bajo tratamiento con quimioterapia y ATRA con al menos 1 año de seguimiento, en uno de los 8 ciclos de mantenimiento o con tratamiento finalizado y en observación.

Criterios de exclusión.

Pacientes que no expresaron el gen normal *bcr*.

VII. MATERIAL Y METODOS:

Purificación de glóbulos blancos

Las muestras de sangre periférica o médula ósea se colectaron en tubo con EDTA o en jeringa con heparina de 1000 U en proporción 1:10, respectivamente. La muestra se diluyó 1:4 con solución de lisis fría (4 a 8°C), se mezcló suavemente y se incubó en hielo 15 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 8°C y la pastilla celular resuspendida en 1 ml de PBS se transfirió a un tubo Eppendorf. Luego de incubarse en hielo durante 2 min, se centrifugó a 3000 rpm 2 minutos, se lavó tres veces con PBS empleando estas mismas condiciones de centrifugación. Enseguida, las células se diluyeron 1:60 con azul de tripano y se contaron en la cámara de Neubauer. Además de contar las células, se analizó la viabilidad celular, la cual se obtuvo multiplicando el número de células viables por 100 y se dividió entre el total de células tanto viables como no viables. El promedio de las células viables contadas en los cuatro cuadrantes de glóbulos blancos, se multiplicó por el factor de dilución (60) y por la constante (10,000) para obtener la cantidad de células por mililitro.

Extracción de de RNA

Diez millones de células se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml, se adicionó 1 mL de Trizol y se homogenizaron con la micropipeta. Luego, la muestra se pasó a través de una jeringa de insulina 3 o 4 veces, se dejó a temperatura ambiente (TA) 5 min y se almacenó a -70°C hasta su uso.

La muestra de Trizol que estaba a -70°C se descongeló en hielo durante 10 min, se le agregaron 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 1 min y se incubó durante 3 min a TA. Luego, se centrifugó a 14,000 rpm 15 minutos a 4°C y la fase acuosa se pasó a otro tubo Eppendorf, se adicionaron 500 μl de isopropanol, se mezcló suavemente y se incubó a -20°C 30 min o 10 min a TA. Después de centrifugar a 14,000 rpm 10 min a 4°C , el botón de RNA se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 75%, resuspendiéndolo en el Vortex y centrifugándolo a 7500 rpm el primer lavado y a 12,000 rpm el segundo durante 5 min a 4°C .

Al botón de RNA se le evaporó el etanol y se disolvió en 20 μL de agua libre de RNAsas, se incubó en el termociclador a 55°C durante 10 min, luego en hielo 3 min y se centrifugó a 5000 rpm aprox. 20 segundos.

Cuantificación y determinación de pureza del RNA

El RNA se diluyó 1:100 con agua inyectable y se cuantificó en espectrofotómetro de luz UV con una celda de 1 cm de paso de luz a una longitud de onda de 260 nm. Una unidad de absorbancia (1A) equivale a 40 µg de RNA/mL. El RNA tiene un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas contaminantes absorben a 280 nm. La relación de absorbancia entre 260 nm/280 nm, proporciona el valor de pureza del RNA.

Esta pureza se evalúa, por la relación entre las concentraciones de RNA-Proteína donde éstas deberían estar entre 1.7 a 2.0, al igual por su integridad mostrando una relación de 2:1 entre las intensidades de las bandas 28 S y 18 S, esto se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidas con bromuro de etidio 0.5 µg visualizadas en el analizador de imágenes

Integridad del RNA

Las muestras de RNA (1µg) se mezclaron con azul de bromofenol y se cargaron en gel de agarosa al 1%. Se corrieron a 80 V durante 30 min, se tiñeron en bromuro de etidio durante 15 min y se visualizó en analizador de imágenes, se observaron las bandas 28S y 18S con peso molecular aproximado de 2.2 pb y 900 pb, respectivamente. Las muestras con RNA de buena integridad debían presentar una relación de 2:1 entre las intensidades de las bandas 28S y 18S.

Síntesis de cDNA's

En tubo Eppendorf (A) de 0.2 mL se colocaron 2 µg de RNA y se mezclaron con 2 µg de Hexámeros al azar, llevando la solución a un volumen final de 10 µL con agua. Se incubó 65°C durante 10 min y al término de este tiempo se colocó inmediatamente en hielo.

En otro tubo (B) se preparó la mezcla madre que contenía solución amortiguadora 1X, 1mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 20 U de inhibidor de RNasas y 4 U de enzima retrotranscriptasa inversa (Omniscript) en un volumen final de 10 µL.

Los tubos A y B se mezclaron e incubaron en el termociclador a 37°C durante 60 min, a 93°C durante 3 min y luego a 4°C. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En un tubo Eppendorf de 0.2 mL se hizo la mezcla de reactivos que contenía solución amortiguadora 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 15 pM de cada uno de los oligonucleótidos PML3:1211U19, PML3:861U19 y RARα:540L19 (secuencia de los oligos en la tabla 6), 0.7 U de enzima Taq polimerasa, 2 µl de cDNA y llevada a un volumen de 20 µl. Luego, se sometió a la amplificación en termociclador de la siguiente manera: 1 ciclo a 95°C/5 min, 30 ciclos a: 95°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/1min. Finalmente, una extensión a 72°C durante 7 min.

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5' a 3'
PML3:1211U19	CAAGAAAGCCAGCCCAGAG
PML3:861U19	GTGCGCCAGGTGGTAGCTC
RAR α :540L19	AAGCCCTTGCAGCCCTCAC
PML3:1370U21	GCCAGTGTCGCCTTCTCCAT
PML3:930U20	CAGCGCACTACGAGGAGAT
RAR α :508L22	CCCATAGTGGTAGCCTGAGGAC
B2B	ACAGAATTCCGCTGACCATCAATAAG
C5e-	ATAGGATCCTTTGCAACCGGGTCTGAA

PCR anidado

En tubo Eppendorf de 0.2 mL se mezclaron los reactivos que contenía solución amortiguadora 1X, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTP's, 15 pM de oligonucleótidos, PML3:1370U21, PML3:930U20, RAR α :508L22, 0.7 U de enzima Taq polimerasa, 1 μ l de producto de PCR y llevada a un volumen de 20 μ l.

Se sometió a la amplificación en termociclador de la siguiente manera: 1 ciclo a 95°C/5 min, 25 ciclos a: 95°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/1min. Finalmente, una extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% colocando 8 μ l de producto de PCR anidado más 2 μ L de amortiguador 6X. Se corrió a 80 V durante 30 min y se tiñó 10 min en bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

Los pesos moleculares esperados para el producto del gen fusionado PML-RAR α son: 393 y 338 pb para la forma S (pequeña) y 427 y 464 pb para la forma L.

BCR normal

En un tubo Eppendorf se hizo la mezcla madre que contenía solución amortiguadora 1X, 2 mM de MgCl, 0.2 mM de dNTP's, 15 pM de oligonucleótidos B2B y C5e-, 0.4 U de enzima Taq polimerasa, 2 μ l de cDNA y llevada a un volumen de 20 μ l.

La reacción se sometió a la amplificación en termociclador de la siguiente manera: 1 ciclo a 95°C/5 min, 35 ciclos a: 95°C/30seg, 58°C/30seg, 72°C/1min. Finalmente, una extensión a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% colocando 8µl de producto de PCR más 2 µL de amortiguador de corrimiento 6X. Se corrió a 80 V durante 30 min y se tiñó 10 min en solución de bromuro de etidio. El peso molecular esperado para el producto del gen BCR es de 808 pb.

VIII. RESULTADOS:

VIII.1 Calidad del RNA

El estudio se inició con 30 muestras de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda subtipo M3 (LMA-M3). Se eliminó una muestra, por mala calidad del RNA (Fig.6) y solamente se procesaron las muestras de los pacientes que presentaron buena calidad de RNA, como se describió en material y métodos.

VIII.2 Estandarización de la RT-PCR.

Los parámetros que se evaluaron para lograr las condiciones adecuadas del RT-PCR, fueron las concentraciones de hexámeros y de RNA. Inicialmente se emplearon las condiciones estandarizadas previamente en nuestro laboratorio en muestras de pacientes con leucemia *de novo*: 0.5 µg de hexámeros con 1 µg de RNA. Sin embargo, al observar problemas en la amplificación en las muestras de los pacientes previamente tratados, encontramos que empleando 2 µg de hexámeros y 2 µg de RNA, los resultados mejoraron favorablemente (Fig. 7).

VIII.3 Determinación de la expresión del gen PML-RAR α , transcritos (bcr1, bcr2, bcr3) en pacientes con LMA-M3 por PCR anidado.

Al aumentar la sensibilidad y especificidad con una segunda reacción de PCR, se emplearon tres oligos internos.

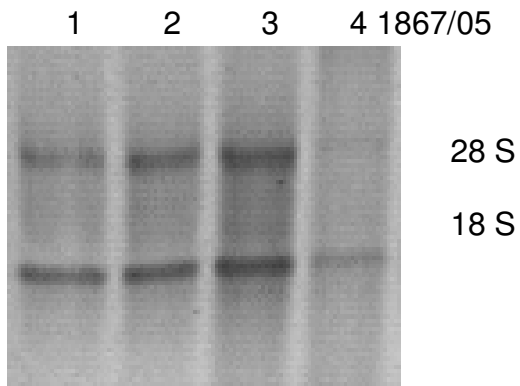


Figura 6. RNA de pacientes con LMA-M3. Carril 1, 2, 3: RNA de buena calidad, carril 4: RNA degradado. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 1.5%, a 80 V durante 30 min teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV.

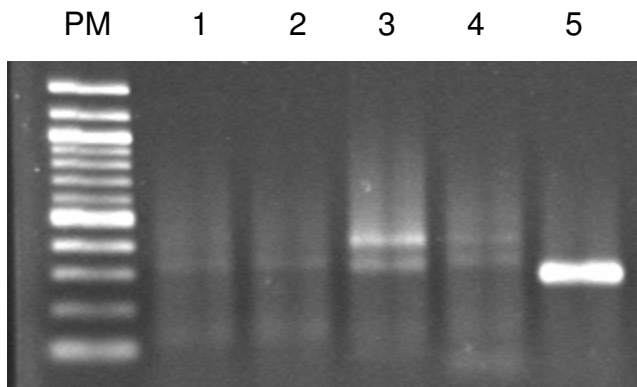


Figura 7. Expresión del gen fusionado PML-RAR α mediante RT-PCR anidado. Carril 1: muestra 1659/05 con 2 μ g de hexámeros y RNA, carril 2: muestra 1659/05 con 1 μ g de hexámeros y RNA, carril 3: muestra 1685/05 con 2 μ g de hexámeros y RNA, (isoforma bcr1), carril 4: muestra 1685/05 con 1 μ g de hexámeros y RNA, carril 5: control positivo (889/05, isoforma bcr3). PM: marcador de peso molecular. Condiciones de corrida como se describen en la figura 1.

Se hizo un gel grande para observar mejor los pesos moleculares. Seis muestras fueron positivas con la isoforma bcr1 (427 pb) del gen PML-RAR α y 18 negativas. (Fig. 8, 9)

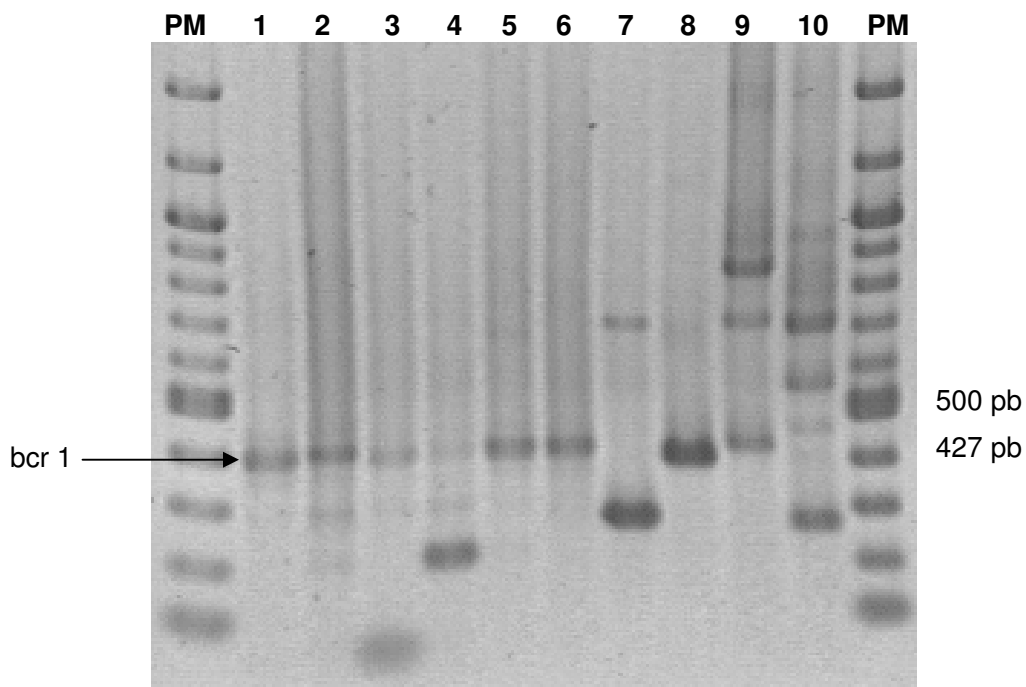


Figura 8. Expresión del gen fusionado PML-RAR α por PCR anidado. Carril 1,2,3,4,5,6: muestras positivas con la isoforma bcr1 del gen PML-RAR α . Carril 7: control positivo. Carril 8: control positivo isoforma bcr 3 (338 pb). Carril 9: control positivo isoforma bcr 1 (464 pb). Carril 10: control positivo isoforma bcr1 (427 pb). PM: marcador de peso molecular. Condiciones de corrida como se describen en la figura 1.

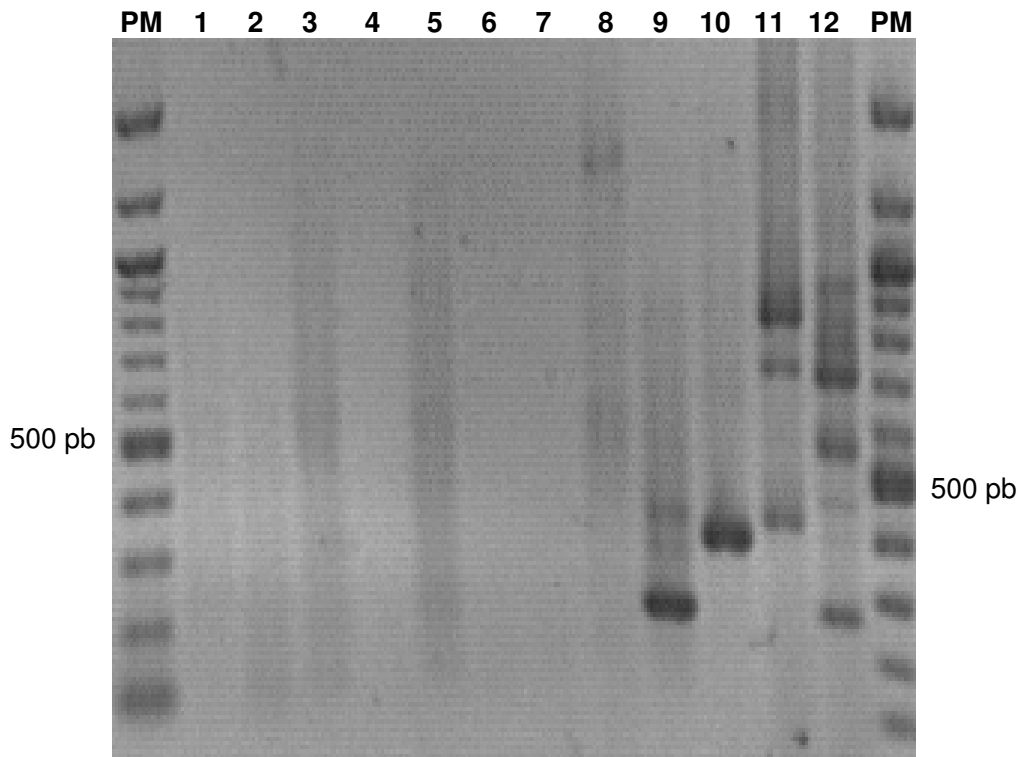


Figura 9. Expresión del gen fusionado PML-RAR α por PCR anidado. Carril 1,2,3,4,5,6,7,8: muestras negativas del gen PML-RAR α . Carril 9: control positivo. Carril 10: control positivo isoforma bcr 3 (338 pb). Carril 11: control positivo isoforma bcr 1 (464 pb). Carril 12: control positivo isoforma bcr1 (429 pb). PM: marcador de peso molecular. Condiciones de corrida como se describen en la figura 1.

VIII.4 Determinación de la expresión del gen *bcr* en pacientes con LMA-M3 por RT-PCR

De los 30 pacientes con LMA-M3 analizados, 22 expresaron en el gen normal *bcr*.

(Fig. 10)

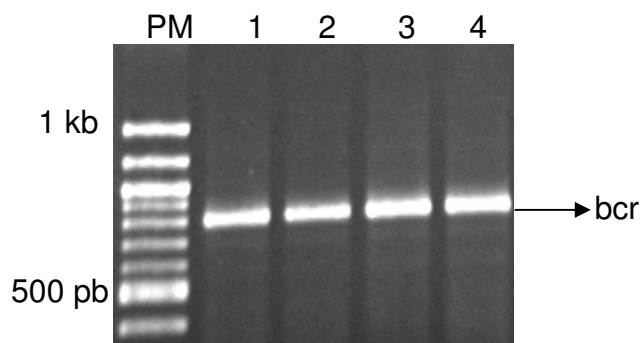


Figura 10. Expresión del gen *bcr* mediante RT-PCR. Carril 1,2,3,4: gen *bcr* (808 pb). PM: marcador de peso molecular. Condiciones de corrida como se describen en la figura 1.

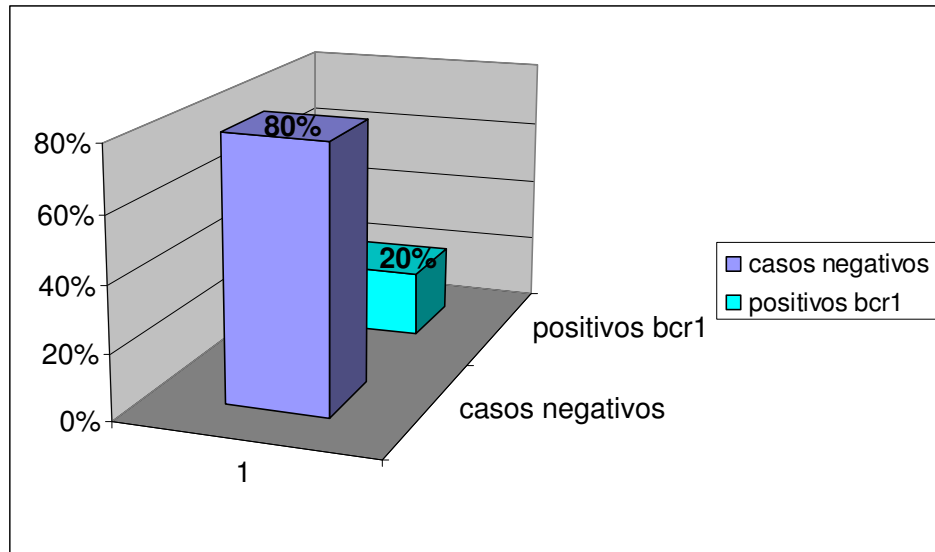


Figura 11. Distribución de casos negativos y positivos del transcrito bcr1 de los pacientes con leucemia Promielocítica aguda por PCR anidado.

IX. DISCUSIÓN:

La leucemia promielocítica aguda (LPA) es un proceso mieloproliferativo caracterizado por la translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17, que involucra la fusión del transcrito PML-RAR α . El tratamiento con Ac. Retinóico (AR) causa la desaparición de promielocitos leucémicos induciendo la diferenciación terminal hasta el neutrófilo, el cual presenta una vida media de 8 h y al concluir este tiempo, la célula muere por el mecanismo natural de muerte celular programada.

Es de suma importancia que la LPA sea diagnosticada rápidamente morfológicamente y, en forma ineludible, por métodos de biología molecular que tengan la capacidad de identificar el rearrreglo PML-RAR α , porque se corre un grave riesgo sino se administra el tratamiento adecuado con AR. Antes de la aparición del agente inductor de diferenciación celular, el AR, los pacientes con LPA sufrían en forma frecuente de coagulación intravascular diseminada (CID) por la liberación de los gránulos de los promielocitos al ser destruídos por la quimioterapia o por la gran cantidad de promielocitos que infiltraban médula ósea o sangre periférica. ^{(20) (21) (22)}

La importancia de realizar la determinación del rearrreglo PML-RAR α por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa) es que es muy útil en el diagnóstico y en la detección de la enfermedad mínima residual durante el tratamiento y seguimiento en los pacientes con LPA. La CID ocupa un

lugar central en los trastornos de la hemostasia en esta enfermedad, tiene una repercusión importante sobre el desarrollo clínico de LPA y puede lograr su rápida eliminación con el tratamiento con ATRA en la mayoría de los pacientes.

La combinación de citogenética y estudios moleculares demuestran que la t(15;17) esta presente en el 90 a 95% de los casos con APL. ⁽²³⁾ El rompimiento en el intrón 2 es el sitio común en el cromosoma 17, mientras que en el gen PML del cromosoma 15 tres regiones diferentes de rompimiento han sido descritas. Esto causa la generación de tres transcritos diferentes PML-RAR α , dependiendo del sitio de rompimiento en el gen PML, (1) si afecta al intrón 6 (bcr1; tipo largo) en 90-95% de los casos, (2) exón 6 (bcr2; tipo variante) y (3) intrón 3 (bcr3; tipo corto) en 5 al 10% de los casos. ^{(24) (25)}

Hay informes que sugieren que los pacientes que expresan la isoforma corta tienen una incidencia aumentada de recaída clínica y una supervivencia más corta comparada con pacientes con la isoforma larga. ^{(26) (27)}

Gameiro y col, encontraron en sus pacientes con ciclos de consolidación entre 1° y el 4° así como otros recibiendo tratamiento de mantenimiento, que la forma bcr1 (isoforma larga) fue detectada en el 75% de los pacientes mientras que la forma bcr3 (isoforma corta) fue detectada en el 25% de los pacientes. Así nosotros encontramos que el 20% (6 casos) de nuestros pacientes, donde la mayoría se encontraban recibiendo tratamiento entre el 4° y 8° ciclo de mantenimiento y un caso con mas de dos años de remisión, presentaron la isoforma bcr1 (isoforma larga), lo cual puede ser un probable indicador de

recaída molecular que pudiera desencadenar la recaída clínica en los próximos meses si no se realiza una intervención terapéutica. También, no se puede descartar que la clona leucémica esté inhibida a esos niveles de expresión, pero por la alta sensibilidad del RT-PCR anidado siga detectando su presencia. ⁽²⁸⁾ Para discernir este problema será necesario cuantificar con RT-PCR tiempo-real el nivel de expresión y vigilar si van aumentando o disminuyendo con relación al tiempo de tratamiento. Estas sugerencias surgen porque la mayoría de nuestros pacientes se encontraban en alguno de los 8 ciclos de mantenimiento, es decir, con al menos un año de tratamiento con ATRA y quimioterapia.

Mientras tanto, el 80% (24 casos) de nuestros pacientes que se encontraban casi al final los ciclos de mantenimiento con ATRA y un caso con tratamiento concluido y en observación, resultaron negativos al rearreglo PML-RAR α , lo cual muestra la alta tasa de respuesta en los pacientes que expresan el rearreglo y son tratados con ATRA y que los pacientes han respondido favorablemente. Esto indica que dichos pacientes presentarán mayor supervivencia libre de enfermedad, pues de acuerdo al informe de Willson y col (1993) encontraron que la persistencia de transcritos PML-RAR α se asoció con la recaída y su ausencia se correlacionó con mayor supervivencia. ⁽²⁹⁾

X. CONCLUSIONES:

1. La alta tasa de casos negativos (80%) indican que el esquema de tratamiento para nuestros pacientes fue adecuado.
2. Los pacientes que expresaron el rearrreglo PML/RAR α fueron de la isoforma bcr1, lo cual indica que probablemente dicha isoforma es más resistente al tratamiento que las isoformas bcr2 y bcr3.
3. Cuando se estudian pacientes con leucemia tratados, es necesario ajustar las condiciones del RT-PCR porque el nivel de expresión de los rearrreglos moleculares es muy bajo. Las condiciones optimas fueron 2 μ g de hexámeros y 2 μ g de RNA.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Ruiz-Argüelles, Guillermo J. Fundamentos de hematología. 2nda Edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 1998; 17-21.
2. J.Sans-Sabrafen et-al. Hematología Clínica. 3era Edición. Editorial Mosby/Doyma Libros. México D.F. 1994; 303-310.
3. Williams. Hematology. 6th Edition. Ed. Mc Graw Hill. U.S.A. 2001; 1053, 1054.
4. Woessner S, Lafuente R, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 3ra Edición Barcelona; Medici, 1991; 204-218.
5. Butturini A, Gale RP. Causes of leukemia. En: Keating A, Armitage J, Burnett A, Newland A. Eds. Haematological Oncology, vol 2. Cambridge: Cambridge University Press, 1992; 103-117.
6. Sandler DP. Epidemiology of acute myelogenous leukemia. Semin Oncol, 1987; 14: 359-364.
7. Henderson ES, Afshani E. Clinical manifestations and diagnosis. En: Henderson Es, Lister TA, Eds Leucemia. Filadelfia: WB Sauderns, 1190; 291-359.
8. GreerJP, Kinney MC. Acute nonlympocytic leucemia. En: Lee GR, Sitchell TC, Foster J, Athens JW, Lukens JN, Eds. Wintrobe's Clinical Hematology. Filadelfia. Lea and Febiger, 1993; 1920-1945.
9. Whittaker JA. Acute myeloid leukaemia: clinical features and management. En: Whittaker JA, Ed. Leukaemia. Londres: Blackwell, 1992; 357-393.

10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et-al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol*, 1991; 78: 325-329.
11. Meeting Report. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC. Cooperative Study Group. *Br J Haematol*, 1988; 68: 487-494.
12. Catovsky D, Matutes E. The Classification of acute leukaemia. *Leukemia*, 1992; 6 suppl 2: 1-6.
13. Woessner S, Solé F. Algunas consideraciones sobre la clasificación MIC. *Sangre (Barc)*, 1990; 35: 1-3.
14. Mitelman F, Heim S. *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*. 3rd Edition. New York, NY, Liss, 1988; 263-281.
15. Frankel SR. Acute promyelocytic leukemia. New insights into diagnosis and therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1993; 7 (1):109-138.
16. Pandolfi PP, Alcalay M, et-al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR α isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*, 1992; 1:1397.
17. Koeffler HP. Syndromes of acute nonlymphocytic leukemia. *Ann Intern Med*, 1987; 107: 748-758.
18. Odom LF, Lampkin BC, Tannous R, Buckley JD, Hammond GD. Acute monoblastic leukemia: a unique subtype. A review from the Children's Cancer Study Group. *Leuk Res* 1990; 14: 1-10.

19. Olopade OI, Thanagvelu M, Larson RA et al. Clinical, morphologic and cytogenetic characteristics of 26 patients with acute erythroblastic leukemia. *Blood*, 1992; 80: 2.873-2.882.
20. Gralnick HR, Sultan C. Acute promyelocytic leukaemia: Haemorrhagic manifestation and morphologic criteria. *Br J Haematol*, 1975; 29: 373.
21. Rodeghiero F, Avvisati G, Castaman G, Barburi T, Mandelli F. Early deaths and anti-hemorrhagic treatments in acute promyelocytic leukemia: A GIMEMA retrospective study in 268 consecutive patients. *Blood*, 1990; 75: 2112.
22. Tallman MS, Kwaan HC: Reassessing the hemostatic disorder associated with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1992; 79: 543.
23. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, Mencarelli, Grignani F, Peschle C, Nicoletti I, Pelicci PG. The acute promyelocytic leukemia specific PML/RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell*, 1993; 74: 423.
24. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, et-al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor a fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*, 1992; 82: 492-497.
25. Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli m, et-al. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR α isoforms in acute promyelocytic leukemia. *EMBO J*, 1992; 11: 397-407.
26. Huang W, Sun G-L, Li Z-S, et al. Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR α isoforms and detection of minimal residual

disease by retrotranscriptase/polymerase chain reaction to predict relapse. *Blood*,1993; 82: 1264-1269.

27. Vahdat L, Maslak P, Miller WH Jr, et al. Early mortality and retinoic acid syndrome in acute promyelocytic leukemia: impact of leukocytosis, low dose chemotherapy, PML/RAR-a isoform, and CD13 expression in patients treated with all- trans retinoid acid. *Blood*, 1994;84:3843-3849.
28. Chen S-J, Chen Z, Chen A, Tong J-H, Dong S, Wang Z-Y, Waxman S, Zelent A. Occurrence of distinct PML-RARa isoforms in patients with acute promyelocytic leukemia detected by reverse transcriptase/polymerase chain reaction. *Oncogene*, 1992; 7: 1223.
29. Wilson H. Miller Jr, Kristi Levine, Anthony DeBlasio, Stanley R. Frankel, Ethan Dmitrovsky, and Raymond P. Warrell Jr. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia by a Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the PML/RAR-a Fusion mRNA. *Blood*,1993; 82:1689-1694.