



Programa de
**MAESTRÍA y
DOCTORADO**^{en}
Ciencias Médicas
Odontológicas
y de la Salud

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

Asociación de Loci Genéticos con el Riesgo de
Leucemia Linfocítica Crónica en Mexicanos Mestizos

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ÁLVARO HERNÁNDEZ CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM SALVADOR MAJLUF CRUZ
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
Médicas, Odontológicas y de la Salud

Facultad de Medicina



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D. F.

SEPTIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

4 
Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Coordinador en Investigación en Salud
Instituto Mexicano del Seguro Social


Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz.
Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis
Hospital General Regional 1 "Carlos MacGregor Sánchez Navarro"
Instituto Mexicano del Seguro Social


Álvaro Hernández Caballero
Médico de Base
Hospital General Regional 1 "Carlos MacGregor Sánchez Navarro"
Instituto Mexicano del Seguro Social

A mi familia.

Dra. Tusié, por abrir la puerta la primera vez.

Samuel, por tu apoyo siempre incondicional.

Abraham, por creer en este proyecto y ayudar a hacerlo posible.

AGRADECIMIENTOS

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina.

Instituto Mexicano del Seguro Social, Coordinación de Investigación en Salud,

Fondo de Investigación en Salud proyecto FIS/IMSS/PROT/ G13/1219.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, beca de Maestría.

Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores.

Dr. Samuel Canizales Quinteros. Unidad de Biología Molecular de Enfermedades Cardiovasculares. Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Dr. Jorge Cruz Rico. Departamento de Hematología. UMAE Especialidades del Centro Médico La Raza. Instituto Mexicano de Seguro Social.

Dra. Elena Tuna Aguilar. Departamento de Hematología y Oncología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dra. Martha Patricia Oropeza Martínez. Departamento de Hematología. HGZ. No 8. Instituto Mexicano de Seguro Social.

Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes. Laboratorio de Hematología Especial del Centro Médico La Raza. Instituto Mexicano de Seguro Social.

Dr. Jesús Hernández Juárez, MC. Hugo Villamil Ramírez, MC. Paola León Mimila, Dra. Blanca E. López Contreras por su asistencia en el laboratorio.

Alejandro Hernández, Leticia Sánchez Arriaga y Teresa Mendoza Ruiz por su asistencia en el muestreo de los controles.

Sinodales:

Dra. Petra Yescas Gómez

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz

Dra. Marta Margarita Zapata Tarres

Dr. Adolfo Martínez Tovar

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
JUSTIFICACIÓN	22
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
ASPECTOS ÉTICOS	41
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	69

RESUMEN

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una neoplasia linfoproliferativa cuya presentación es más frecuente en hombres a partir de los sesenta años. Su prevalencia es distinta en el mundo, siendo la forma más frecuente de leucemia del adulto en países caucásicos e infrecuente en Asia y Latinoamérica. En México, se han reportado pocos pacientes y existe información limitada sobre su evolución clínica. La etiología de la LLC es multifactorial, pero los factores genéticos son muy relevantes. Un estudio en población caucásica encontró seis loci de susceptibilidad para la LLC y tres de ellos han sido replicados en población china. No se han identificado estudios de este tipo en Latinoamérica.

En este estudio se incluyeron a 117 pacientes con LLC mestizos mexicanos y 117 controles emparejados por edad y sexo. Se realizó extracción de DNA y PCR tiempo real para la genotipificación de 6 polimorfismos. Además se recolectó información demográfica y clínica de los pacientes con LLC. Los resultados se analizaron con estadística descriptiva y se buscó la asociación entre la LLC y los seis polimorfismos a través de regresión logística.

Los genotipos de rs872071 y rs17483466 estuvieron asociados al diagnóstico de LLC. Las frecuencias alélicas tuvieron diferencias significativas con las poblaciones china y caucásica. La suma de alelos de los polimorfismos mostró un riesgo incremental para la LLC. Los pacientes con LLC se diagnosticaron en fases avanzadas de la enfermedad, tuvieron una evaluación pronóstica incompleta y recibieron en su mayoría clorambucil como tratamiento. Las respuestas terapéuticas fueron similares a las reportadas previamente.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la leucemia linfocítica crónica.

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por la acumulación de linfocitos monoclonales maduros en la sangre, la médula ósea y los tejidos linfoides. La mediana de la edad de presentación en los pacientes es de 67 años y es más frecuente en hombres que en mujeres.¹

El curso clínico de la LLC es variable. Más del 25% de los pacientes carecen de síntomas al diagnóstico y pueden ser identificados por la realización de una citometría hemática de rutina, el resto pueden tener síntomas que van desde la astenia y pérdida de peso, hasta infecciones recurrentes, hemorragias y/o síndrome anémico en los casos más avanzados. A la exploración física inicial, el 80% de los pacientes presentan crecimientos ganglionares de distinta magnitud y aproximadamente la mitad de ellos tiene esplenomegalia.¹

De acuerdo al Grupo de Trabajo Internacional para la LLC, el diagnóstico de esta leucemia requiere de demostrar una linfocitosis monoclonal $>5,000/\mu\text{l}$.² Por inmunofenotipo, las células de la LLC presentan un patrón de marcadores CD5+, CD10-, CD19+, CD20+ (expresión baja), CD23+, CD103-, tienen niveles bajos de inmunoglobulina de superficie y una expresión baja o ausente de CD22 y CD79b. Morfológicamente, las células leucémicas semejan a los linfocitos normales pero pueden presentar algunos cambios discretos con respecto a éstos. Además de la linfocitosis, los pacientes pueden presentar anemia y/o trombocitopenia, ya sea por la infiltración leucémica de la médula ósea o por fenómenos autoinmunes.³

Las células de LLC pueden presentar alteraciones citogenéticas al diagnóstico o durante la evolución de la enfermedad. Estas alteraciones se pueden identificar a través de la realización de un cariotipo en sangre periférica. La delección del brazo largo del cromosoma 13 es la anomalía más común, seguida de la trisomía del cromosoma 12 y deleciones en los cromosomas 11, 6 y 17. Las alteraciones citogenéticas en el cariotipo tienen un valor pronóstico, siendo especialmente relevantes las del cromosoma 17 por asociarse a menor sobrevida.⁴

Otros factores de pronóstico adversos son la expresión de las proteínas ZAP-70 y CD38, las cuales son medidas por citometría de flujo en las células de LLC. La proteína ZAP-70 (*Z Associated Protein-70*) pesa 70-KDa y es una cinasa de tirosina citosólica que de forma normal se expresa en células asesinas naturales y células T. Las células de la LLC sin mutación en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas expresan la proteína ZAP-70 y esto se ha asociado a un pronóstico desfavorable.¹ La proteína CD38 es una ADP-ribosil ciclasa que actúa como ectoenzima y se expresa ampliamente en distintas células y tejidos, especialmente en los leucocitos. También funciona en la adhesión celular, la transducción de señales y la señalización del calcio.⁵ Las proteínas ZAP-70 y CD38 suelen presentarse en pacientes con una enfermedad agresiva y se asocian con menores tasas de sobrevida global.⁶

Para establecer el pronóstico de los pacientes con LLC las escalas más usadas son las propuestas por Rai⁷ y por Binet⁸ y se muestran en la Tabla 1.

Debido a que la tasa de progresión de la LLC es lenta y a que existe una baja tolerancia al tratamiento citotóxico, el inicio de la terapia se reserva para los pacientes que se

encuentran en las fases avanzadas de la enfermedad, en pacientes muy sintomáticos o en caso de transformación a enfermedades más agresivas como leucemia prolinfocítica o linfoma no Hodgkin.²

Tabla 1. Clasificaciones pronósticas de LLC según Rai⁷ y Binet⁸

Nivel de Riesgo	Estadio	Características	Mediana de Sobrevida
CLASIFICACIÓN DE RAI			
Bajo	0	Linfocitosis	> 13 años
Intermedio	I	Linfocitosis y adenomegalias	8 años
	II	Linfocitosis, esplenomegalia o hepatomegalia	5 años
Alto	III	Linfocitosis, anemia (Hb < 11g/dL)	2 años
	IV	Linfocitosis, trombocitopenia (<100 x 10 ⁹ /L)	1 año
CLASIFICACIÓN DE BINET			
Bajo	A	Sin anemia o trombocitopenia <3 áreas nodales afectadas	12 años
Intermedio	B	Sin anemia o trombocitopenia 3 o más áreas nodales afectadas	5 años
Alto	C	Anemia (Hb ≤ 10g/dL) y/o Trombocitopenia (≤ 100 x 10 ⁹ /l)	2 años

Las guías terapéuticas actuales para la LLC recomiendan iniciar tratamiento en pacientes con enfermedad activa o sintomática o con estadios avanzados de Rai y Binet. Para los pacientes con buen estado físico, la quimio-inmunoterapia con fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) representa el estándar de tratamiento. Para los pacientes con mal estado funcional, el tratamiento con clorambucil y rituximab es la opción más común. Los pacientes jóvenes con alto riesgo citogenético deben ser considerados para un trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.⁹

En los últimos años, la introducción de fármacos activos contra la LLC ha mejorado las tasas de respuesta y la supervivencia, que actualmente es entre 5 y 10 años. Sin embargo, a pesar del tratamiento, los pacientes con LLC tienen una menor esperanza de vida comparados con la población general.¹⁰

Epidemiología de la LLC.

La LLC se caracteriza por tener una prevalencia distinta en diferentes poblaciones.^{11,12} Mientras que en los países europeos, incluyendo España, la LLC es el tipo de leucemia más frecuente en adultos con una prevalencia del 30-40%,¹³ en países de África y Asia Occidental se observa una prevalencia menor,^{14,15} mientras que en el Este de Asia^{16,17} y América Latina¹⁸⁻²⁵ se ha reportado la prevalencia más baja de esta enfermedad (Figura 1).

En los datos aportados por el SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*) de Estados Unidos de 2006 a 2010 se describe que el 90% de los casos de LLC se diagnostican después de los 45 años de edad. La tasa de incidencia de LLC para los hombres fue de 6.3 por 100,000 habitantes para los blancos, 4.2 para los negros, 2.6 para los hispanos, 2.2 para los nativos de Alaska y 1.4 para los asiáticos.²⁶ Esta información está en relación con los datos epidemiológicos reportados en habitantes nativos de estos grupos étnicos. La incidencia anual de la LLC en Corea corresponde al 1.5% de la observada en Estados Unidos.²⁷

En México se ha señalado que la frecuencia de la LLC es 6 veces menor a la de las poblaciones caucásicas.²⁷ En 1982, el Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) publicó una serie de casos abarcando los registros clínicos de 35 años e identificó 49 pacientes con el diagnóstico de LLC²⁸ y una actualización reciente en un lapso de 10 años (2000 a 2010) identificó a 52 pacientes con esta enfermedad.²⁹ En 1996

un estudio multicéntrico mexicano reportó las características de 1,968 pacientes con leucemia y la LLC representó el 6.6% de los casos.³⁰ En 1999, el Dr. Ruíz Argüelles reportó 19 pacientes con LLC en un seguimiento de 15 años de una clínica privada en Puebla, resaltando que 8 de los casos tenían fenotipo caucásico y 4 eran extranjeros (63% del total).³¹ Por otro lado, un reporte de incidencia de neoplasias hematológicas en Veracruz, reportó a la LLC como el tipo de leucemia menos frecuente con una tasa de 0.19 por cada 100,000 habitantes.³² En 2002, el Dr. Renán Góngora, en Yucatán, también reportó a la LLC dentro de las neoplasias menos frecuentes, sin especificar datos de incidencia o prevalencia.³³

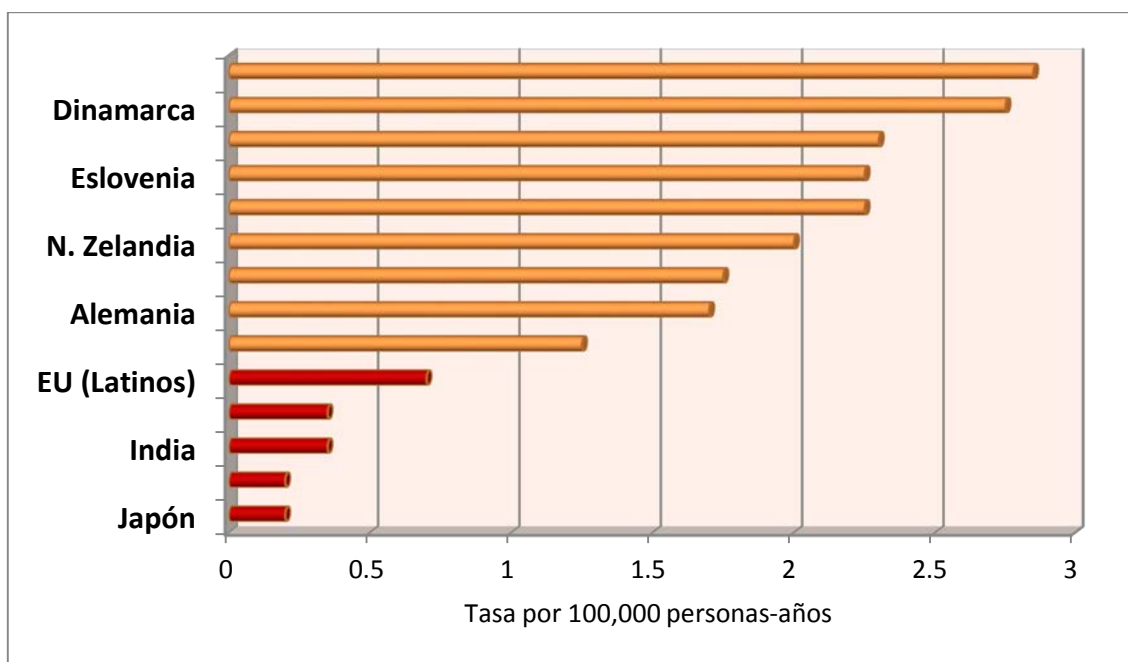


Figura 1. Incidencia de LLC reportada en diversas regiones del mundo.¹²

Debido a la variabilidad en la esperanza de vida y a que las etapas iniciales de la LLC pueden ser poco sintomáticas, las diferencias epidemiológicas entre los países podrían deberse a un sub-diagnóstico a través de los programas de detección oportuna de enfermedades. Sin embargo, estudios en población asiática y latinoamericana residente en Estados Unidos coinciden en reportar una menor frecuencia de LLC en estas poblaciones, comparada con la de pacientes negros o blancos americanos nativos de este país.^{16,18,23}

Genómica de la LLC.

La LLC es una enfermedad compleja en la que intervienen factores genéticos y ambientales. Dentro de los factores ambientales se han encontrado la exposición a benceno, pesticidas y radiaciones ionizantes.³⁴⁻³⁶

Parte de la evidencia de la participación de factores genéticos en el origen de esta patología la constituyen las diferencias epidemiológicas de la LLC según el grupo étnico y la presencia de predisposición familiar.³⁷⁻³⁹ Además, varios estudios de escrutinio amplio del genoma y de asociación, han identificado polimorfismos asociados a la LLC en poblaciones caucásicas.^{17,40-47,37,48}

En un escrutinio amplio del genoma para esta enfermedad, publicado en 2008 por Di Bernardo y cols., se genotipificaron 299,983 SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido por su siglas en Inglés) por medio de un microarreglo en 1,529 casos y 3,115 controles. Este estudio identificó seis loci de susceptibilidad asociados a la LLC en pacientes del Reino Unido.⁴⁰ Posteriormente, el mismo grupo de investigación corroboró estos hallazgos en pacientes de Suecia y España.⁴⁹

Lan y cols. buscaron replicar esta asociación en sujetos chinos residentes de Hong Kong

estudiando 71 enfermos de LLC y 1,273 controles no emparejados de un banco de sangre.¹⁷ Este estudio encontró asociación en tres de las seis regiones descritas por Di Bernardo, pero las frecuencias alélicas de los polimorfismos fueron diferentes a las reportadas en caucásicos (Tabla 2).

En 2012, el mismo grupo de Di Bernardo, realizó un meta-análisis que incluyó 3 estudios de este tipo. Encontraron la asociación entre la LLC y un locus localizado en 6p21.33, en un marcador intrónico al gen *BAK1*, el cuál es un antagonista de la molécula anti-apoptótica Bcl2.⁵⁰

Tabla 2. Loci de susceptibilidad para LLC en caucásicos y asiáticos.^{17,40}

SNP	Cr	Alelo mayor	Alelo menor de riesgo	Frecuencia alélica de riesgo en caucásicos	Frecuencia alélica de riesgo en asiáticos	Asociación en asiáticos	Genes cercanos	Función de Genes
rs872071	6	A	G	0.54	0.57	Sí	<i>IRF4</i>	Proliferación de linfocitos.
rs11083846	19	G	A	0.22	0.0054	No	<i>PRKD2</i> <i>STRN4</i>	Células B tumorales
rs7176508	15	G	A	0.37	0.51	No	-	
rs13397985	2	T	G	0.19	0.015	Sí	<i>SPI40</i> / <i>SPI10</i>	Expresión génica en células B
rs735665	11	G	A	0.21	0.025	No	<i>GRAMD1B</i>	Expresión en tejido linfoide
rs17483466	2	A	G	0.2	0.065	Sí	<i>ACOXL</i> <i>BCL2L11</i>	Control de supervivencia de linfocitos

Cr, cromosoma. pb, pares de bases.

De forma interesante, se ha encontrado que los SNPs asociados a la LLC están relacionados a la expresión de genes supresores de tumores como SP140 o a vías de señalización involucradas en la apoptosis y sobrevivencia de células leucémicas⁵¹ y que la genotipificación

de polimorfismos pueden constituir factores pronósticos para sobrevida libre de progresión y resistencia a tratamiento.^{52,53}

Tras realizar una búsqueda en las bases de datos PUBMED,⁵⁴ ARTEMISA,⁵⁵ SciELO⁵⁶ y *Clinical Trials*,⁵⁷ no fue posible encontrar estudios de polimorfismos asociados a la predisposición de padecer LLC en pacientes mestizos mexicanos o residentes de Latinoamérica.

Loci de susceptibilidad para LLC reportados en caucásicos y asiáticos.

rs872071 (411064A>G)

Corresponde a la transición de adenina (alelo mayor) por guanina en la posición 283,699 del cromosoma 6 humano (HuRef).⁵⁸ Se ubica cercano al UTR 3' del gen del factor regulador 4 del interferón (*IRF4*), anteriormente conocido como oncogén del mieloma múltiple 1 (*MUM1*). La proteína IRF4 es un regulador clave del desarrollo y proliferación de los linfocitos y ha sido ligado al desarrollo de LLC y mieloma múltiple, siendo ambos síndromes proliferativos de células B. A través de la interacción con factores de transcripción como PU.1, el IRF4 controla la terminación de la señalización del receptor de células pre-B y promueve la diferenciación de las células pro-B a células B pequeñas.⁵⁹ Además, el IRF4 controla la transformación de células B de memoria a células plasmáticas a través de BLIMP1 y BCL-6, teniendo en cuenta que se ha propuesto que las células B de memoria es el precursor de las células de LLC.⁵⁹⁻⁶¹ En el estudio de Di Bernardo y cols.,⁴⁰ el SNP rs872071 presentó asociación con la LLC con un OR de 1.54 (IC 95% 1.41–1.69; P= 1.91x10⁻²⁰). Los autores estudiaron si la asociación podría estar mediada por una expresión diferencial del IRF4 a través de linfocitos transformados, encontrando que la expresión del RNAm de *IRF4*

estaba asociada significativamente al genotipo de rs872071 en una forma dosis dependiente ($p=0.042$) con una expresión más baja asociada al alelo de riesgo (G). En el estudio de Lan y cols.¹⁷ este polimorfismo estuvo asociado a la LLC con un OR de 1.78 (IC 95% 1.25-2.53 $P=0.0013$) con una tasa del alelo menor comparada con caucásicos de 0.57.

rs11083846 (47207654G>A)

Corresponde a la transición de guanina (alelo mayor) por adenina en la posición 43,632,788 del cromosoma 19 humano (HuRef).⁵⁸ Se localiza en el intrón 3 del gen de la proteína cinasa D2 (PRKD2) y cercano a una región de 144 kilobases de desequilibrio de ligamiento que también involucra a la proteína 4 de unión a estriatina calmodulina (STRN4) y a la proteína relacionada a fukutina (FKRP). Una de las características reportadas de las células B tumorales es la disminución en la expresión y auto-fosforilación de PRKD2, esta proteína se ha encontrado expresada en linfomas de las células del manto, linfomas Burkitt y aproximadamente en el 50% de las células de LLC.⁶²

En el estudio de Di Bernardo y cols.,⁴⁰ el SNP rs11083846 estuvo asociado con la LLC con un OR de 1.35 (IC 95% 1.22-1.49; $P=3.96 \times 10^{-9}$), sin embargo, no fue posible asociarlo a la expresión de PRKD2 en linfocitos. En el estudio de Lan y cols.,¹⁷ este SNP no tuvo asociación con la LLC, con una tasa del alelo menor comparada con caucásicos de 0.0054.

rs7176508 (70018990A>G)

Corresponde a la transición de guanina (alelo mayor) por adenina en la posición 46,851,846 del cromosoma 15 humano (HuRef).⁵⁸ Este polimorfismo se encuentre en la banda 15q23 que está desprovista de genes, transcritos codificantes o microRNA's.⁴⁰ En el estudio de Di Bernardo y cols.⁴⁰ el SNP rs7176508 estuvo asociado a la LLC con un OR de 1.37 (IC 95%

1.31-1.61; $P=3.78 \times 10^{-12}$) y en la verificación por casos y controles publicada por este mismo grupo se confirmó esta asociación.⁴⁹ Otro estudio que analizó este polimorfismo en linfocitosis B monoclonal no identificó una asociación significativa, encontrando que el poder estadístico del estudio para este polimorfismo fue muy bajo.³⁷ En el estudio de Lan y cols. este polimorfismo no tuvo asociación significativa ya que el OR fue de 1.04 (IC 95% 0.68-1.61; $p=0.84$), con una tasa del alelo menor comparada con caucásicos de 0.51.

rs13397985 (231091223T>G)

Corresponde a la transversión de timina (alelo mayor) por guanina en la posición 222,931,270 del cromosoma 2 humano (HuRef).⁵⁸ Este polimorfismo se encuentra en el intrón 1 del gen *SP140*, el cual codifica para un homólogo de la proteína SP100, cuya expresión está restringida a los linfocitos, involucrando todas las células B maduras, líneas celulares de células plasmáticas y en algunas células T. La proteína SP140 contiene un motivo de dedos de zinc y un bromodominio, lo que sugiere está involucrado en la regulación de la expresión génica mediada por cromatina.⁶³ El SP100 es un mediador importante de la proteína líder nuclear del virus de Epstein Barr, cuya activación es importante para que se establezca una infección latente y para la inmortalización de células B mediadas por este virus.⁶⁴ También se ha propuesto como un potente supresor de tumores.⁶⁵ En el estudio de Di Bernardo y cols. este polimorfismo estuvo asociado a la LLC con un OR de 1.41 (IC 95% 1.26-1.57; $P=5.4 \times 10^{-10}$) y fue posible demostrar una relación dependiente de dosis entre el genotipo de rs13397985 y la expresión de SP140 en linfocitos, con una menor expresión en el alelo de riesgo.⁴⁰ En el estudio de Lan y cols., este SNP estuvo

asociado a la LLC con un OR de 10.26 (IC 95% 2.4-43.9; p=0.0017) y la tasa del alelo menor comparada con caucásicos fue de 0.015.

rs735665 (123361397G>A)

Corresponde a la transición de guanina (alelo mayor) por alanina en la posición 119,303,013 del cromosoma 11 humano (HuRef).⁵⁸ El único gen que se encuentra en la región cercana a este polimorfismo codifica para la proteína GRAMD1B, que se localiza aproximadamente a 50 kb hacia el telómero. A pesar de que GRAMD1B se expresa en el tejido linfoide, hasta el momento no se ha implicado de forma directa con el desarrollo o la proliferación de las células B. Sin embargo, el SNP rs735665 ha sido asociado en varios estudios a la LLC y la Linfocitosis B Monoclonal,^{40,47,49} además de que se ha reportado en un escaneo amplio del genoma para linfoma folicular.⁶⁶ En el estudio de Di Bernardo y cols.,⁴⁰ este polimorfismo estuvo asociado a la LLC con un OR de 1.45 (IC 95% 1.31-1.61; P=3.78x10⁻¹²); mientras en el estudio de Lan y cols.¹⁷ no tuvo asociación significativa con un OR de 3.16 (IC 95% 0.65-15.28; p=0.15). La tasa del alelo menor comparada con caucásicos fue de 0.025.

rs17483466 (111797458A>G)

Corresponde a la transición de alanina (alelo mayor) por guanina en la posición 104,676,613 del cromosoma 2 humano (HuRef).⁵⁸ Este polimorfismo se encuentra en el intrón 10 del gen que codifica para la proteína similar a acil-coenzima A oxidasa (*ACOXL*) que no se expresa en linfocitos. En esta misma región (84 kb hacia el centrómero) se localiza la proteína de interacción con bcl-2 (*BCL2L11* o *BIM*), esta proteína funciona en conjunto con IL-7 para el control de la supervivencia de los precursores de células B.⁶⁷ Estudios específicos no ha podido ligar la expresión de *BCL2L11* con el genotipo de rs17483466, sugiriendo un efecto

a distancia o la asociación con algún otro marcador. En el estudio de Di Bernardo y cols.,⁴⁰ este polimorfismo estuvo asociado a la LLC con un OR de 1.39 (IC 95% 1.25-1.53; P=2.36x10⁻¹⁰) y en el estudio de Lan y cols.¹⁷ presentó un OR de 2.75 (IC 95% 1.01-7.53; p=0.049), teniendo una tasa del alelo menor comparada con caucásicos de 0.065.

Polimorfismos de nucleótido único y su genotipificación.

Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*) son secuencias de ADN en las que, individuos diferentes, pueden poseer dos o más bases distintas y se encuentran en <1% de la población. Algunos SNPs se localizan en las regiones codificantes del DNA, pudiendo alterar la estructura o función de las proteínas. Sin embargo, la mayoría se encuentra en regiones no codificantes y son marcadores útiles en la genética de poblaciones. Desde hace varios años existe mucho interés en el estudio de estos polimorfismos por su uso como marcadores para identificar regiones que predispongan al padecimiento de enfermedades multifactoriales.

A la fecha se han desarrollado múltiples técnicas para la genotipificación de los SNPs basadas en la hibridación con sondas específicas de alelo, la unión a oligonucleótidos, la extensión de un cebador de un nucleótido o en la escisión enzimática.⁶⁸

El ensayo TaqMan[®] (Figura 2) se basa en el principio de transferencia de energía. El fundamento de la técnica reside en la detección de fluorescencia como resultado del cambio en la distancia física entre el fluoróforo reportero y la molécula apagadora de la sonda al momento de hibridar con la secuencia blanco y llevarse a cabo la reacción en cadena de la polimerasa de DNA. El uso de dos sondas con fluoróforos diferentes permite determinar ambos alelos en la misma reacción, incrementando la eficiencia del ensayo. En

el ensayo que se muestra en la figura 2 uno de los alelos (alelo 1) está marcado con el fluoróforo VIC y el otro alelo (alelo 2) con el fluoróforo FAM. Un incremento sustancial de VIC determina la homocigocidad del alelo 1, un incremento sustancial de FAM determina la homocigocidad del alelo 2 y la detección de las dos señales fluorescentes determina la heterocigocidad. Debido a que no requiere un procesamiento posterior a la reacción, este ensayo es fácil de realizar y como se diseñan sondas específicas para cada SNP, tiene eficiencia cuando se requiere analizar un número limitado de SNP's en un número grande de individuos.^{68,69}

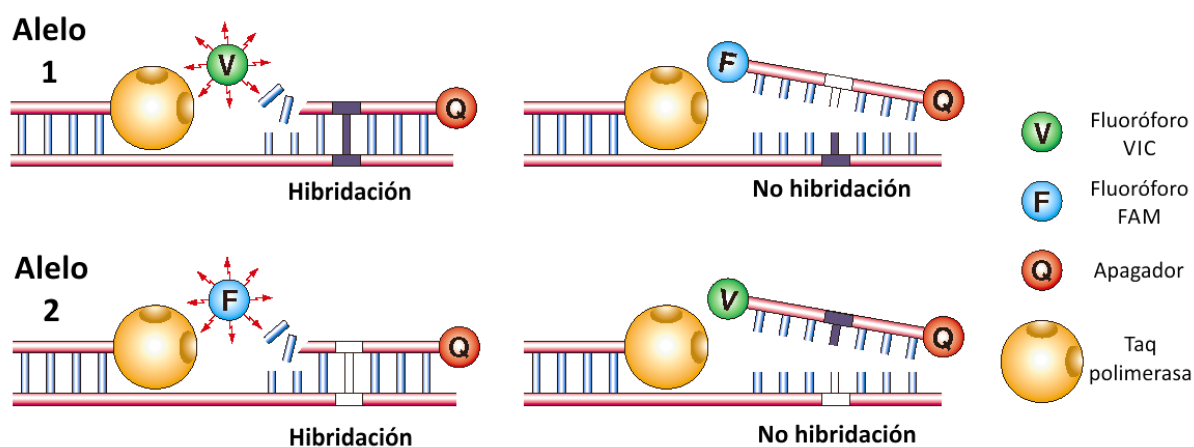


Figura 2. Esquema general del ensayo TaqMan®. (Modificado de Allelic Discrimination Assay Getting Started Guide for the 7900HT Fast System. Applied Biosystems)

Mestizaje en México e influencia asiática.

Los mestizos representan >90% de la población en México y se definen como individuos nacidos en este país y con antecedentes familiares de ascendientes mexicanos, al menos en tres generaciones. Los mestizos mexicanos son el resultado de una mezcla genética

compleja entre españoles, amerindios y africanos que inició hace cerca de 500 años.⁷⁰ La proporción de ancestría europea en los mestizos mexicanos oscila entre 0.6 y 0.3, siendo homogénea entre los grupos poblacionales del centro y las regiones costeras del país.⁷¹ Diversos estudios con marcadores genómicos han identificado que existe un gradiente de mestizaje, con mayor proporción de ancestría europea hacia el noroeste del país y mayor representación de genética amerindia hacia el sureste.^{70,72}

Varios marcadores genómicos de población nativa americana (amerindia) han mostrado similitud con lo observado en poblaciones del continente asiático, específicamente de Siberia. Se piensa que esto puede deberse a que los nativos americanos provienen de tribus nómadas que migraron desde Asia a América a través del estrecho de Bering durante el último periodo glacial.^{73,74} De acuerdo a esta información, varios autores han reportado que la población mexicana tiene concordancia con lo publicado en asiáticos en fenómenos biológicos diversos como trombofilia,⁷⁵⁻⁷⁷ leucemia aguda promielocítica,⁷⁸ fisiología de las lipoproteínas,⁷⁹ inmunología celular,⁸⁰ metabolismo del óxido nítrico,⁸¹ genética de las cadenas de la hemoglobina,⁸² entre otros.

El mestizaje y la estructura genética de las poblaciones pueden ejercer un efecto de confusión en los análisis genómicos de las enfermedades. Específicamente, en los estudios de asociación caso-control, las diferencias en las frecuencias de una variante genómica entre las poblaciones pueden condicionar falsos positivos o falsos negativos debido a una estratificación en la muestra o al comparar dos poblaciones con mestizaje diferente.⁸³

Una forma de evaluar la estratificación de la población es mediante el equilibrio de *Hardy-Weinberg*. Este principio establece que la composición genética de una población

permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación.⁸⁴

JUSTIFICACIÓN

La LLC es una neoplasia linfoproliferativa que se presenta con mayor frecuencia alrededor de la séptima década de la vida.¹ Su incidencia y prevalencia son variables dependiendo de la población donde se estudie, siendo el tipo de leucemia más frecuente en los adultos europeos¹² y una enfermedad infrecuente en población asiática¹⁷ o latinoamericana.³⁰

Los reportes sobre LLC en México son limitados, por lo que existe poca información sobre el origen étnico de los pacientes con LLC y las características clínicas de estos pacientes.

Diferentes estudios han aportado evidencias de una fuerte contribución de factores genéticos en el origen de esta enfermedad⁴⁰ y actualmente es una línea de investigación en desarrollo.

Los mestizos en México tienen entre el 30 al 60% de información europea en su genoma;⁷⁰ sin embargo, la LLC tiene una incidencia baja en nuestra población, similar a la reportada en población asiática y africana.⁸⁵ Este fenómeno se puede deber a una menor presencia de genes de riesgo en nuestra población por un predominio de la genética local.

Se ha reportado la asociación de seis SNP's a la LLC en pacientes caucásicos y tres de ellos fueron replicados en población asiática, observando además, que las frecuencias alélicas son diferentes entre estas poblaciones.^{17,40}

Se ha encontrado que SNP's asociados a la LLC están relacionados a la expresión de genes supresores de tumores o a vías de señalización involucradas en la apoptosis y sobrevida de células leucémicas⁵¹ y que la genotipificación de polimorfismos pueden constituir factores pronósticos para sobrevida libre de progresión y resistencia a tratamiento.^{52,53}

Estudiar si los marcadores genómicos asociados a la LLC en población caucásica o asiática

están presentes en población mestiza mexicana es relevante para intentar explicar las diferencias epidemiológicas en la enfermedad. Además, esta información puede originar líneas de investigación para buscar las causas de posibles diferencias en los pacientes mexicanos, al comprarlos con poblaciones caucásicas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Debido a que los datos epidemiológicos sugieren que la frecuencia de LLC en México tiene mayor similitud a la reportada en población asiática y considerando la asociación entre polimorfismos y la LLC en esta población¹⁷ consideramos la siguiente pregunta de investigación:

En una muestra de mestizos mexicanos:

¿Cuál es la magnitud de la asociación entre el genotipo de los polimorfismos rs872071, rs13397985, rs17483466, rs11083846, rs7176508 y rs735665 con el diagnóstico de LLC, al comparar con sujetos sin LLC emparejados por edad y sexo?

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los datos publicados para población asiática:¹⁷

En una muestra de mestizos mexicanos:

Se encontrará asociación entre los genotipos de los polimorfismos rs872071 (OR 1.78), rs13397985 (OR=10.26) y rs17483466 (OR=2.75) con el diagnóstico de LLC, al comparar con sujetos sin LLC emparejados por edad y sexo.

Debido a que en el estudio de Lan y cols.¹⁷ los intervalos de confianza al 95% de los OR para los polimorfismos rs11083846, rs7176508 y rs735665 cruzaron la unidad y no se obtuvo significación estadística, intencionadamente no se formuló hipótesis específica para estas asociaciones.

OBJETIVOS

Objetivo primario.

En una muestra de mestizos mexicanos:

Establecer la asociación entre los genotipos de los polimorfismos rs872071, rs13397985, rs17483466, rs11083846, rs7176508 y rs735665 con el diagnóstico de LLC, al comparar con sujetos sin LLC emparejados por edad y sexo.

Objetivos secundarios.

1. En una muestra de mestizos mexicanos con el diagnóstico de LLC, describir las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs872071, rs13397985, rs17483466, rs11083846, rs7176508 y rs735665 y compararlas con las de pacientes caucásicos y chinos.
2. En una muestra de mestizos mexicanos sin el diagnóstico de LLC, describir las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs872071, rs13397985, rs17483466, rs11083846, rs7176508 y rs735665 y compararlas con las de controles caucásicos y chinos.
3. Describir el desempeño de los genotipos de los polimorfismos rs872071, rs13397985, rs17483466, rs11083846, rs7176508 y rs735665 para predecir el diagnóstico de LLC por medio de una curva ROC.
4. En una muestra de pacientes mestizos mexicanos con LLC, describir la edad de diagnóstico, el estadio clínico por Rai y Binet, la presencia de ZAP-70 y CD-38 al diagnóstico, la presencia de deleciones en el cariotipo y el tratamiento utilizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

Por el número de observaciones: Transversal

Por el tipo de intervención: Observacional

Por direccionalidad: Retrospectivo

Por la comparación: Comparativo

Tipo de diseño: Casos y controles

ESPECIFICACIÓN DE LAS VARIABLES

Variables descriptoras

- **Sexo**

a) *Definición conceptual*: Condición orgánica, masculina o femenina⁸⁶.

b) *Definición operacional*: Se registró el sexo declarado por el sujeto en el momento de la inclusión.

c) *Tipo de variable*: Cualitativa

d) *Escala de medición*: Dicotómica

e) *Unidad de medición*: Masculino – Femenino.

- **Edad**

a) *Definición conceptual*: Tiempo que ha vivido una persona.⁸⁶

b) *Definición operacional*: Se registró la edad en años cumplidos declarada por el sujeto al momento de la inclusión.

c) *Tipo de variable*: Cuantitativa

d) *Escala de medición*: Continua

e) *Unidad de medición:* Años.

- **Estadio clínico al diagnóstico por Rai**

a) *Definición conceptual:* Clasificación pronóstica de la LLC descrita por Rai.⁷

b) *Definición operacional:* Estadio clínico reportado en el expediente al momento del diagnóstico.

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Ordinal

e) *Unidad de medida:* 0, I, II, III, IV / Sin reporte en el expediente.

- **Estadio clínico al diagnóstico por Binet**

a) *Definición conceptual:* Clasificación pronóstica de la LLC descrita por Binet.⁸

b) *Definición operacional:* Estadio clínico reportado en el expediente al momento del diagnóstico.

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Ordinal

e) *Unidad de medida:* A, B, C / Sin reporte en el expediente.

- **ZAP-70**

a) *Definición conceptual:* La proteína ZAP-70 (Z Associated Protein-70) tiene 70-KDa y es una cinasa de tirosina citosólica que de forma normal se expresa en células asesinas naturales y células T. Las células de LLC con ausencia de mutación en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas expresan ZAP-70 y se asocia a un pronóstico desfavorable.¹

b) *Definición operacional:* Presencia de la proteína ZAP-70 en las células al diagnóstico

según el reporte de inmunofenotipo obtenido del expediente. Se consideró positivo > 20%.⁸⁷

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Dicotómica

e) *Unidad de medida:* Positivo / Negativo / Sin reporte en el expediente.

- **CD-38**

a) *Definición conceptual:* ADP-ribosil ciclasa. Ectoenzima que se expresa ampliamente en células y tejidos, especialmente en los leucocitos. También funciona en la adhesión celular, la transducción de señales y el señalamiento del calcio ⁵. Se considera un marcador de mal pronóstico en la LLC.²

b) *Definición operacional:* Presencia de la proteína CD38 en las células al diagnóstico según el reporte de inmunofenotipo obtenido del expediente. Se consideró positivo > 20%.⁸⁷

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Dicotómica

e) *Unidad de medida:* Positivo / Negativo / Sin reporte en el expediente.

- **Deleción en cromosomas 11, 13 ó 17.**

a) *Definición conceptual:* Mutación genética que consiste en la pérdida de uno o más nucleótidos de la secuencia del DNA.⁸⁶

b) *Definición operacional:* Identificación de una deleción en uno o más de los siguientes cromosomas: 11, 13, 17 según el reporte de cariotipo que se encuentre en el expediente del paciente.¹ No fue uno de los objetivos del protocolo realizar el

cariotipo a partir de las muestras de los pacientes, sólo se registró el resultado del reporte en caso de existir en el expediente.

- c) *Tipo de variable:* Cualitativa
- d) *Escala de medición:* Politómica
- e) *Unidad de medida:* Deleción del cromosoma 11 / Deleción del cromosoma 13 / Deleción del cromosoma 17 / Negativo / Sin reporte en el expediente.

Variable independiente

- **Leucemia linfocítica crónica.**

- a) *Definición conceptual:* síndrome linfoproliferativo crónico que se caracteriza por la acumulación de linfocitos monoclonales de aspecto maduro en la sangre y/o órganos linfáticos.²
- b) *Definición operacional:* conteo de linfocitos mayor a 5,000 por microlitro de sangre total en la citometría hemática y diagnóstico de LLC en el reporte de inmunofenotipo obtenido del expediente del paciente.²
- c) *Tipo de variable:* cualitativa
- d) *Escala de medición:* dicotómica
- e) *Unidad de medida:* Sí, No.

Variables dependientes

- **Genotipo del SNP rs872071**

- a) *Definición conceptual:* Secuencia de DNA localizada en la posición 283,699 del cromosoma 6 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser adenina o guanina.⁵⁸
- b) *Definición operacional:* Genotipo del SNP rs872071 obtenido mediante la técnica de

PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.

- c) *Tipo de variable*: Cualitativa.
- d) *Escala de medición*: Politómica.
- e) *Unidad de medida*: Homocigoto alanina, homocigoto guanina, heterocigoto.

- **Genotipo del SNP rs11083846**

- a) *Definición conceptual*: Secuencia de DNA localizada en la posición 43,632,788 del cromosoma 19 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser adenina o guanina.⁵⁸
- b) *Definición operacional*: Genotipo del SNP rs11083846 obtenido mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.
- c) *Tipo de variable*: Cualitativa
- d) *Escala de medición*: Politómica.
- e) *Unidad de medida*: Homocigoto alanina, homocigoto guanina, heterocigoto.

- **Genotipo del SNP rs7176508**

- a) *Definición conceptual*: Secuencia de DNA localizada en la posición 46,851,846 del cromosoma 15 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser adenina o guanina.⁵⁸
- b) *Definición operacional*: Genotipo del SNP rs7176508 obtenido mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.
- c) *Tipo de variable*: Cualitativa
- d) *Escala de medición*: Politómica.
- e) *Unidad de medida*: Homocigoto alanina, homocigoto guanina, heterocigoto.

- **Genotipo del SNP rs13397985**

- a) *Definición conceptual*: Secuencia de DNA localizada en la posición 222,931,270 del

cromosoma 2 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser guanina o timina.⁵⁸

b) *Definición operacional:* Genotipo del SNP rs13397985 obtenido mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Politómica.

e) *Unidad de medida:* Homocigoto guanina, homocigoto timina, heterocigoto.

- **Genotipo del SNP rs735665**

a) *Definición conceptual:* Secuencia de DNA localizada en la posición 119,303,013 del cromosoma 11 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser adenina o guanina.⁵⁸

b) *Definición operacional:* Genotipo del SNP rs735665 obtenido mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Politómica.

e) *Unidad de medida:* Homocigoto alanina, homocigoto guanina, heterocigoto.

- **Genotipo del SNP rs17483466**

a) *Definición conceptual:* Secuencia de DNA localizada en la posición 104,676,613 del cromosoma 2 humano (HuRef), cuyo genotipo puede ser adenina o guanina.⁵⁸

b) *Definición operacional:* Genotipo del SNP rs17483466 obtenido mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas *TaqMan* en un aparato *Roche LightCycler 480*.

c) *Tipo de variable:* Cualitativa

d) *Escala de medición:* Politómica.

e) *Unidad de medida:* AA, AG, GG.

- **Diseño muestral**

- *Tamaño de la Muestra:* Se calculó el tamaño de muestra mediante el programa de la Universidad de Harvard *Genetic Power Calculator*,⁸⁸ utilizando un error tipo I de 0.05 y un poder de 0.8. Para el cálculo se utilizaron las frecuencias alélicas reportadas en población mexico-americana⁵⁸ y el OR reportado en población china¹⁷ para el SNP rs872071, por contar con frecuencias alélicas de homocigotos para el alelo menor y el menor OR con IC que no cruza la unidad. Se obtuvo un cálculo de 117 pacientes. Se incluyó al mismo número de controles.
- *Muestreo:* Se realizó un muestreo no probabilístico consecutivo para los casos y por conveniencia en los controles.
- *Evaluación del muestreo:* Se realizó mediante el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba chi cuadrada,⁸⁸ considerando estratificación en el genotipo de los loci con una desviación del EHW con $p > 10^{-3}$.

- **Criterios de inclusión**

- *Casos:* Obtenidos de los siguientes hospitales: UMAE Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret" del Centro Médico La Raza, Hospital General Regional # 8 "Dr. Gilberto Flores Izquierdo", Hospital General Regional #1 "Carlos MacGregor Sánchez Navarro" e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Debieron cumplir con los siguientes:
 1. Mexicanos mestizos, definidos por haber nacido en México, hablar el idioma español y contar con antecedentes familiares de ascendientes

mestizos mexicanos, al menos en tres generaciones.⁷⁰

2. Con diagnóstico LLC según los criterios del Grupo de Trabajo Internacional de la Leucemia Linfocítica Crónica.²
 3. Que hubieran aceptado participar en el estudio mediante la firma de consentimiento informado.
- *Controles:* Se invitó a participar a personas afiliadas al Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores que acudan a los "Clubes INAPAM" del Distrito Federal. Los "Clubes INAPAM" son espacios comunitarios gratuitos donde asisten personas mayores de 55 años para el desarrollo de actividades de tipo deportivo, educativo, cultural, social y de entretenimiento. Los controles no provinieron de residencias o asilos del INAPAM para esta investigación. Debieron cumplir con los siguientes criterios:
 1. Mexicanos mestizos, definidos por haber nacido en México, hablar el idioma español y contar con antecedentes familiares de ascendientes mestizos mexicanos, al menos en tres generaciones.⁷⁰
 2. Valores de linfocitos dentro del rango de referencia normales en una citometría hemática.
 3. Sujetos que hubieran asistido a consulta médica por alguna razón en el último año.
 4. Que estuvieran emparejados por género y edad (en lapsos de 5 años) con alguno de los casos de LLC, tomando en cuenta la edad al momento de la inclusión.

- **Criterios de exclusión.**

- *Casos y controles.*

1. Antecedentes familiares de LLC.
2. Revocación del consentimiento informado.
3. Muestra insuficiente para la genotipificación.
4. Datos insuficientes o inadecuados para el análisis.
5. Ya que algunos de los SNP's en estudio se habían asociado a linfoma y/o melanoma⁸⁹ no se incluyeron a sujetos que declararon el antecedente de síndrome linfoproliferativo o melanoma al momento del interrogatorio.
6. Debido a que existen algunos reportes de caso que habían asociado el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico al de LLC^{90,91} no se incluyeron a sujetos que declararon el antecedente de padecer enfermedades reumatológicas al momento del interrogatorio.

- **Mediciones.**

- *Características clínicas y biológicas de los casos:* Posterior a la consulta de seguimiento de cada paciente, el investigador principal en privado les invitó a participar mediante la carta de consentimiento informado. Si aceptaron participar en el estudio, fueron entrevistados, se obtuvieron los datos del expediente clínico y las muestras de sangre. En la base de datos se incluyeron:

1. Nombre
2. Fecha de muestreo

3. Fecha de nacimiento
 4. Lugar de nacimiento del sujeto
 5. Lugar de nacimiento de ascendientes (tres generaciones previas)
 6. Sexo
 7. Fecha de diagnóstico
 8. Estadio clínico al diagnóstico
 9. Presencia de ZAP-70 y CD38 en el inmunofenotipo al diagnóstico
 10. Presencia de deleciones en el cariotipo al diagnóstico
 11. Tratamiento utilizado en cada una de las líneas y tipo de respuesta
 12. Datos de contacto (teléfono)
- *Características clínicas y biológicas de los controles:* Los investigadores acudieron a los "Clubes INAPAM" para invitar a sus miembros a participar en la investigación. A los sujetos interesados se les incluyó en una lista con sexo y edad. En caso de ser seleccionados como control de algún caso, se solicitó el consentimiento informado. Una vez aceptado, se les tomaron los datos completos y la muestra de sangre para el análisis. Se obtuvieron los siguientes datos:
1. Nombre
 2. Sexo
 3. Fecha de nacimiento
 4. Fecha de muestreo
 5. Lugar de nacimiento del sujeto

6. Lugar de nacimiento de ascendientes (tres generaciones previas)
 7. Antecedentes personales patológicos
 8. Tiempo desde la última consulta médica.
 9. Datos de contacto (teléfono)
- *Toma de muestra, transporte y almacenamiento.* Posterior a la firma de consentimiento informado, se obtuvo una muestra de 20 mililitros de sangre venosa periférica mediante el sistema Vacutainer (BD Diagnostics, NJ, USA) en tubos cubiertos con 7.2 mg de K₂EDTA. Las muestras se mantuvieron en hielo por un tiempo no mayor a 3 horas hasta su transporte al laboratorio. Las muestras para genotipificación se centrifugaron a 3,500 rpm por 7 minutos, se desechó el sobrenadante, se obtuvo la capa de leucocitos y plaquetas (*buffy coat*) y se almacenó a -70°C hasta su análisis.
 - *Citometría Hemática.* Las muestras para citometría hemática se analizaron en un equipo Advia 120 (Siemens, NY, USA) para obtener la cuenta de linfocitos. El estudio de citometría hemática se realizó en la UMAE Especialidades del CMR.
 - *Extracción de DNA:* Se realizó la extracción de DNA mediante columnas con el kit comercial *Qiagen QIAamp Blood Mini DNA Kit* de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen, USA). El DNA extraído fue cuantificado mediante espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se verificó la pureza mediante el cociente de absorbancia a 260 y 280 nm, buscando una relación A_{260}/A_{280} de 1.7 a 1.9.

- *Genotipificación:* Para cada SNP se realizó PCR en tiempo real en un aparato *Roche LightCycler 480* (Roche Diagnostics) mediante el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, se agregaron de 10 a 20 ng de DNA purificado, 2.5 microlitros de *LightCycler Probes Master* y 0.25 microlitros de *SNP Genotyping Assay* en una placa para reacción. Se introdujo al termociclador y se programaron 45 ciclos de PCR con una etapa de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, una etapa de alineamiento a 60°C por 1 minuto y una etapa de extensión a 72°C por 1 segundo. Después de la amplificación, se realizó un análisis de discriminación alélica usando el software *LightCycler 480 Software release 1.5.1.62* para detectar la fluorescencia emitida y con ello asignar los alelos de cada muestra. En casos donde la genotipificación no fue adecuada se repitió el análisis. Para el control de calidad, incluyeron controles negativos sin DNA. Los ensayos de Biología Molecular se realizaron en el INMEGEN.

- **Análisis estadístico.**

- *Análisis descriptivo:* Se reportaron medidas de tendencia central y dispersión de los datos. Se evaluaron diferencias significativas usando estadística paramétrica o no paramétrica según la distribución. Se calcularon las frecuencias alélicas de los SNP's en los casos y controles.
- *Análisis inferencial:* La asociación entre el genotipo de los SNP's y el riesgo de padecer LLC se midió mediante el cálculo de razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95%.
- Se realizó una prueba de tendencia de Cochran-Armitage asumiendo un modelo aditivo de acuerdo al número de alelos de riesgo, contando como dos a los homocigotos para el alelo raro, uno a los heterocigotos y cero a los homocigotos para el alelo común.

- Para evaluar la contribución de las variantes asociadas para predecir el diagnóstico de LLC, se construyó una curva ROC (Receiver Operating Characteristic), obteniendo el área bajo la curva y valor de P.
- Se consideraron diferencias con significancia estadística con un valor de $p < 0.05$.
Los análisis estadísticos se llevaron al cabo con el programa SPSS versión 21.0 (SPSS Statistical Package, Chicago, IL) y STATA versión 12.

ACTIVIDADES DE LOS PARTICIPANTES

- Dr. Abraham Majluf Cruz
 - Asesoría en la elaboración del protocolo de investigación y cartas de consentimiento informado.
 - Obtención y administración de recursos para la investigación.
 - Asesoría en el análisis de estadística descriptiva.
 - Asesoría en la redacción del informe final y el artículo para publicación.
 - Responsable del almacenamiento del material biológico y datos después de la investigación.
- Álvaro Hernández Caballero
 - Elaboración de Protocolo de Investigación y cartas de consentimiento informado.
 - Solicitud de aprobación de la Comisión Nacional de Investigación y Comité de Ética del IMSS y presentación de los informes de seguimiento.
 - Solicitud de aprobación por el Comité de Ética del INCMNSZ.

- Solicitud del financiamiento al Fondo de Investigación en Salud del IMSS y presentación de los informes de seguimiento.
- Gestión de los recursos financieros y obtención de los insumos con proveedores.
- Gestión de la participación de los servicios de Hematología de los hospitales participantes.
- Gestión de la colaboración del INAPAM a través de la Delegación del Distrito Federal.
- Obtención de consentimiento informado, llenado de base de datos y toma de muestras de sujetos caso y control.
- Transporte y almacenamiento de muestras.
- Procesamiento de biometrías hemáticas.
- Extracción de DNA y genotipificación de SNP's.
- Análisis de los datos.
- Elaboración de informe final, tesis y artículos para su publicación.
- Dr. Samuel Canizales Quinteros.
 - Asesoría en la elaboración del protocolo de investigación.
 - Asesoría en la extracción de DNA y genotipificación de los SNP's.
 - Asesoría en el análisis estadístico.
 - Asesoría en la redacción del informe final y el artículo para publicación.
- Dr. Jorge Cruz Rico.
 - Informar al investigador principal sobre la asistencia de pacientes con el

diagnóstico de LLC en la consulta para que sean invitados a participar en el estudio.

- Revisión crítica de los artículos para su publicación.
- Dra. Elena Tuna Aguilar.
 - Informar al investigador principal sobre la asistencia de pacientes con el diagnóstico de LLC en la consulta para que sean invitados a participar en el estudio.
 - Revisión crítica de los artículos para su publicación.
- Dra. Martha Patricia Oropeza Martínez.
 - Informar al investigador principal sobre la asistencia de pacientes con el diagnóstico de LLC en la consulta para que sean invitados a participar en el estudio.
 - Revisión crítica de los artículos para su publicación.

ASPECTOS ÉTICOS

- El presente protocolo fue aprobado por la CNIC del IMSS con número de registro R-2012-785-086 y por la Comisión de Ética en Investigación del INCMNSZ con número de registro 730.
- Esta investigación se condujo de acuerdo a los principios éticos de la Declaración de Helsinki y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud vigente.
- De acuerdo al artículo 17 de dicho Reglamento, esta fue una investigación de

riesgo mínimo por considerar la extracción de sangre periférica.

- La presente investigación involucró a grupos vulnerables como enfermos de leucemia linfocítica crónica y adultos mayores, por lo que se tomaron precauciones especiales para su protección.
- Para cumplir el principio de justicia, el muestreo de los casos fue de forma consecutiva, sin ningún tipo de discriminación en los procedimientos. El ingreso de los controles estuvo controlado por el emparejamiento necesario por el diseño del estudio.
- El investigador principal invitó a los sujetos que cumplían los criterios de selección solicitando el consentimiento informado de forma individual, en un cubículo privado y sin estar presentes el médico tratante (en los casos) o el personal del INAPAM (en los controles) para evitar que existiera alguna coerción o influencia indebida. En el caso del INAPAM, la participación en esta investigación no causó ninguna distinción o prerrogativa para los participantes o por el contrario, alguna sanción a los que no desearon participar. Ninguno de los investigadores estuvieron relacionados con la atención médica de los participantes.
- Los datos derivados de la presente investigación no tienen un beneficio potencial directo en el diagnóstico o el tratamiento de los pacientes con LLC, ni para los sujetos controles.
- A los sujetos que participaron como controles se les entregó una copia de los resultados de la citometría hemática. En casos donde se identificaron

desviaciones de los valores de referencia, se entregó una carta donde se especificaron las alteraciones y se invitó a acudir a consulta con su médico.

- La información derivada de la investigación se concentró en una base de datos electrónica codificada a través de un número de registro y protegida por contraseña. Sólo los investigadores tuvieron acceso a la base de datos de los pacientes y los controles.
- Debido a que en la literatura no se ha demostrado que el genotipo de los polimorfismos en estudio tengan un valor diagnóstico o pronóstico, no se brindó la información genética de manera individual a los participantes, sólo se les informó el resultado global de la investigación, en caso de solicitarlo.
- A los participantes se les solicitó guardar muestras de material genético por 10 años. Este banco de muestras quedó bajo resguardo del Dr. Abraham Majluf Cruz en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del H.G.R.1. Las muestras se conservan en ultracongelación a -70°C en una red fría. Los tubos guardados están etiquetados con el código de cada participante, no se adjuntó ninguna información personal a las muestras en resguardo. Se solicitará aprobación del Comité de Investigación y Ética correspondiente antes de utilizar el material guardado para investigaciones futuras. En caso de colaboraciones con otros grupos de investigación, no se otorgarán los datos personales de identificación de los participantes junto con las muestras.

RESULTADOS

Se invitó a participar a 142 pacientes con LLC, de los cuales 117 cumplieron con el criterio de inclusión de no tener ascendientes extranjeros en ninguna de las 3 generaciones previas. Veinticinco pacientes presentaron algún ascendiente extranjero (17.6%) y 8 pacientes reportaron tener ascendientes extranjeros por ambas ramas.

El lugar de nacimiento de los casos y controles se muestra en la Figura 3 y el lugar de nacimiento de los ascendientes de las tres generaciones previas de los casos y controles se representa en la Figura 4. El lugar de nacimiento de los 25 pacientes que declararon contar con algún ascendiente extranjero y no fueron incluidos en el estudio por esta razón, se muestra en la Figura 5.

De los 117 pacientes incluidos, el 49% correspondió al sexo masculino, la mediana de la edad al momento de la inclusión fue de 70.6 años (40-93.8 años). Al diagnóstico el 31% de los pacientes fueron clasificados por Rai como riesgo bajo, un 45% como riesgo intermedio y un 24% como riesgo alto. Utilizando el sistema de estadificación de Binet, el 66% tuvieron un riesgo bajo, el 14% un riesgo intermedio y el 20% un riesgo alto. La mediana de la cuenta de linfocitos al diagnóstico fue de 24,000 por microlitro (rango intercuartílico de 14000, 39800).

Con respecto a los factores pronósticos de los pacientes, en veinticuatro expedientes se encontró el reporte de la expresión de CD38 al diagnóstico, de los cuales cinco fueron positivos. De 23 reportes disponibles, tres tuvieron positividad en la expresión de ZAP-70 al diagnóstico. Únicamente un paciente tuvo la expresión combinada de ZAP-70 y CD38 al diagnóstico. En sólo dos de los expedientes se contó con evaluación citogenética al

diagnóstico, siendo en ambos casos un cariotipo normal.

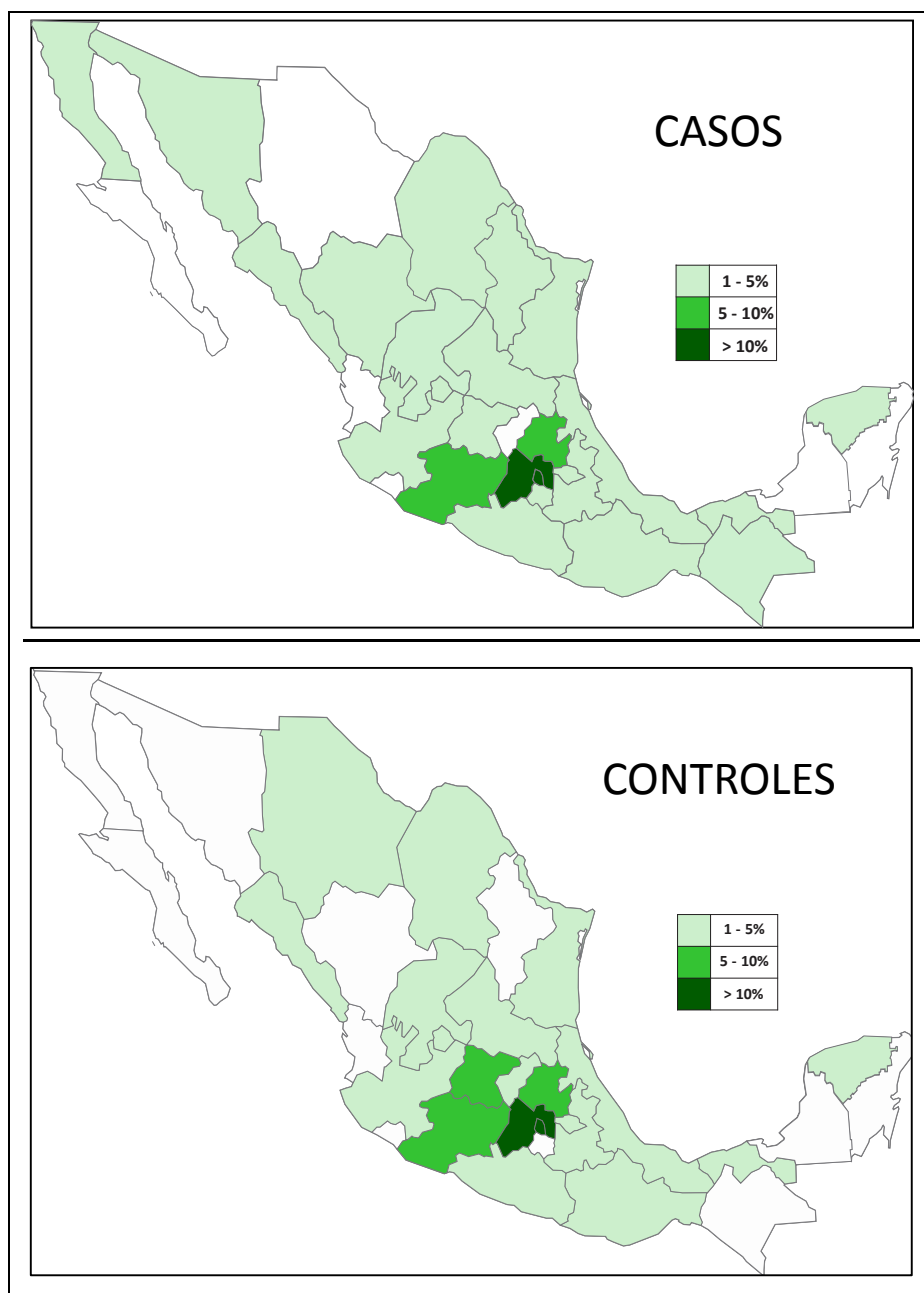


Figura 3. Lugar de nacimiento de casos y controles incluidos.

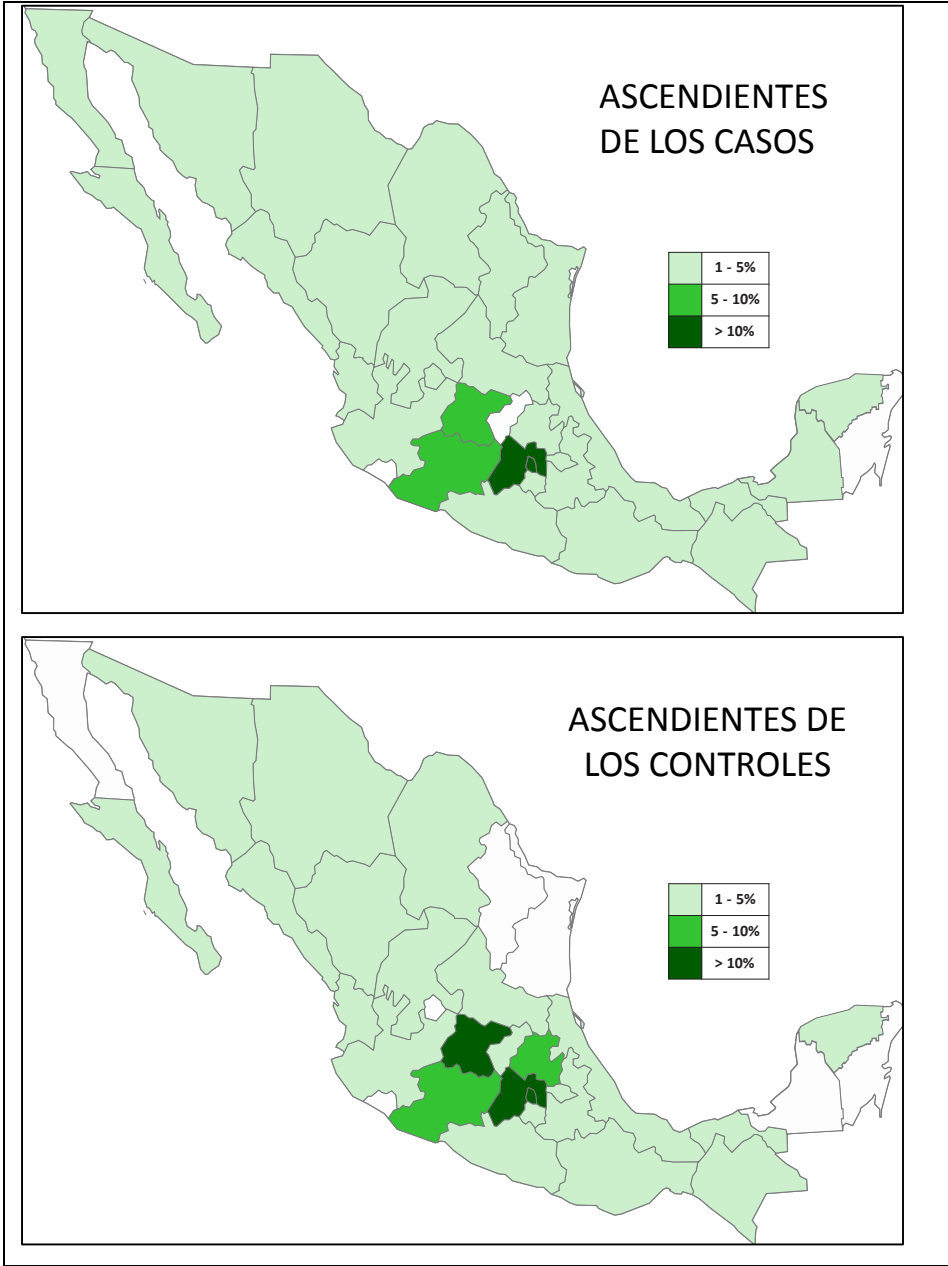


Figura 4. Lugar de nacimiento de los ascendientes de casos y controles

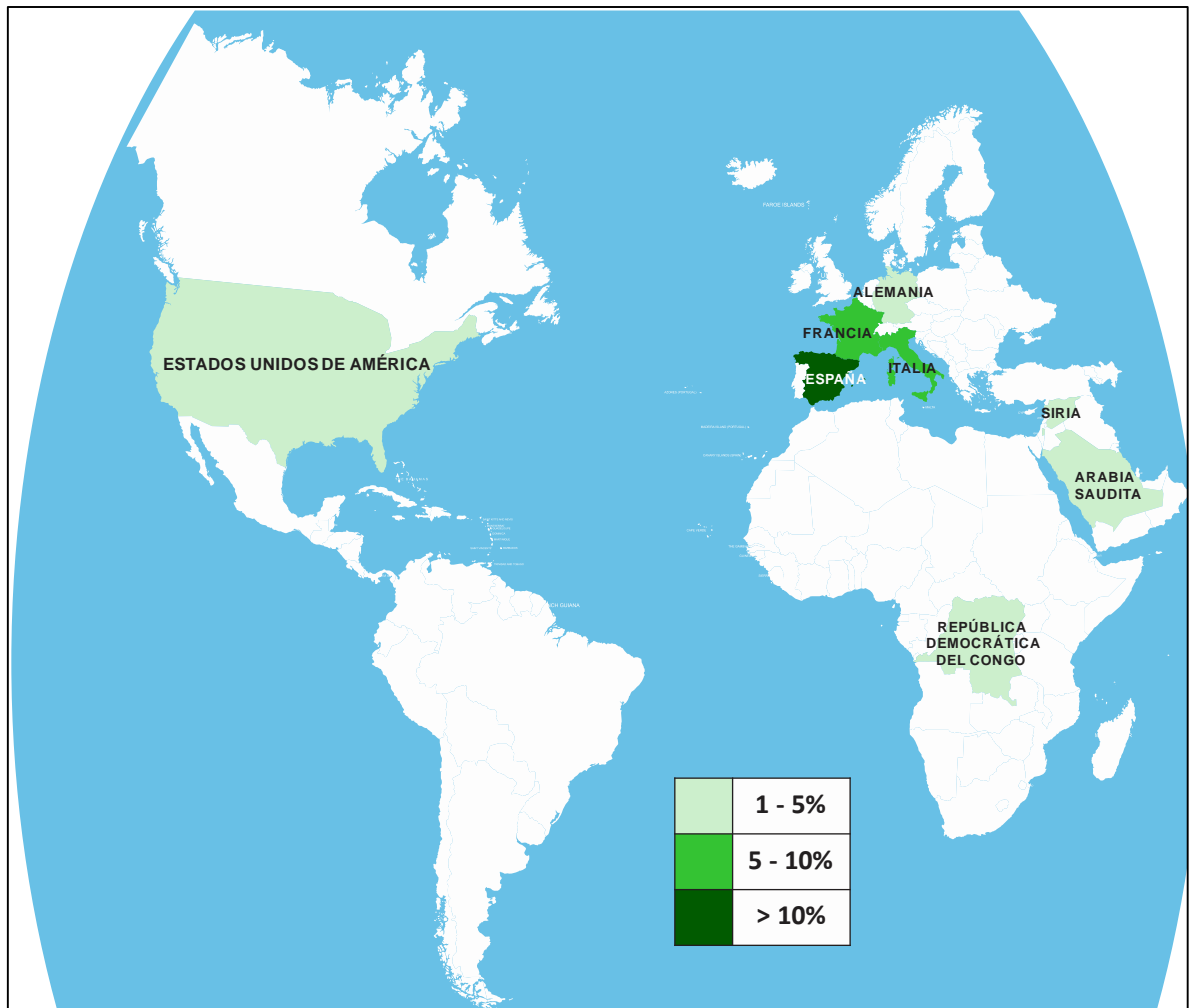


Figura 5. Lugar de nacimiento de pacientes con ascendencia extranjera

Los esquemas de tratamiento que recibieron los pacientes en cada una de las líneas terapéuticas empleadas se resumen en la Tabla 3 y los porcentajes de respuesta alcanzados al término se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Tratamientos utilizados en los pacientes con LLC

Tratamientos	% de pacientes	# Mediana de ciclos (RI)
Primera línea (N=92)		
CLB	59.8	5 (3, 8)
CLB/PDN	9.8	4 (3, 6)
CHOP	8.7	6 (3, 6)
FCR	8.7	6 (6, 6)
FR	4.4	3.5 (3.25, 3.75)
Fludarabina	3.2	6 (5.5, 7)
FC	3.2	6 (5.5, 6.25)
CHOP-R	2.2	5.5 (5.25, 5.75)
Segunda línea (N=37)		
CLB	70	4.5 (3, 6)
Fludarabina	11	4 (3.5, 5)
CHOP	8	1 (1, 1)
FC	5.5	2.5 (1.75, 3.25)
FCR	5.5	5 (4.5, 5.5)
Tercera línea (N=15)		
CLB	67	5 (4.25, 6.75)
FCR	33	6 (5, 6.5)
Cuarta línea (N=10)		
CLB	20	4.5 (3.75, 5.25)

CHOP	20	4.5 (3.75, 5.25)
Fludarabina	20	8 (7, 9)
FC	20	5 (4.5, 5.5)
FCR	20	4 (2.5, 5.5)

RI = rango intercuartílico; CLB = clorambucil; PDN = prednisona; CHOP = ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona; FCR = fludarabina, ciclofosfamida y rituximab; FR = fludarabina y rituximab; FR = fludarabina y rituximab.

El 26.2% de los pacientes no requirió tratamiento al momento del diagnóstico y se mantuvo en vigilancia. La mayoría de los pacientes (60%) que recibieron tratamiento de primera línea fueron tratados con clorambucil (CLB). La mediana de la edad al diagnóstico de este grupo de pacientes fue de 67.4 años (rango de 38.2-92.7), el 59% de estos pacientes con respuestas evaluables alcanzó remisión completa (RC) y dieciséis pacientes remisión parcial (RP). En ninguno de los expedientes analizados se encontró que los pacientes fueran referidos a programas de trasplante hematopoyético.

Tabla 4. Tasas de respuesta después de las líneas de tratamiento

	RC (%)	RP (%)	NE (%)
Primera línea	54	24	20
Segunda línea	46	23	21
Tercera línea	34	19	23
Cuarta línea	15	20	20

RC = remisión completa, RP = remisión parcial, NE = no evaluable

Tras realizar la genotipificación de los seis polimorfismos en los casos y los controles las frecuencias alélicas de todos los polimorfismos cumplieron con los criterios para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En la Tabla 5 se muestran las razones de momios (RM) y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%) de cada uno de los 6 SNPs después de calcular la regresión logística asumiendo un modelo de herencia dominante. De los seis polimorfismos estudiados, dos estuvieron significativamente asociados al diagnóstico de la LLC. La asociación más fuerte se encontró para el SNP rs872071 (RM = 2.93; IC 95% = 1.47-5.82; P = 0.002). El segundo SNP asociado fue rs17483466 (RM = 1.79, IC 95% = 1.03-3.13; P = 0.041), que también había demostrado asociación en los estudios previos. El alelo alanina del polimorfismo rs11083846 tuvo tendencia a la asociación con la LLC (P = 0.085), pero ésta no fue significativa.

Tabla 5. Resultados de asociación entre los SNPs y la LLC.

SNP	Genes cercanos	Alelo de riesgo	RM (IC 95%)	P
rs872071	<i>IRF4</i>	G	2.93 (1.47-5.82)	0.002
rs11083846	<i>PRKD2/STRN4</i>	A	1.76 (0.93-3.35)	0.085
rs7176508	-	A	1.34 (0.8-2.26)	0.266
rs13397985	<i>SP140/SP110</i>	G	0.90 (0.5-1.63)	0.733
rs735665	<i>GRAMD1B</i>	A	1.54 (0.89-2.65)	0.119
rs17483466	<i>ACOXL/BCL2L11</i>	G	1.79 (1.03-3.13)	0.041

Al calcular la prueba de tendencia de Cochran–Armitage con el modelo aditivo sólo la asociación con el SNP rs872071 se mantuvo estadísticamente significativa ($P = 0.012$). El análisis con el polimorfismo rs11083846 se acercó a la significancia ($P = 0.083$), siendo consistente con el modelo dominante mencionado anteriormente.

Las frecuencias alélicas para el alelo menor (FAM) fueron similares a las reportadas previamente para México-Americanos y significativamente diferentes a las frecuencias de los pacientes chinos reportadas por Lan y cols.¹⁷ Las FAM de los casos para el SNP rs13397985 y en todos los sujetos para el SNP rs735665 se mostraron con diferencias significativas al ser comparadas con los pacientes caucásicos.

Los resultados de las pruebas de tendencia para los seis polimorfismos, las frecuencias alélicas y sus comparaciones con los estudios previos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de asociación y frecuencias alélicas en caucásicos, chinos y mestizos mexicanos.

SNP	Caucásicos	Chinos	Mestizos Mexicanos
rs872071			
MAF Controles	0.46	0.31*	0.47†
MAF Casos	0.37	0.43	0.59*†
RM (IC 95%)	1.54 (1.41–1.69)	1.78 (1.25–2.53)	1.64 (1.11-2.42)
Valor P	1.91E–20	0.0013	0.012
rs11083846			
MAF Controles	0.22	0.001*	0.09*†
MAF Casos	0.29	0*	0.14*†
RM (IC 95%)	1.35 (1.22–1.49)	NA	1.68 (0.93-3.05)
Valor P	3.96E–09	NA	0.083

rs7176508

MAF Controles	0.37	0.19*	0.3†
MAF Casos	0.45	0.2*	0.36†
RM (IC 95%)	1.37 (1.26–1.50)	1.04 (0.68–1.61)	1.35 (0.9-2.02)
Valor P	4.54E–12	0.84	0.144

rs13397985

MAF Controles	0.19	0.003*	0.13†
MAF Casos	0.25	0.02*	0.13*
RM (IC 95%)	1.41 (1.26–1.57)	10.26 (2.4–43.9)	0.95 (0.55-1.65)
Valor P	5.40E–10	0.0017	0.859

rs735665

MAF Controles	0.21	0.01*	0.37*†
MAF Casos	0.28	0.01*	0.44*†
RM (IC 95%)	1.45 (1.31–1.61)	3.16 (0.65–15.28)	1.35 (0.92-1.97)
Valor P	3.78E–12	0.15	0.122

rs17483466

MAF Controles	0.20	0.01*	0.15†
MAF Casos	0.26	0.04*	0.2†
RM (IC 95%)	1.39 (1.25–1.53)	2.75 (1.01–7.53)	1.42 (0.87-2.31)
Valor P	2.36E–10	0.049	0.155

* Diferencia de proporciones significativa vs caucásicos; † diferencia de proporciones significativa vs chinos

Como ya había sido reportado previamente por Di Bernardo y cols.,⁴⁰ el riesgo para desarrollar la LLC aumentó al tener un mayor número de alelos de riesgo de los polimorfismos asociados (Tabla 7). Al combinar los genotipos de las dos variantes asociadas, los sujetos con tres alelos tuvieron el doble de riesgo de presentar la LLC (RM = 2.1, IC 95% = 1.22-3.63; P = 0.008).

Tabla 7. Razones de momio del incremento de alelos de riesgo de los polimorfismos rs872071 y rs17483466

No. de alelos	No. de Controles	No. de Casos	RM (IC 95%)	P
0	23	9	1 (reference)	
1	51	45	0.34 (0.15-0.76)	0.009
2	32	52	0.80 (0.47-1.34)	0.394
3	10	9	2.10 (1.22-3.63)	0.008
4	0	2	0.88 (0.35-2.26)	0.796

La curva ROC de la Figura 6 muestra que tanto el genotipo de rs872071 ($P = 0.027$, IC 95% = 0.511-0.657) como la suma de dos alelos de riesgo en el modelo dominante ($P = 0.026$, IC 95% = 0.511-0.658), tuvieron un área bajo la curva de 0.584. De esta manera, se consideró que podían predecir de forma significativa el diagnóstico de LLC, aunque de una forma débil.

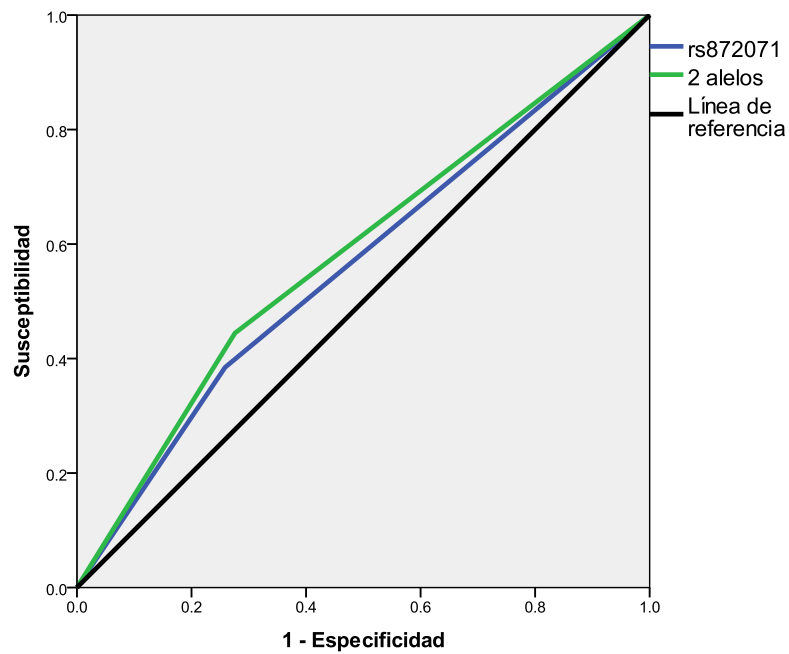


Figura 6. Curva ROC para rs872071 y dos alelos de riesgo.

Se realizó un análisis de asociación entre los genotipos de los seis polimorfismos y las características clínicas de los pacientes incluyendo factores pronósticos y respuesta a tratamiento, sin embargo ninguno de los resultados fueron significativos.

DISCUSIÓN

Grandes esfuerzos de investigación arqueológica, geológica y genética han evidenciado que las poblaciones nativas de América descienden de al menos tres oleadas de migración asiática proveniente de Siberia.⁹² Esto puede explicar que estudios anteriores hayan podido encontrar coincidencias genéticas y epidemiológicas entre mexicanos y asiáticos para varias condiciones hematológicas.^{76,78}

Los mestizos mexicanos constituyen más del 90% de la población mexicana y son el resultado de la mezcla étnica de principalmente la genética caucásica y amerindia, teniendo en su genoma entre el 30% y el 60% de ancestría europea.^{71,93} Las proporciones entre ancestría caucásica y ancestría amerindia varían de acuerdo a la zona geográfica de la República Mexicana, habiendo un gradiente descendiente de norte a sur en cuanto a la presencia de ancestría caucásica.⁷¹ A pesar de que el muestreo de casos y controles se haya realizado en el Distrito Federal, para este estudio resultaba relevante comparar el lugar de nacimiento de casos y controles, ya que parte de la población del centro del país ha migrado del resto de la república. En este sentido, el lugar de nacimiento de los casos, los controles y los ascendientes de ambos grupos tuvieron un predominio del centro del país, por lo que consideramos que ambas muestras pueden compararse.

La LLC es una neoplasia linfoide con diferencias epidemiológicas entre las poblaciones, siendo muy poco frecuente en Asia y América Latina, comparado con lo reportado en poblaciones caucásicas.¹² Estudios retrospectivos en América Latina con un tiempo largo de seguimiento habían reportado un número limitado de pacientes con LLC. De forma particular, un estudio de seguimiento por 35 años en México encontró 49 casos²⁸ y una

evaluación retrospectiva de 16 946 pacientes por 20 años en Costa Rica reportó 20 pacientes con LLC.²¹ Los hospitales que participaron en esta investigación cubren aproximadamente el 25% de los usuarios del sistema público de salud mexicano y sólo se encontraron 142 pacientes con esta enfermedad, de los cuales sólo 117 fueron mestizos mexicanos. Estas observaciones confirman que la LLC es una forma rara de leucemia en México y que una proporción no menor de los pacientes en nuestro país tienen influencia genética caucásica reciente.

Desde hace mucho tiempo ha sido inquietante para los investigadores que tanto los asiáticos, como los latinoamericanos tengan prevalencias bajas de LLC, al ser comparados con países que tienen un predominio caucásico en su población.¹² Esto ha derivado en estudios que han buscado explicar este fenómeno. En 2012, una investigación conjunta entre centros asiáticos y norteamericanos comparó las alteraciones genéticas de 55 pacientes caucásicos y 77 pacientes asiáticos con LLC por medio de un micro-arreglo de 250 genes. Este estudio reportó que la frecuencia de las alteraciones genéticas conocidas fue similar entre ambos grupos. Los resultados anteriores, en conjunto con otras investigaciones parecen sugerir que una vez desarrollada la enfermedad, el comportamiento clínico y genético es similar entre los pacientes de distintas poblaciones, por lo que las diferencias epidemiológicas pueden explicarse mejor mediante factores de riesgo.^{94,95}

Una explicación posible de la baja prevalencia de LLC en Asia y Latinoamérica es la presencia de diferentes alelos de riesgo o la existencia de factores genéticos protectores que estuvieron presentes en el genoma de los ancestros asiáticos y que han sido conservados a

través de los años a pesar de la migración y el mestizaje con otras poblaciones. El estudio de estas hipótesis sólo pueden efectuarse en poblaciones con baja prevalencia de LLC como la nuestra y las implicaciones biológicas y clínicas de sus resultados son relevantes, lo que justifica su conducción.

En esta investigación buscamos explorar si las seis variantes genéticas que habían sido reportadas en poblaciones caucásicas y replicadas en pacientes chinos, estaban asociadas al riesgo de LLC en los mexicanos. Pudimos encontrar que el SNP rs872071 está asociado de forma consistente en las tres poblaciones y que rs17483466 estuvo asociado en mexicanos cuando se analizó con el modelo dominante.

El SNP rs872071 se encuentra en el UTR 3' del gen de IRF4 y es el locus que ha mostrado la mayor asociación en caucásicos y chinos.^{17,40} La reproducibilidad de esta asociación en múltiples poblaciones, la evidencia de que el alelo guanina de este polimorfismo reduce la expresión de IRF4 en linfocitos⁴⁰ y el reciente desarrollo de un modelo murino de LLC en un ratón IRF4^{-/-} Vh11,⁹⁶ hacen patente la importancia que tiene IRF4 en la etiología de la LLC, independientemente de la población en la que se estudie.

Lan y cols. habían reportado que las FAM de los 6 SNPs analizados eran significativamente menores en los chinos, comparados con las de los caucásicos, en especial para rs11083846, donde el alelo de riesgo estuvo ausente en los 71 casos estudiados y fue muy raro en los controles.¹⁷ En nuestro estudio, esta variante también tuvo una FAM menor comparada con los caucásicos reportados por Di Bernardo, pero el alelo de riesgo fue más frecuente que lo observado en los chinos. Esta variante tuvo tendencia a la significancia para la asociación con LLC en los modelos dominante y aditivo.

Todas las FAM de las seis variantes fueron diferentes entre mestizos mexicanos y chinos; al comparar mexicanos con caucásicos también hubo diferencias significativas, a excepción de los SNPs rs7176508 y rs17483466. Esto parece apoyar que diferencias en las frecuencias de alelos de riesgo pudiera contribuir a las diferencias en la prevalencia de la LLC en el mundo. Di Bernardo y cols. reportaron previamente que el aumento en el número de alelos de riesgo de los polimorfismos asociados, incrementaba el riesgo de LLC.⁴⁰ En este estudio, la suma de alelos de las dos variantes que resultaron asociadas en el modelo dominante también tuvieron una razón de momios incremental; sin poder observar significancia estadística para cuatro alelos debido al número limitado de sujetos con esta condición.

El análisis de una curva ROC se ha empleado en estudios de asociación genética con la intención de trasladar los resultados al campo clínico y probar su utilidad como factores pronósticos. Al realizar el análisis de curva ROC en este estudio observamos que tanto el genotipo de rs872071 como la suma de dos de los alelos de rs872071 y rs17483466 pudieron predecir de forma significativa el diagnóstico de LLC con un área bajo la curva de 0.584. Este resultado es relevante, dado el peso que puede tener una simple sustitución de nucleótido en el DNA para un rasgo complejo como la LLC, aunque por sí solo no puede aplicarse directamente en la práctica clínica.

A pesar de que el objetivo primario de esta investigación fue buscar la asociación entre los polimorfismos y la LLC, la escasez de información clínica sobre los pacientes con LLC en nuestro país motivó que se incluyeran algunas características clínicas relevantes en la base de datos para su análisis posterior.

En este sentido, encontramos que a pesar de que en la gran mayoría de las series reportadas en el mundo⁹⁷ se ha encontrado un predominio del género masculino para esta enfermedad, nosotros observamos prácticamente la misma proporción de hombres y mujeres en este estudio. Al momento del diagnóstico, la mediana de edad sí fue similar a la observada en otras poblaciones.⁹⁸

Estudios de series de pacientes en países desarrollados han reportado que cerca del 80% de los pacientes se diagnostican en estadios tempranos de la enfermedad y que sólo el 10% corresponden a un estadio C de Binet.⁹⁹ En contraste, la mayoría de los pacientes en este estudio se diagnosticaron en los estadios intermedios o avanzados. Estas diferencias podrían ser explicadas por un retraso en el acceso a los servicios de salud en nuestro país, la falta de autocuidado en el paciente para acudir a los primeros síntomas de la enfermedad, programas deficientes de medicina preventiva o a la falta de un envío oportuno por los centros del primer nivel de atención. Estas condiciones no son exclusivas de esta enfermedad y se presentan para la mayoría de los padecimientos en México¹⁰⁰, donde las determinantes sociales siguen jugando un rol para el acceso a la salud y los adultos mayores son un grupo especialmente vulnerable debido a la falta de apoyo social, económico e institucional para obtener atención.¹⁰¹

A pesar de que los factores pronósticos biológicos de la LLC se han asociado fuertemente a la sobrevida,⁶ son útiles para predecir el tiempo para el primer tratamiento,¹⁰² o pueden dirigir la terapéutica de los pacientes¹⁰³, una proporción muy baja de los expedientes analizados en este estudio contaba con un reporte de la expresión de ZAP-70 y CD38 o una evaluación citogenética. La falta de cobertura de este tipo de estudios en los hospitales

públicos o el bajo nivel socioeconómico de los pacientes que se atienden ahí pueden explicar la omisión de estas pruebas al diagnóstico.

Las preferencias de tratamiento que arroja este estudio son parecidas a las utilizadas en el manejo de pacientes con LLC en edad avanzada o con baja reserva funcional,¹⁰⁴ con una gran proporción de pacientes tratados con clorambucil y sólo una tercera parte recibiendo esquemas basados en fludarabina solos o en combinación con rituximab.

El tratamiento de los pacientes con LLC en esta investigación difiere claramente con lo reportado en otros registros internacionales. Un estudio que analizó las preferencias de tratamiento de los hematólogos en Alemania para un grupo de pacientes con mediana de edad de 71 años reportó que el clorambucil se usó en primera línea en sólo el 7% de los pacientes y en el 6% como segunda línea. La combinación de bendamustina y rituximab o el FCR fueron los esquemas más frecuentes.¹⁰⁵ Sin embargo, se sabe que el uso de fludarabina como primera línea, comparada con clorambucil, no resulta en una ventaja para los pacientes con LLC mayores a 70 años. De forma interesante, las tasas de respuesta que se encontraron en nuestro estudio fueron similares a las alcanzadas en ensayos clínicos con fludarabina.¹⁰⁶ Estas observaciones podrían motivar la realización de ensayos clínicos comparativos en nuestro medio.

La combinación de quimioterapia e inmunoterapia ha demostrado una ventaja en términos de sobrevida para los pacientes jóvenes con LLC.¹⁰⁷ Un hallazgo relevante fue que 22 pacientes menores de 65 años recibieron clorambucil como tratamiento de primera línea. En algunos de estos casos, la diferencia del costo entre el clorambucil y la quimio-inmunoterapia posiblemente haya motivado la elección terapéutica; privilegiando la

adherencia terapéutica sobre los resultados a largo plazo. También es posible que el tratamiento se haya iniciado antes de que se contara con la disponibilidad de estos fármacos en el cuadro básico de medicamentos institucional.

Una de las limitantes de este estudio fue el número de pacientes incluidos a pesar de la participación de cuatro hospitales, siendo dos de ellos de concentración. Esto se debió a la baja prevalencia de la enfermedad en nuestro país, haciendo necesario realizar esfuerzos en varios estados de la república y otros centros de tercer nivel del Distrito Federal para poder ampliar la muestra para estudios futuros.

Otra limitante podría ser la posibilidad de tener un efecto confusor por diferencias en la ancestría de casos y controles. Se intentó disminuir este efecto al incluir a sujetos con al menos tres generaciones de mestizos mexicanos. En un futuro se podrían analizar marcadores adicionales informativos de ancestría para corregir las asociaciones encontradas en el estudio.

Hasta donde sabemos, éste es la primera investigación de asociación genética en pacientes latinoamericanos con LLC y el segundo en una población con baja prevalencia de LLC.

CONCLUSIONES

- El alelo guanina de rs872071 en *IRF4* se encuentra asociado a la leucemia linfocítica crónica en los mestizos mexicanos con una razón de momios de 2.93.
- El alelo guanina de rs17483466 en *ACOXL/BCL2L11* se encuentra asociado a la leucemia linfocítica crónica en los mestizos mexicanos con una razón de momios de 1.79.
- Contar con tres alelos de alguno de estos dos polimorfismos incrementa 2 veces el riesgo de padecer leucemia linfocítica crónica en esta población.
- Las frecuencias de los alelos de riesgo para LLC son distintas en los mestizos mexicanos al compararse con caucásicos y chinos.
- Los pacientes con LLC en México se diagnostican en estadios más avanzados de la enfermedad.
- La realización de estudios citogénéticos, la evaluación molecular del gen P53 y el análisis mutacional de las cadenas de inmunoglobulinas no se realizan de manera rutinaria en los hospitales públicos de nuestro país.
- La mayoría de los pacientes reciben tratamientos de baja intensidad incluyendo a los pacientes jóvenes.

REFERENCIAS

1. Lichtman, Kipps, Seligsohn, Kaushansky, Prchal. Williams Hematology. Mc Graw Hill; 2010.
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–5456.
3. Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, et al. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2010;23(1):3–20.
4. Lanasa MC. Novel insights into the biology of CLL. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2010;2010:70–76.
5. Entrez Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), Specialized Information Services Division. [2003] - [cited 2014 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
6. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2009;421–429.
7. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(219):219–34.
8. Binet JL, Auquier A, Dighiero G. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(198):198–206.
9. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol*. 2013;88(9):803–816.
10. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C, et al. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980-2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood*. 2009;114(10):2044–2050.
11. Weiss NS. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Natl. Cancer Inst. Monogr*. 1979;53:139–142.
12. Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Patterns of occurrence of the leukaemias. *Eur. J. Cancer*. 1995;31A(6):941–949.
13. Ministerio de Sanidad y Consumo. Registro Español de Leucemias. *Regist. Esp. Leucemias*. 2002;
14. Mozaheb Z, Aledavood A, Farzad F. Distributions of major sub-types of lymphoid malignancies among adults in Mashhad, Iran. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(1):26–29.
15. Kulshrestha R, Sah SP. Pattern of occurrence of leukemia at a teaching hospital in eastern region of Nepal - a six year study. *JNMA J. Nepal Med. Assoc*. 2009;48(173):35–40.
16. Gale RP, Cozen W, Goodman MT, Wang FF, Bernstein L. Decreased chronic lymphocytic leukemia incidence in Asians in Los Angeles County. *Leuk. Res*. 2000;24(8):665–669.
17. Lan Q, Au W-Y, Chanock S, et al. Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *Eur. J. Haematol*. 2010;85(6):492–495.
18. Pinheiro PS, Sherman RL, Trapido EJ, et al. Cancer incidence in first generation U.S. Hispanics: Cubans, Mexicans, Puerto Ricans, and new Latinos. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2009;18(8):2162–2169.
19. Ibarra-Ramirez V. Caracterización epidemiológica de pacientes con cáncer hematológico y de tejido linfático. *Tesis Univ. Guatem*. 2006;
20. Amaru R, Torres G, Limachi M, et al. Epidemiología de las Leucemias en Bolivia. Evaluación de 933 casos. *Cuad. Hosp. Clínicas*. 2008;53(2):9–15.
21. Elizondo Cerdas J, Salazar Sanchez L, Ramón Ortiz M, Vasquez Castillo L. Leucemia Linfocítica Crónica Experiencia Acumulada En El Servicio De Hematología Del Hospital San Juan De Dios. *Rev. Costarric. Cienc. Médicas*. 1987;8(4):281–4.

22. Sanchez A, Florez C, Licona Z, Castellanos E. Leucemias en el Hospital Escuela. *Rev. Médica Hondureña*. 1993;61:116–121.
23. Carozza SE, Howe HL. Patterns of cancer incidence among US Hispanics/Latinos, 1995-2000. *Cancer Causes Control*. 2006;17(8):1067–1075.
24. Rodríguez M, Hernández G, Suárez L, de la Uz B. Aspectos clinicoepidemiológicos de la leucemia linfocítica crónica. *Medisan*. 2011;15(3):331–338.
25. Carmona MA, Marinov N, Guerra C, Morilla R. Síndromes linfoproliferativos crónicos en Chile. Estudio prospectivo de 132 casos. *Rev Med Chile*. 2003;131(3):291–298.
26. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) Research Data (200-2011 SEER 18), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch, released April 2014.
27. Hernández Ramírez P. Leucemia linfocítica crónica: Aspectos clínicos y biológicos. *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. Hemoter*. 1999;15(1):7–20.
28. Aleman-Hoey D, Ruiz-Argüelles G, Verduzco-Rodríguez L, Lopez-Ariza B, Labardini J. Leucemia linfocítica crónica. Experiencia de 35 años en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. *Rev. Investig. Clínica*. 1982;(34):151–6.
29. Amador Medina LF. Leucemia Linfocítica Crónica. Experiencia de 10 años en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Congr. Agrup. Mex. Para El Estud. Hematol*. 2010;Publicación en cartel:
30. Ruiz-Argüelles G, Cantú-Rodríguez O, Mercado-Díaz L. La frecuencia de algunas neoplasias linfoproliferativas crónicas es menor en México que en poblaciones caucásicas. *Med. Interna México*. 1996;12:41.
31. Ruiz-Argüelles GJ, Velázquez BM, Apreza-Molina MG, et al. Chronic lymphocytic leukemia is infrequent in Mexican mestizos. *Int. J. Hematol*. 1999;69(4):253–255.
32. Martínez M. Incidencia de neoplasias Hematológicas en el IMSS Delegación Veracruz Norte. Año 2000. *XLII Congr. Nac. Hematol. Hemato-Oncol. Adultos*. 2001;Memorias de Congreso.
33. Góngora-Biacchi R. Epidemiología de las enfermedades hematológicas en el ámbito nacional. El perfil Epidemiológico en la Península de Yucatán. *Gac. Médica México*. 2002;138(S1):S15–S16.
34. Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJK. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source*. 2010;9:31.
35. Cocco P, Satta G, Dubois S, et al. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: results of the Epilymph study. *Occup. Environ. Med*. 2013;70(2):91–98.
36. Romanenko AY, Finch SC, Hatch M, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks. *Radiat. Res*. 2008;170(6):711–720.
37. Crowther-Swanepoel D, Corre T, Lloyd A, et al. Inherited genetic susceptibility to monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*. 2010;116(26):5957–5960.
38. Brown JR. Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev. Hematol*. 2008;1(1):51–61.
39. Fuller SJ, Papaemmanuil E, McKinnon L, et al. Analysis of a large multi-generational family provides insight into the genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol*. 2008;142(2):238–245.
40. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet*. 2008;40(10):1204–1210.

41. Rasi S, Spina V, Brusca A, et al. A variant of the LRP4 gene affects the risk of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* 2011;152(3):284–294.
42. Liang XS, Caporaso N, McMaster ML, et al. Common genetic variants in candidate genes and risk of familial lymphoid malignancies. *Br. J. Haematol.* 2009;146(4):418–423.
43. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 2010;42(2):132–136.
44. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Ma Y, et al. Fine-scale mapping of the 6p25.3 chronic lymphocytic leukaemia susceptibility locus. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(9):1840–1845.
45. Fernández V, Jares P, Beà S, et al. Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms. *Haematologica.* 2004;89(11):1322–1331.
46. Slager SL, Goldin LR, Strom SS, et al. Genetic susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 2010;19(4):1098–1102.
47. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood.* 2011;117(6):1911–1916.
48. Sellick GS, Wade R, Richards S, et al. Scan of 977 nonsynonymous SNPs in CLL4 trial patients for the identification of genetic variants influencing prognosis. *Blood.* 2008;111(3):1625–1633.
49. Crowther-Swanepoel D, Mansouri M, Enjuanes A, et al. Verification that common variation at 2q37.1, 6p25.3, 11q24.1, 15q23, and 19q13.32 influences chronic lymphocytic leukaemia risk. *Br. J. Haematol.* 2010;150(4):473–479.
50. Slager SL, Skibola CF, Di Bernardo MC, et al. Common variation at 6p21.31 (BAK1) influences the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;120(4):843–846.
51. Sillé FCM, Thomas R, Smith MT, Conde L, Skibola CF. Post-GWAS functional characterization of susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2012;7(1):e29632.
52. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett.* 2002;187(1-2):199–205.
53. Wade R, Di Bernardo MC, Richards S, et al. Association between single nucleotide polymorphism-genotype and outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized chemotherapy trial. *Haematologica.* 2011;96(10):1496–1503.
56. PubMed [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), Specialized Information Services Division. [2003] - [citado 2014 Jun 10]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
57. Artemisa [Internet]. Instituto Nacional de Salud Pública de México. [2013] - [citado 10 Jun 14]. Disponible en: <http://www.insp.mx/centros/decisiones-en-salud-publica/servicios/5-centros/salud-publica/55-artemisa-en-linea.html>
58. SciELO - Scientific Electronic Library Online FAPESP CNPq BIREME/OPS/OMS FapUnifesp. [citado 10 junio 2014]. Disponible en: <http://www.scielo.org/php/index.php?lang=es>
59. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000- [citado 10 jun 2014]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/>
60. dbSNP [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), Specialized Information Services Division. [2003] - [citado 2014 Jun 10]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbsnp/>
59. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22:55–79.

60. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(1):22–33.
61. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5(3):230–242.
62. Kovalevska LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, et al. Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas. *Exp. Oncol.* 2006;28(3):225–230.
63. Bloch DB, de la Monte SM, Guigaouri P, Filippov A, Bloch KD. Identification and characterization of a leukocyte-specific component of the nuclear body. *J. Biol. Chem.* 1996;271(46):29198–29204.
64. Ling PD, Peng RS, Nakajima A, et al. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 2005;24(20):3565–3575.
65. Negorev DG, Vladimirova OV, Kossenkov AV, et al. Sp100 as a potent tumor suppressor: accelerated senescence and rapid malignant transformation of human fibroblasts through modulation of an embryonic stem cell program. *Cancer Res.* 2010;70(23):9991–10001.
66. Conde L, Halperin E, Akers NK, et al. Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. *Nat. Genet.* 2010;42(8):661–664.
67. Oliver PM, Wang M, Zhu Y, et al. Loss of Bim allows precursor B cell survival but not precursor B cell differentiation in the absence of interleukin 7. *J. Exp. Med.* 2004;200(9):1179–1187.
68. Syvänen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(12):930–942.
69. Livak KJ, Marmaro J, Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat. Genet.* 1995;9(4):341–342.
70. Salazar-Flores J, Dondiego-Aldape R, Rubi-Castellanos R, et al. Population structure and paternal admixture landscape on present-day Mexican-Mestizos revealed by Y-STR haplotypes. *Am. J. Hum. Biol.* 2010;22(3):401–409.
71. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106(21):8611–8616.
72. Martínez-Cortés G, Salazar-Flores J, Fernández-Rodríguez LG, et al. Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *J. Hum. Genet.* 2012;57(9):568–574.
73. Malyarchuk B, Derenko M, Denisova G, et al. Ancient links between Siberians and Native Americans revealed by subtyping the Y chromosome haplogroup Q1a. *J. Hum. Genet.* 2011;56(8):583–588.
74. Curry A. Ancient migration: Coming to America. *Nature.* 2012;485(7396):30–32.
75. Ruiz-Argüelles GJ, Poblete-Naredo I, Reyes-Núñez V, et al. Primary thrombophilia in Mexico IV: frequency of the Leiden, Cambridge, Hong Kong, Liverpool and HR2 haplotype polymorphisms in the factor V gene of a group of thrombophilic Mexican Mestizo patients. *Rev. Investig. Clínica.* 2004;56(5):600–604.
76. Majluf-Cruz A, Moreno-Hernández M, Ruiz-de-Chávez-Ochoa A, et al. Activated protein C resistance and factor V Leiden in Mexico. *Clin. Appl. Thromb.* 2008;14(4):428–437.
77. Zavala Hernández C, Hernández Zamora E, Martínez Murillo C, et al. Association of resistance to activated protein with the presence of Leiden and Cambridge Factor V mutations in Mexican patients with primary thrombophilia. *Cir. Cir.* 2010;78(2):127–132.
78. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. *Leuk. Lymphoma.* 2004;45(7):1365–1368.

79. Gamboa R, Hernandez-Pacheco G, Hesiquio R, et al. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum. Biol.* 2000;72(6):975–981.
80. Alvarado-Hernández DL, Hernández-Ramírez D, Noyola DE, García-Sepúlveda CA. KIR gene diversity in Mexican mestizos of San Luis Potosí. *Immunogenetics.* 2011;63(9):561–575.
81. Rosas-Vargas H, Flores-Segura A, Guizada-Claire B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum. Biol.* 2003;75(1):91–96.
82. Villalobos-Arámbula AR, Rivas F, Sandoval L, et al. beta(A) globin gene haplotypes in Mexican Huichols: Genetic relatedness to other populations. *Am. J. Hum. Biol.* 2000;12(2):201–206.
83. Hu D, Ziv E. Confounding in genetic association studies and its solutions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2008;448:31–39.
84. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat. Rev. Genet.* 2006;7(10):781–791.
85. Cano-Castellanos, R, Alvarado-Ibarra, M, Alvarez-Pantoja, E, et al. Primer consenso en leucemia linfocítica crónica de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología. *Med. Univ.* 2008;10(40):159–167.
86. Real Academia de la Lengua Española. Diccionario de la Lengua Española. *Dicc. Leng. Esp.* 2014; disponible en: <http://buscon.rae.es/draef/html/cabecera.htm>
87. Sayala HA, Rawstron AC, Hillmen P. Minimal residual disease assessment in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2007;20(3):499–512.
88. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003;19(1):149–150.
89. Duffy DL, Iles MM, Glass D, et al. IRF4 variants have age-specific effects on nevus count and predispose to melanoma. *Am. J. Hum. Genet.* 2010;87(1):6–16.
90. Dieval C, Herrador C, Guiboux A-L, Haramburu F, Mercié P. Rare association between chronic lymphocytic leukemia and systemic lupus erythematosus. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983. 2011;47(7-8):752–3.
91. Lugassy G, Lishner M, Polliack A. Systemic lupus erythematosus and chronic lymphocytic leukemia: rare coexistence in three patients, with comments on pathogenesis. *Leuk. Lymphoma.* 1992;8(3):243–245.
92. Reich D, Patterson N, Campbell D, et al. Reconstructing Native American population history. *Nature.* 2012;488(7411):370–374.
93. Salazar-Flores J, Dondiego-Aldape R, Rubi-Castellanos R, et al. Population structure and paternal admixture landscape on present-day Mexican-Mestizos revealed by Y-STR haplotypes. *Am. J. Hum. Biol.* 2010;22(3):401–409.
94. Boggs DR, Chen SC, Zhang ZN, Zhang A. Chronic lymphocytic leukemia in China. *Am. J. Hematol.* 1987;25(3):349–354.
95. Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, et al. Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Oncol.* 2013;43(2):561–565.
96. Shukla V, Ma S, Hardy RR, Joshi SS, Lu R. A role for IRF4 in the development of CLL. *Blood.* 2013;122(16):2848–2855.
97. Van den Broek EC, Kater AP, van de Schans S a. M, et al. Chronic lymphocytic leukaemia in the Netherlands: trends in incidence, treatment and survival, 1989-2008. *Eur. J. Cancer.* 2012;48(6):889–895.
98. Bhayat F, Das-Gupta E, Smith C, McKeever T, Hubbard R. The incidence of and mortality from leukaemias in the UK: a general population-based study. *BMC Cancer.* 2009;9:252.
99. Tjønnfjord GE, Ly BE, Johannesen TB, et al. Chronic lymphocytic leukaemia in Norway--incidence and prognostic markers at diagnosis. *Tidsskr. Den Nor. Lægeforen.* 2012;132(18):2056–2059.

100. Unger-Saldaña K, Infante-Castañeda C. Delay of medical care for symptomatic breast cancer: a literature review. *Salud Pública México*. 2009;51 Suppl 2:s270–285.
101. Juárez-Ramírez C, Márquez-Serrano M, Salgado de Snyder N, et al. [Health inequality among vulnerable groups in Mexico: older adults, indigenous people, and migrants]. *Rev. Panam. Salud Pública*. 2014;35(4):284–290.
102. Molica S, Giannarelli D, Gentile M, et al. The utility of two prognostic models for predicting time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia patients: results of a comparative analysis. *Leuk. Res*. 2013;37(8):943–947.
103. Trbusek M, Malcikova J. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2013;792:109–131.
104. Satram-Hoang S, Reyes C, Hoang KQ, Momin F, Skettino S. Treatment practice in the elderly patient with chronic lymphocytic leukemia-analysis of the combined SEER and Medicare database. *Ann. Hematol*. 2014;93(8):1355–44.
105. Knauf W, Abenhardt W, Dörfel S, et al. Routine treatment of patients with chronic lymphocytic leukaemia by office-based haematologists in Germany-data from the Prospective Tumour Registry Lymphatic Neoplasms. *Hematol. Oncol*. 2014;Epub ahead of print(doi: 10.1002/hon.2139):
106. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(16):3382–3391.
107. Nabhan C, Aschebrook-Kilfoy B, Chiu BC-H, et al. The impact of race, ethnicity, age and sex on clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis in the modern era. *Leuk. Lymphoma*. 2014;Epub ahead of print: 10.3109/10428194.2014.898758

ANEXOS

- Dictamen de aprobación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Dictamen de aprobación de la Comisión de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
- Carta de consentimiento informado para los casos IMSS
- Carta de consentimiento informado para los controles IMSS
- Carta de consentimiento informado para los casos INCMNSZ