



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES,
COMO FORTALECIMIENTO EN EL DIAGNÓSTICO DE
LEUCEMIAS AGUDAS Y LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

CERÓN MALDONADO RAFAEL

**ASESORA DE TESIS:
DRA. IRMA OLARTE CARRILLO**

**CO-ASESORA DE TESIS:
M.C. IDALIA CARMEN ÁVILA MIYAZAWA**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



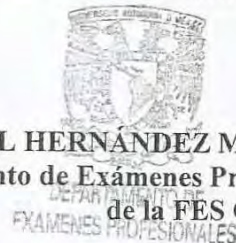
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Detección y análisis de marcadores moleculares, como fortalecimiento en el diagnóstico de leucemias agudas y leucemia mieloide crónica.

Que presenta el pasante: Rafael Cerón Maldonado

Con número de cuenta: 307103871 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Ma. de Lourdes Galván Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mgtr*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM por la formación académica recibida.

Al comité tutorial formado por la Dra. Irma Olarte Carrillo y la M. en C. Idalia Carmen Ávila Miyazawa por sus sugerencias y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Jurado para el examen de grado conformado por: M. en C. Idalia Carmen Ávila Miyazawa, Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda, Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez, Q.F.B. René Damián Santos y Q.F.B. Ma. De Lourdes Galván Ruiz por todos sus comentarios y propuestas para mejorar el trabajo de tesis.

A Dios, por darme el don de la vida, por bendecirme a cada paso que doy y proporcionarme todos los medios para poder concluir satisfactoriamente mis estudios profesionales. Gloria a Dios.

A mis padres, por siempre estar al pendiente de mí, por impulsarme, alentarme y brindarme su gran amor y comprensión en todo momento, así como por todo el esfuerzo y sacrificio que hacen día a día para sacar a su familia adelante. Nunca podré pagarles todo lo que han hecho por mí. Disculpen los tropiezos que tuve en el camino y los dolores de cabeza que les causé con mis acciones. Los amo, padres ¡Lo logramos!

A mi abuelito Rafael Cerón Martínez, a mi tía Lili y a Mauricio, por cuidarme, apoyarme y aguantarme durante la época más difícil e importante de mi vida.

A la familia Cerón Martínez, Ávila Cerón, Delgado Cerón y Maldonado Méndez, por motivarme siempre con su apoyo y afecto. Los quiero mucho.

A el Dr. Adolfo Martínez Tovar, por acogerme en el laboratorio y brindarme los medios y el apoyo necesario para llevar a cabo satisfactoriamente mi servicio social y tesis, así como por sembrar en mí el espíritu investigador y por aguantar todos los desastres que hice durante mi estancia.

A la Dra. IRMA OLARTE CARRILLO, por apoyarme durante todos los trámites de registro de servicio social y tesis, sin los cuales no hubiera podido realizar este trabajo; así como por rescatarme del lado oscuro de la fuerza y confiar en que iba a ser capaz de realizar las tareas que puso en mi manos. Por compartir de su conocimiento conmigo y por mostrarme el camino de la investigación, del cual nunca quiero salir. Por hacerme crecer como persona y como profesional. Nunca podré terminar de agradecerle todo lo que ha hecho por mí, solo espero no haberle fallado (mucho) en el camino.

A la cuasi Dra. Iveth Mendoza, por su gran amistad, por compartirme de su conocimiento, por apoyarme durante toda mi estancia en el HGM y por hacerme reír tanto con la distorsión de las frases que decimos.

A la QFB Anel GaLa, por la valiosa amistad que se ha forjado entre nosotros, por apoyarme y motivarme personal y profesionalmente. Gracias por las aventuras y locuras vividas dentro y fuera del laboratorio. Te quiero, amiga.

Al BQD Adrián de la Cruz, por la hermandad que hemos construido, así como por el apoyo y la motivación incondicional, gracias por siempre decirme las palabras correctas en el momento que más las necesito. A seguir haciendo crecer esta amistad, hermano.

A los profesores que contribuyeron a mi formación profesional y que me guiaron para encontrar mi verdadera pasión, en especial a los profesores: Vicente Turrubiarte (ENP9), Olivia Noguéz, Sonia Rincón, Julio Botello, Francisco López, Ricardo Santiago, Gilda Flores, Nydia González, Sandra Martínez, Erick Ballesteros, Gloria Leticia Arellano, Rene Damian, Ma. De

Lourdes Galván, Rosalba Bonilla, Ma. Esther Revuelta y a la maestra que me hizo amar la hematología, IDALIA CARMEN ÁVILA MIYAZAWA.

A mi master/padawan Dr. Christian Wayne Ramos, por todo el apoyo que me brindó tanto en lo profesional y académico como en lo personal. Es un honor pelear en contra de la leucemia a su lado, capitan.

Al Dr. Efreem Montaña, por su apoyo, amistad y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al personal del servicio de hematología del HGM, Dr. Juan Collazo, Dra. Etta Rozen, Dra. Guadalupe León, Dr. Kassack, Dra. Gallardo, Q. Emma Mendoza, a los residentes de hematología, a don Juanito, don Ramón y Edwin, ya que sin su contribución y ayuda este trabajo carecería de muchas cosas.

A mis amigos, por haber hecho muy ameno este camino, Ricardo, Toño, Isabel, Rodrigo, Ramones, Daniela, Erick, Quetzalli, Juan, Gabriel, Adriana (super equipo hematólogo), Luis, Angie, gracias por todo.

DEDICATORIAS

Este trabajo quiero dedicárselo de manera muy especial a mi hermano Francisco Cerón Maldonado, porque es mi principal motivación para seguir caminando hacia adelante, te pido una disculpa por no ser el mejor ejemplo de lo que es un hermano mayor, pero quiero que sepas que siempre voy a estar para orientarte y apoyarte en todo lo que te propongas, el hecho de estar separados me ha hecho conocer que no se necesita estar físicamente junto a alguien para poder amarlo. Eres la persona que más amo en la vida, hermano. Siempre voy a estar para ti, nunca lo olvides.

A mis angelitos, mi abuelita Pachita, mi abuelita Esther, mi abuelito Vicente y a todos mis seres queridos que se adelantaron en el camino hacia la eternidad y que no van a estar físicamente para poder observar la conclusión de esta maravillosa etapa de mi vida, gracias por tanto.

A mi angelito más especial, mi primo Vicente Carlos Maldonado Faisal, porque fuiste un guerrero en la lucha contra estas malditas enfermedades que hicieron que no pudieras estar más tiempo con nosotros, te prometo que voy a poner todo mi empeño en la lucha contra de esas enfermedades, sé que alomejor no la podremos vencer, pero siempre podremos vengarnos.

A todos los pacientes que sufren de las enfermedades hematológicas, espero poder poner aunque sea un granito de arena para poderles brindar una mejor calidad de vida.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el número de proyecto 162269 y 80085 así como por la Dirección de Investigación del Hospital General de México con los números de registro DIC/09/04/03/131, DIC/08/204/04/017, DIC/12/204/05/01.

ÍNDICE

• ÍNDICE	I
• ÍNDICE DE FIGURAS	IV
• ÍNDICE DE TABLAS	V
• INDICE DE GRÁFICOS	VI
• ABREVIATURAS	VIII
• RESUMEN	IX
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Hematopoyesis	1
1.2. Leucemia	1
1.2.1. Etiología de las leucemias	2
1.2.2. Epidemiología de las leucemias	2
1.3. Leucemia aguda linfoblástica (LAL)	4
1.3.1. Clasificación de la leucemia aguda linfoblástica	4
1.3.1.1. Citomorfológica	4
1.3.1.2. Inmunológica	5
1.3.1.3. Organización mundial de la salud (OMS)	5
1.3.2. Diagnóstico de la leucemia aguda linfoblástica	6
1.3.3. Alteraciones citogenéticas en la leucemia aguda linfoblástica	6
1.3.3.1. t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL rompimiento menor	7
1.3.3.2. t(12;21)(p13;q22), TEL-AML1	8
1.3.3.3. t(1;19)(q23;p13.3), E2A-PBX1	9
1.3.3.4. t(4;11)(q21;q23). AF4-MLL1	10
1.3.4. Factores pronósticos en la leucemia aguda linfoblástica	11
1.3.5. Tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica	12
1.4. Leucemia aguda mieloblástica (LAM)	12
1.4.1. Clasificación de la leucemia aguda mieloblástica	13
1.4.1.1. Morfológica	13
1.4.1.2. Organización mundial de la salud (OMS)	14
1.4.2. Diagnóstico de la leucemia aguda mieloblástica	15
1.4.3. Alteraciones citogenéticas en la leucemia aguda mieloblástica	15
1.4.3.1. t(15;17)(q22;q21), PML-RAR α	15
1.4.3.2. t(8;21)q22;q22, AML1-ETO	17
1.4.4. Factores pronósticos en la leucemia aguda mieloblástica	18
1.4.5. Tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica	19
1.5. Leucemia mieloide crónica (LMC)	20
1.5.1. Clasificación de la leucemia mieloide crónica	20
1.5.2. Diagnóstico de la leucemia mieloide crónica	21
1.5.3. Alteraciones citogenéticas en la leucemia mieloide crónica	21
1.5.3.1. t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL rompimiento mayor	21

1.5.4. Factores pronósticos en la leucemia mieloide crónica	23
1.5.5. Tratamiento de la leucemia mieloide crónica	23
1.6. Multidrogorresistencia y genes ABC	24
1.6.1. Multidrogorresistencia y genes ABC en hematología	24
1.6.1.1. ABC-B1	25
1.6.1.2. ABC-G2	26
1.7. Antígenos testiculares de cáncer (ATC)	27
1.7.1. Expresión de los ATC en tejido normal	28
1.7.2. Regulación de la expresión de los ATC	29
1.7.3. Expresión de los ATC en cáncer	30
1.7.3.1. MAGE-A3	32
1.7.3.2. NY-ESO1	32
1.7.4. Implicación clínica de los ATC en hematología	33
1.7.5. Elección de panel de biomarcadores moleculares pronósticos en leucemia agudas y leucemia mieloide crónica	34
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVO	37
4.1. General	37
4.2. Particulares	37
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
5.1. Criterios de inclusión	38
5.2. Criterios de exclusión	38
5.3. Criterios de eliminación	38
5.4. Variables de estudio	39
5.4.1. Variables independientes	39
5.4.2. Variables dependientes	39
5.5. Metodología	40
5.5.1. Material biológico	40
5.5.1.1. Aspirado de Médula Ósea (MO) de pacientes con leucemia	40
5.5.1.2. Aspirado de MO normocelular	40
5.5.1.3. Sangre periférica (SP) de donadores sanos	40
5.5.1.4. Líneas celulares	40
5.5.2. Separación de leucocitos de MO de pacientes, normocelulares y donadores sanos.	40
5.5.3. Extracción de RNA total de leucocitos y líneas celulares	41
5.5.4. Determinación de la integridad y cuantificación de RNA	41
5.5.5. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	41
5.5.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain reaction) de biomarcadores	42
5.5.7. qRT-PCR para genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2	43

6. RESULTADOS	44
6.1. Análisis de la integridad del material genético	44
6.2. Expresión de genes de fusión, antígenos testiculares de cáncer (ATC) y genes de resistencia a drogas (ABC) en Médula Ósea (MO) normocelular y donadores sanos	46
6.3. Caracterización epidemiológica y clínico-patológica de pacientes con Leucemia Aguda Linfoide (LAL)	47
6.4. Frecuencia de la expresión de biomarcadores moleculares en pacientes con LAL	51
6.5. Determinación de los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAL por qRT-PCR	53
6.6. Caracterización epidemiológica y clínico-patológica de pacientes con Leucemia Aguda Mieloide (LAM)	57
6.7. Frecuencia de la expresión de biomarcadores moleculares en pacientes con LAM	61
6.8. Determinación de los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAM por qRT-PCR	62
6.9. Caracterización epidemiológica y clínico-patológica de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	65
6.10. Frecuencia de la expresión de biomarcadores moleculares en pacientes con LMC	70
6.11. Determinación de los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) por qRT-PCR	72
6.12. Caracterización epidemiológica y clínico-patológica de pacientes con LMC Subsecuente (SUB) al momento del diagnóstico	75
6.13. Seguimiento de los pacientes con LMC Subsecuentes (SUB)	78
6.14. Frecuencia de la expresión de biomarcadores moleculares en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB)	80
6.15. Determinación de los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) por qRT-PCR	81
7. DISCUSIÓN	85
8. CONCLUSIONES	91
9. PERSPECTIVAS	90
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
11. ANEXOS	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hematopoyesis	1
Figura 2. Morfología típica de leucemia aguda linfoblástica	5
Figura 3. Representación esquemática del transcrito BCR-ABL m	7
Figura 4. Representación esquemática de los transcritos TEL-AML1	8
Figura 5. Representación esquemática de los transcritos E2A-PBX1	9
Figura 6. Representación esquemática de los transcritos AF4-MLL1	10
Figura 7. Morfología típica de leucemia aguda mieloblástica	13
Figura 8. Representación esquemática de la t(15;17)	16
Figura 9. Representación esquemática de los transcritos PML-RAR α	16
Figura 10. Representación esquemática del mecanismo de inhibición transcripcional por PML-RAR α	16
Figura 11. Representación esquemática de la t(8;21)	17
Figura 12. Representación esquemática del transcrito AML1-ETO	17
Figura 13. Representación esquemática del mecanismo de inhibición transcripcional por AML1-ETO	18
Figura 14. Morfología típica de la LMC	20
Figura 15. Representación esquemática de la t(9;22)	22
Figura 16. Representación esquemática de los transcritos BCR-ABL M	22
Figura 17. Representación esquemática de la proteína ABC-B1	26
Figura 18. Representación esquemática de la proteína ABC-G2	27
Figura 19. ATC implicados en etapas del desarrollo embrionario y en tejido adulto	29
Figura 20. Perfiles de metilación/desmetilación de promotores de genes ATC en tejido normal y cáncer	30
Figura 21. ATC implicados en etapas del desarrollo carcinogénico	31
Figura 22. Determinación de la integridad de RNA	44
Figura 23. Amplificación de los genes constitutivos genes β -2-microglobulina y GAPDH	44
Figura 24. Controles de reacción	44
Figura 25. Controles positivos obtenidos a partir de la línea celular K562	45
Figura 26. Controles positivos de translocaciones en leucemias agudas.	45
Figura 27. Biomarcadores en individuos sanos	45
Figura 28. Determinación de biomarcadores en paciente con LAL	52
Figura 29. Determinación de biomarcadores en paciente con LMC	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de mortalidad según el tipo de tumor por grupos de edad en México	2
Tabla 2. Estimación de casos nuevos de leucemia en México en 2012 y 2015	3
Tabla 3. Estimación de defunciones por leucemia en México en 2012 y 2015	3
Tabla 4. Epidemiología de las neoplasias onco-hematológicas en el HGM (2000-2005)	3
Tabla 5. Muestras recibidas en el Laboratorio de Biología Molecular (2009 – 2013)	4
Tabla 6. Clasificación morfológica (FAB) de la LAL	4
Tabla 7. Clasificación OMS de la Leucemia Aguda Linfoblástica	6
Tabla 8. Factores de riesgo en la leucemia linfoblástica aguda	11
Tabla 9. Protocolo institucional del HGM para el tratamiento de LAL	12
Tabla 10. Clasificación morfológica (FAB) de la LAM	13
Tabla 11. Clasificación OMS de LAM	14
Tabla 12. Factores pronósticos característicos de LAL	19
Tabla 13. Clasificación OMS de los SMPC	20
Tabla 14. Criterios de remisión en LMC	23
Tabla 15. Correlación de la expresión de las proteínas ATC con parámetros clínico-patológicos	31
Tabla 16. Biomarcadores moleculares de impacto en leucemias agudas y leucemia mieloide crónica	34
Tabla 17. Definición de variables independientes de estudio	39
Tabla 18. Composición de los sistemas de PCR para biomarcadores	42
Tabla 19. Perfiles térmicos para amplificación de biomarcadores	42
Tabla 20. Características clínico-patológicas de los pacientes con LAL (n=23) del HGM	51
Tabla 21. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LAL (n=23)	53
Tabla 22. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) pacientes con (n=23)	56
Tabla 23. Características clínico-patológicas de los pacientes con LAM (n=17)	60
Tabla 24. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LAM (n=17)	62
Tabla 25. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAM (n=17)	64
Tabla 26. Detección de la translocación t (9;22) en pacientes con LMC por diversos métodos diagnósticos	67
Tabla 27. Características de laboratorio de los pacientes con LMC (n=23) del HGM	69
Tabla 28. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LMC (n=23)	71
Tabla 29. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC (n=23)	74
Tabla 30. Métodos de detección de la translocación t(9;22)(q34;q11) en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) (n=11)	77
Tabla 31. Características de clínico-patológicas de los pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) al diagnóstico (n=11)	78
Tabla 32. Características de laboratorio de los pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) al seguimiento (n=11)	79
Tabla 33. Evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) (n=11)	80
Tabla 34. Expresión de genes de fusión, ATCs y genes ABC en pacientes con LMC SUB (n=23)	81
Tabla 35. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC SUB (n=11)	84

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Determinación de los niveles de expresión de los genes ABC en donadores sanos	46
Gráfico 2. Determinación de cuartiles de los valores de expresión de genes ABC en donadores sanos	47
Gráfico 3. Lugares de procedencia de los pacientes con LAL (n=23)	47
Gráfico 4. Distribución de pacientes con LAL por rango de edades (n=23)	48
Gráfico 5. Antecedentes personales en pacientes con LAL (n=23)	48
Gráfico 6. Clasificación inmunológica de los pacientes con LAL (n=23)	49
Gráfico 7. Hemoglobina (g/dL) al diagnóstico en pacientes con LAL (n=23)	49
Gráfico 8. Plaquetas x 10 ³ /μL al diagnóstico de pacientes con LAL (n=23)	50
Gráfico 9. Organomegalias en pacientes con LAL (n=23)	50
Gráfico 10. Expresión de biomarcadores en pacientes con LAL (n=23)	52
Gráfico 11. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL (n=23)	54
Gráfico 12. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL. (n=23)	54
Gráfico 13. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL. (n=23)	53
Gráfico 14. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL. (n=23)	55
Gráfico 15. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAL (n=23)	56
Gráfico 16. Lugares de procedencia de los pacientes con LAM (n=17)	57
Gráfico 17. Distribución de pacientes con LAM por rango de edades (n=17)	57
Gráfico 18. Antecedentes personales en pacientes con LAM (n=17)	58
Gráfico 19. Clasificación FAB de los pacientes con LAM (n=17)	58
Gráfico 20. Valores de Hemoglobina (g/dL) al diagnóstico en pacientes con LAM (n=17)	59
Gráfico 21. Plaquetas x 10 ³ /μL al diagnóstico de pacientes con LAM (n=23)	59
Gráfico 22. Organomegalias halladas en pacientes con LAM (n=17)	60
Gráfico 23. Expresión de Biomarcadores en pacientes con LAM (n=17)	61
Gráfico 24. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)	62
Gráfico 25. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)	63
Gráfico 26. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)	63
Gráfico 27. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)	64
Gráfico 28. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAM (n=17)	65
Gráfico 29. Distribución de pacientes con LMC por rango de edad (n=23)	65
Gráfico 30. Lugares de procedencia de los pacientes con LMC (n=23)	66
Gráfico 31. Antecedentes personales en pacientes con LMC (n=23)	66
Gráfico 32. Determinación de la fase de enfermedad en pacientes con LMC (n=23)	66
Gráfico 33. Blastos presentes al diagnóstico en pacientes con LMC (n=23)	68
Gráfico 34. Organomegalias halladas en pacientes con LMC (n=23)	68
Gráfico 35. Estratificación de pacientes con LMC de acuerdo a la escala de riesgo Sokal (n=23)	69

Gráfico 36. Expresión de biomarcadores en pacientes con LMC (n=23)	70
Gráfico 37. Frecuencia de las isoformas del transcrito BCR-ABL M en pacientes con LMC (n=23)	71
Tabla 38. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC (n=23)	72
Gráfico 39. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC (n=23)	72
Gráfico 40. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC (n=23)	73
Gráfico 41. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC (n=23)	73
Gráfico 42. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC (n=23)	74
Gráfico 43. Distribución de pacientes con LMC SUB por rango de edades (n=11)	75
Gráfico 44. Año de diagnóstico de los pacientes con LMC SUB (n=11)	75
Gráfico 45. Lugares de procedencia de los pacientes con LMC SUB (n=11)	76
Gráfico 46. Antecedentes personales en pacientes con LMC SUB (n=11)	76
Gráfico 47. Expresión de biomarcadores en pacientes con LMC SUB (n=11)	80
Gráfico 48. Frecuencia de las isoformas del transcrito BCR-ABL M en pacientes con LMC SUB (n=11)	81
Gráfico 49. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC SUB (n=11)	82
Gráfico 50. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) y pacientes LMC SUB (n=11)	82
Gráfico 51. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC SUB (n=11)	83
Gráfico 52. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) y pacientes LMC SUB (n=11)	83
Gráfico 53. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) (n=23)	84

ABREVIATURAS

ABC	ATP – Binding Cassette
APL	Leucemia Promielocítica Aguda
ATC	Antígenos Testiculares de Cáncer
ATP	Adenosín Trifosfato
ATRA	Ácido <i>trans</i> -retinoico
B-2-M	β-2-microglobulina
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CBF	Core Binding Factor
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CrPh+	Cromosoma Philadelphia positivo
DHL	Deshidrogenasa Láctica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metil transferasa
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
FAB	Grupo de investigadores Franco-Americano-Británico
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
HDAC	Histonas Desacetilasas
HGM	Hospital General de México
HTLV1	Virus linfotrópico humano tipo 1
INFα	Interferón α
LAL	Leucemia Aguda Linfoblástica
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
LDCGB	Linfoma de células grandes B
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MDR	Multidrogresistencia (Anexo 1)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MM	Mieloma Múltiple
MO	Médula ósea
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
P-gp	Glucoproteína – permeable
qRT-PCR	Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RC	Remisión completa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa
SFB	Suero Fetal Bovino
SMPC	Síndrome Mieloproliferativo Crónico
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sangre periférica
SUB	Subsecuentes

RESUMEN

Los marcadores moleculares en leucemias son fundamentales para el diagnóstico, el establecimiento de factores pronósticos y la determinación del tratamiento adecuado para los pacientes; por tanto es obligado incluir los estudios de biología molecular, para que aunado a los de citomorfología e inmunofenotipo, conformen el diagnóstico diferencial de estas neoplasias. Es de gran importancia implementar un panel de marcadores moleculares que permita detectar oncogenes derivados de translocaciones cromosómicas, genes derivados de cambios epigenéticos y de genes de resistencia a drogas.

Se estandarizó un panel de marcadores moleculares que incluyeron 11 genes derivados de translocaciones cromosómicas BCR-ABL rompimiento mayor y menor, E2A-PBX1, AF4-MLL, TEL-AML1, PML-RAR α , AML1-ETO; los antígenos testiculares de cáncer (ATC) derivados de cambios epigenéticos NY-ESO1 y MAGE-A3 y genes de multidrogoresistencia ABC-B1 y ABC-G2. Se incluyeron 74 pacientes con diagnóstico de leucemia del Hospital General de México (23 con LAL, 17 con LAM, 23 con LMC y 11 con LMC Subsecuentes); se utilizaron leucocitos totales de médula ósea, a los cuales se les extrajo RNA para la posterior síntesis de cDNA y RT-PCR para cada uno de los marcadores, así como qRT-PCR para los genes de resistencia multidrogas. En leucemia aguda linfoblástica (LAL) se expresaron los biomarcadores BCR-ABL m en 17.4% (4/23); E2A-PBX1 4.3% (1/23); TEL-AML1 4.3% (1/23), ABC-B1 sobreexpresado en 21.7% (5/23), ABC-B1 normal en 39.1% (9/23); y ABC-G2 sobreexpresado en 4.3% (1/23), y de manera normal en 39.1% (9/23). Los pacientes con leucemia aguda mieloblástica (LAM) expresaron PML-RAR α 29.4%(5/17); ABC-B1 sobreexpresado en 23.5% (4/17), normal en 23.5% (4/17); y ABC-G2 normal en 35.3% (6/17). En leucemia mieloide crónica se encontró BCR ABL M en el 100% (23/23), ABC-B1 sobreexpresado en 13% (3/23), normal en 13% (3/23); y ABC-G2 sobreexpresado en 8.7% (2/23), y normal en 39.1% (9/23). Finalmente en pacientes con LMC subsecuentes (SUB), se halló expresión de BCR-ABL M en 27.3% (3/11), ABC-B1 sobreexpresado en 27.3% (3/11) y normal en 36.4% (4/11); y ABC-G2 normal en 36.4% (4/11).

La presencia de los transcritos de los genes quiméricos BCR-ABL menor, E2A-PBX1 y TEL-AML1 en LAL; PML-RAR α en LAM; y BCR-ABL mayor en LMC *de novo* y subsecuente; así como de los genes de resistencia multidrogas ABC-B1 y ABC-G2, confirman la importancia del panel de marcadores moleculares en el fortalecimiento del diagnóstico, pronóstico, de la determinación de blancos específicos para la terapia y en el seguimiento de dichos padecimientos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 HEMATOPOYESIS

La producción de las células sanguíneas o hematopoyesis es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea (MO), en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras^{1,2}.

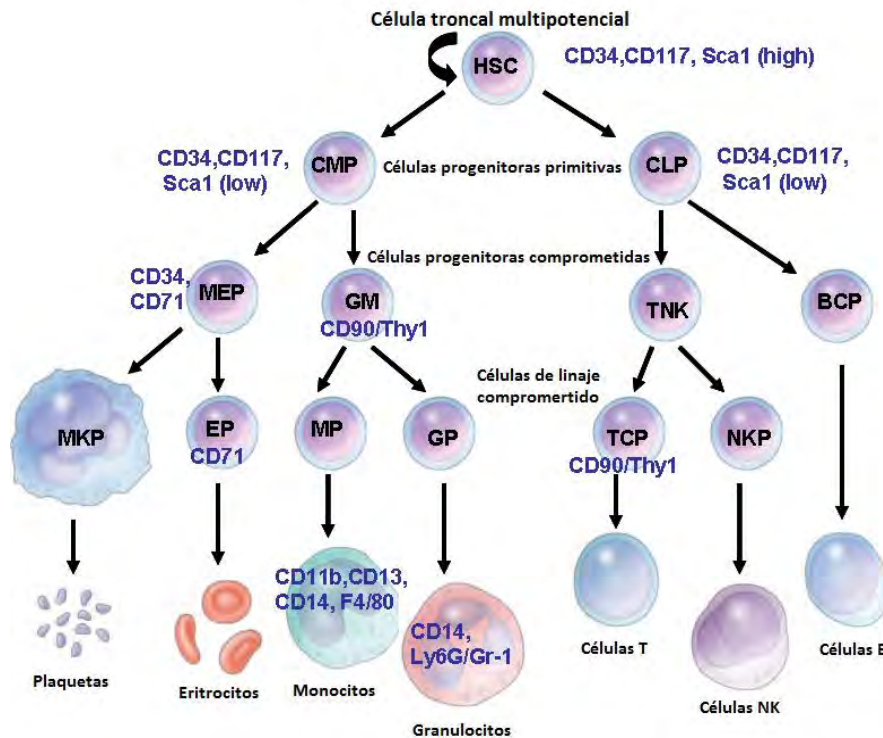


Figura 1. Hematopoyesis. Tomada de Bhullar; 2007.

Alteraciones en la hematopoyesis pueden conducir a situaciones de producción deficiente y/o sobreproducción de células hematopoyéticas, como las leucemias¹.

1.2 LEUCEMIA

Las leucemias son neoplasias de las células hematopoyéticas que proliferan en la MO y se diseminan a la sangre periférica (SP) e incluso a otros tejidos. Estas células muestran defectos de maduración y su acumulación en la MO determina un frenado de la hematopoyesis normal, a la que acaban sustituyendo, llegando a ser inmaduros la mayor parte de los elementos sanguíneos³.

A su vez, estas patologías son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control de las células neoplásicas se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a la sobreproducción de células incapaces de madurar y funcionar normalmente. Las células leucémicas maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular es prolongado y la mayoría de dichas células sobrevive más que las normales, sin cumplir con su misión ordinaria⁴.

1.2.1 Etiología de las leucemias

Las leucemias son originadas por cambios tanto genéticos como epigenéticos^{5,6,7}. Las alteraciones genéticas dan como resultado una desregulación de los perfiles de expresión génica, dando lugar a la alteración de vías de señalización que controlan la proliferación y las funciones celulares⁴. En adición a las mutaciones del DNA y a las aberraciones cromosómicas; se han evidenciado que mecanismos epigenéticos como metilación de DNA o acetilación de histonas, tienen fuerte impacto en el mecanismo leucemogénico⁶. A su vez, se han descrito diversos factores químicos, físicos y biológicos implicados en estas alteraciones y por tanto causantes de leucemogénesis³; tales como la exposición a benceno⁸, administración de quimioterapia como tratamiento de otras neoplasias⁹, radiaciones ionizantes¹⁰, exposición a UV¹¹, infecciones por virus de Epstein Barr¹² y HTLV1¹³; así como alteraciones genéticas como la presente en síndrome de Down¹⁴ y otras enfermedades hematológicas como síndromes mielodisplásicos¹⁵.

1.2.2 Epidemiología de las leucemias

La leucemia es la segunda enfermedad hematológica más frecuente en el mundo, solo después del linfoma de Hodgkin; ocupa el lugar 11 entre las neoplasias de mayor incidencia a nivel mundial y representa un 3.09% del total de los casos de cáncer¹⁶.

En México, en el año 2008 la leucemia fue el cáncer más frecuente en con un 15.1% del total de los tumores malignos; teniendo la tasa de mortalidad más alta en pacientes del grupo de edad de 0 a 29 años¹⁶.

Tabla 1. Tasa de mortalidad según el tipo de tumor por grupos de edad en México.
Tomado de SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD; 2011.

Tipo de tumor maligno	Grupos de edad (años)			
	0-14	15-29	30-59	>60
Estómago	0.01	0.29	4.56	42.3
Colon, recto y ano	0.01	0.29	3.44	30.08
Hígado y vías biliares	0.14	0.14	2.87	44.11
Traque, bronquios, pulmón	0.01	0.19	3.58	60.19
Leucemia	2.55	2.49	2.93	13.23
Linfoma no Hodgkin	0.29	0.58	1.92	13.31
Cáncer de mama	0.01	0.18	7.24	23.61
Cuello del útero	0.00	0.35	10.24	41.82
Ovario	0.05	0.31	4.03	17.98
Próstata	0.00	0.01	1.47	121.57

*Por cada 100,000 habitantes

Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, en el año 2012 en México surgieron 6325 casos nuevos de leucemia. Las predicciones para el 2015 estiman que habrá un incremento de un 8.4% comparado con el año 2012¹⁷.

Tabla 2. Estimación de casos nuevos de leucemia en México en 2012 y 2015. Tomado de Globocan; 2012.

Año	Número estimado de nuevos casos (todas las edades)	Masculino	Femenino	Ambos sexos
2012		3363	2962	6325
	Edad < 65 años	2765	2447	5212
	Edad > 65 años	598	515	1113
2015		3566	3291	6857
	Edad < 65 años	2925	2704	5629
	Edad > 65 años	641	587	1228

En cuanto a la mortalidad, en 2012 se calculó que aproximadamente 67% del total de los casos de leucemia fallecieron; para 2015 se estima que habrá un total de 4640 muertes¹⁷.

Tabla 3. Estimación de defunciones por leucemia en México en 2012 y 2015. Tomado de Globocan; 2012.

Año	Número estimado de defunciones (todas las edades)	Masculino	Femenino	Ambos sexos
2012		2280	1984	4264
	Edad < 65 años	1649	1438	3087
	Edad > 65 años	631	546	1177
2015		2425	2215	4640
	Edad < 65 años	1748	1597	3345
	Edad > 65 años	677	618	1295

En el Servicio de Hematología del Hospital General de México (HGM) se diagnosticaron 1890 casos de enfermedades onco-hematológicas del año 2000 a 2005¹⁸.

Tabla 4. Epidemiología de las neoplasias onco-hematológicas en el HGM (2000-2005).

Tomada de Berríos, 2006.

		2000	2001	2002	2003	2004	2005	Total
Todas		291	289	213	374	313	410	1890
Leucemias agudas	LAL	58	53	61	94	82	87	435
	LAM	36	52	28	51	58	63	289
	LMC	27	25	15	39	24	19	149
Leucemias crónicas	LLC	5	5	1	7	4	3	25
	LCP	0	0	1	0	1	1	3
Linfomas	LNH	104	96	57	105	82	161	605
	LH	20	15	19	26	13	31	124
Mieloma múltiple		29	32	14	21	26	25	146
SMD		13	13	18	24	26	20	114

Se tuvieron un total de 901 casos nuevos de leucemia en el periodo del año 2000 a 2005; en donde se observó que la leucemia más frecuente fue la leucemia aguda linfoblástica (LAL) con 435 casos y un promedio de 72 pacientes por año; seguida de la leucemia aguda mieloblástica (LAM) con 289 casos y promedio de 48 pacientes por año; la leucemia mieloide crónica (LMC) contó con 149 casos y una media de 22 pacientes por año; y el resto de los casos correspondieron a 25 casos de leucemia linfocítica crónica y 3 casos de tricoleucemia¹⁸.

En el laboratorio de biología molecular, en el periodo comprendido del año 2009 a 2013 se recibieron un total de 468 muestras de LAL, 134 de LAM y 281 de LMC (*de novo*), dando un total de 883 muestras en dicho lapso de tiempo. Determinando que la leucemia que más se envía para el estudio molecular es la aguda linfoblástica, seguida de la mieloide crónica y por último la LAM.

Tabla 5. Muestras recibidas en el laboratorio de biología molecular del HGM (2009 – 2013).

	2009	2010	2011	2012	2013	Total
LAL	66	77	122	104	99	468
LAM	51	41	22	14	6	134
LMC	56	44	61	61	59	281
Total	173	162	205	179	164	883

1.3 LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA (LAL)

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una neoplasia maligna que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células linfoides inmaduras. Su expresión clínica es variable, ya que se reconocen subtipos de acuerdo a sus características clínicas, biológicas, moleculares y pronósticas. A nivel mundial tiene una incidencia entre 4-5 casos por 100,000 habitantes entre los 2 y 4 años de edad, disminuye durante la adolescencia y adultez, para hacer un pico después de los 50 años¹⁹, dato distinto a lo presentado en el HGM, en donde la edad media al diagnóstico es de 38 años de edad.

1.3.1 Clasificación de la leucemia aguda linfoblástica

1.3.1.1 Citomorfológica

De acuerdo a la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB), morfológicamente la LAL presenta tres variantes: L-1, L-2 y L-3. La diferencia entre un grupo y otro se basa en el tamaño, el grado de maduración del núcleo y la presencia de nucléolos y vacuolas²⁰.

Tabla 6. Clasificación morfológica (FAB) de la LAL. Tomada de Bennett, et al; 1976.

Leucemia aguda linfoblástica (LAL)
LAL- L1: linfoblástica “típica”
LAL-L2: linfoblástica “atípica”
LAL-L3: parecida al linfoma de Burkitt

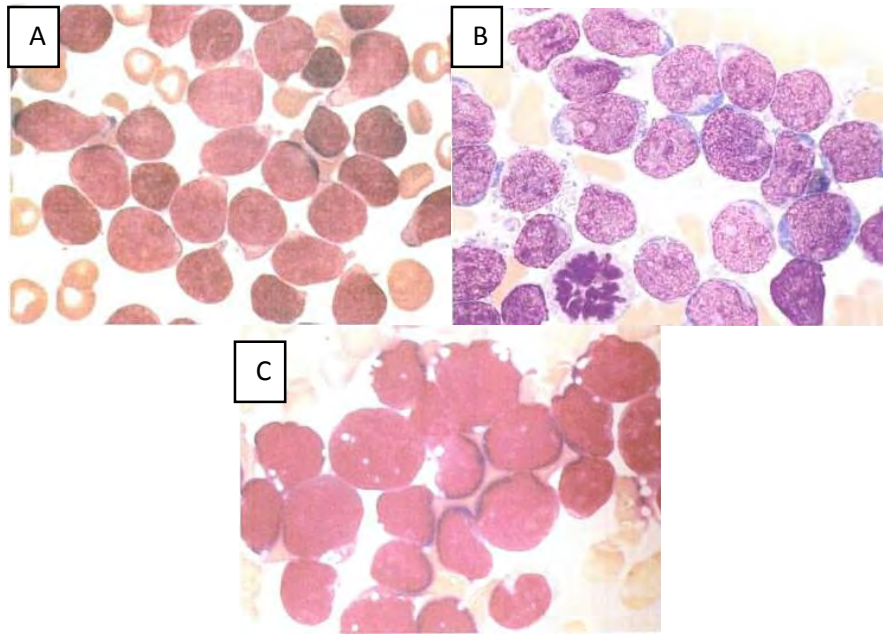


Figura 2. Morfología típica de leucemia aguda linfoblástica. A) Leucemia aguda linfoblástica-L1; B) Leucemia aguda linfoblástica-L2; C) Leucemia aguda linfoblástica-L3. Tomada de Ruíz, 1994.

1.3.1.2 Inmunológica

En términos inmunológicos se reconocen subgrupos de LAL, basadas fundamentalmente en la presencia de marcadores de superficie de linaje B o T y de acuerdo al grado de maduración de las células leucémicas²¹.

LAL de linaje B

- Pro-B HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD22+.
- Pre-B común (CALLA) HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD22+, CD10+.
- Pre-B HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD22+, CD10+, cIgM+.
- B madura HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD22+, CD10+, cIgM', mIgM+.

LAL de linaje T

- T-Temprana: cCD3+, CD7+, CD5+.
- T-Cortical: CD5+, CD2+, CD3+, CD1+.
- T-Madura: cCD3+, CD5+, CD2+, CD3+.

1.3.1.3 Organización mundial de la salud (OMS)

La clasificación más actual es la proporcionada por la OMS, en donde, a parte de tomar en cuenta la clasificación morfológica, ha incorporado anomalías citogenéticas, las cuales permiten pronosticar la respuesta al tratamiento y elegir con mayor certeza los fármacos que deben prescribirse en cada caso²²; sin embargo, en México la mayoría de los diagnósticos y las elecciones del tratamiento se basan en el criterio morfológico solamente.

Tabla 7. Clasificación OMS de la leucemia aguda linfoblástica. Tomada de Vardiman, et al; 2009.

<p>1) LAL de células precursoras-B</p> <p>Anormalidades citogenéticas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. t(9;22)(q34,q11), BCR/ABL 2. t(v;11q23); re-arreglos de MLL 3. t(1;19)(q23;p13); E2A/PBX1 4. t(12;21)(p13;q22); TEL/AML1 5. Hipodiploidías 6. Hiperdiploidías, >50 cromosomas
<p>2) LAL de células precursoras-T</p>
<p>3) LAL de células B-maduras/ linfoma de Burkitt</p>

1.3.2 Diagnóstico de la leucemia aguda linfoblástica

Para realizar el diagnóstico de estas neoplasias, es necesaria la integración de los aspectos clínicos con los datos de laboratorio como biometría hemática, análisis citomorfológico de MO, inmunofenotipo y biología molecular para conformar el diagnóstico diferencial de estas entidades²³.

Se suele sospechar de la presencia de una LAL por la evidencia clínica de signos y síntomas como dolor óseo, síndrome anémico (palidez, taquicardia, astenia, fatiga), organomegalias (hepatoesplenomegalia); en conjunto con una biometría hemática que evidencia pancitopenia, bicitopenia, o leucocitosis, y blastos de linaje linfoide; así como anemia y trombocitopenia. El estudio de MO es necesario para la determinación de la clasificación morfológica y requiere un mínimo de 20% de linfoblastos para establecer el probable diagnóstico¹⁹.

Un aspecto importante es la clasificación con marcadores inmunológicos, citogenéticos y moleculares; con los cuales se logra caracterizar la naturaleza de la clona leucémica, determinando el origen de la célula afectada (B o T), así como su grado de maduración, mediante el inmunofenotipo²⁴.

El diagnóstico es complementado con la realización de pruebas genéticas y moleculares para la detección de marcadores que estratifiquen al paciente en un grupo de riesgo y que permitan la elección del tratamiento ideal. Con dichas pruebas se puede determinar también el pronóstico, y el seguimiento del paciente²⁵. En los países en vías de desarrollo como México, estos estudios no están al alcance de todos los centros de salud pública.

1.3.3 Alteraciones citogenéticas en la leucemia aguda linfoblástica

Los pacientes con LAL pueden presentar anomalías citogenéticas tanto numéricas como estructurales, pudiendo encontrar casos con hipodiploidía (<46 cromosomas), hiperdiploidía (>46 cromosomas), trisomías, tetraploidías y translocaciones balanceadas²⁶.

De acuerdo a la OMS, las alteraciones estructurales más frecuentes en los pacientes con LAL son las translocaciones t(9;22)(q34;q11) (BCR-ABL); t(12;21)(p12;q22) (TEL-AML1); t(1;19) (E2A-PBX1); y los re-arreglos en el gen MLL (mixed lineage Leukemia) como la t(4;11)(q21;q23)²².

1.3.3.1 t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL rompimiento menor

La translocación cromosómica (9;22) o Cromosoma Philadelphia (CrPh+) se presenta en 25 al 30% de los pacientes adultos con LAL, esta translocación es el producto del intercambio de material genético entre los brazos largos del cromosoma 9 región q34 (gen ABL) y del cromosoma 22 región q11 (BCR). A través de la translocación (9;22) se pueden formar varias proteínas quiméricas, dependiendo del punto de rompimiento que se encuentre involucrado. En las leucemias agudas linfoblásticas CrPh+ el punto de ruptura del cromosoma 22 se encuentra en una región de 10.8 Kb denominada punto de ruptura menor (BCR-ABL m)²⁷.

El resultado de la transcripción de este gen quimérico BCR-ABL m es un mRNA que en más del 95% de los casos de LAL CrPh+ tiene como sitio de unión al exón 1 del gen BCR y al exón 2 del gen ABL, que tiene por nombre "e1a2"²⁷.

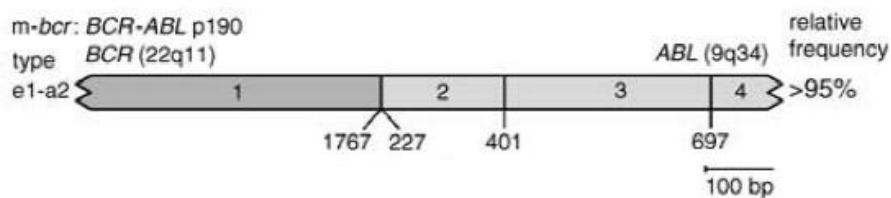


Figura 3. Representación esquemática del transcrito BCR-ABL m. Tomada de Gabert, et al; 2003.

Este transcrito codifica para una proteína tirosin cinasa activa de 190 KDa, llamada p190^{BCR-ABL} que posee actividad considerablemente aumentada con respecto a la tirosin cinasa fisiológica codificada por el gen ABL de 145 KDa; esta proteína quimérica es capaz de estimular de manera anormal la proliferación celular²⁸.

La proteína 190 BCR-ABL es fundamental para la expansión de la clona leucémica; así como para el desarrollo de la enfermedad. Esta proteína tiene la capacidad de activar diversas rutas de señalización celular implicadas en el ciclo celular y en proliferación, como RAS; así también modifica las propiedades de adhesión de las células leucémicas de la MO, lo que conlleva a que estas sean liberadas a la circulación sanguínea²⁸.

La t(9;22) es identificable mediante estudios citogenéticos convencionales hasta en un 95% de los casos positivos, sin embargo, los casos en los que el cariotipo no es suficiente para la detección, requiere del empleo de técnicas de biología molecular más sensibles y específicas como PCR para la detección de la translocación, o RT-PCR para la detección del transcrito quimérico²⁹.

La detección de la translocación (9;22) es de suma importancia para la determinación de factores pronósticos; así como para el conocimiento de la biología de la clona leucémica afectada, permitiendo diseñar una estrategia terapéutica específica para el tratamiento de esta clase de LAL, usando inhibidores de la proteína quimérica p190^{BCR-ABL}, como Imatinib; y que el éxito terapéutico se refleje en mayores tasas de remisión y de supervivencia global de los pacientes³⁰.

1.3.3.2 t(12;21)(p13;q22), TEL-AML1

La translocación cromosómica t(12;21)(p13;q22), es la anomalía cromosómica estructural más común en leucemias pediátricas, encontrándose en aproximadamente 25% de los casos de leucemia aguda linfoblástica pre-B, se encuentra presente en considerablemente menor proporción en los casos de LAL del adulto (3%)²⁷.

Dicha translocación es el producto del intercambio de material genético entre el brazo corto del cromosoma 12 región p13 (gen TEL) y el brazo largo del cromosoma 21 región q22 (gen AML1). Los sitios de punto de corte para que se lleva a cabo dicha translocación, se encuentran localizados a lo largo del intrón 5 del gen TEL y en el intrón 1 del gen AML1³¹.

El resultado de la transcripción de este gen de fusión TEL-AML1 es un mRNA que dependiente del "splicing", puede formar transcritos que comprendan la región del exón 5 de TEL y los exones 2 o 3 de AML1²⁷.

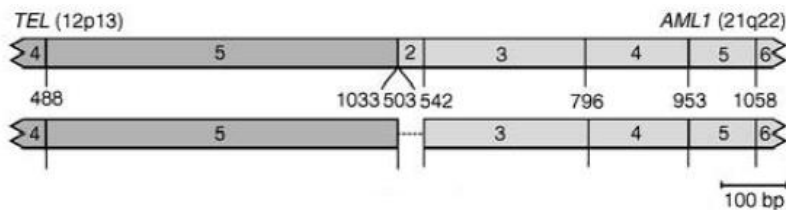


Figura 4. Representación esquemática de los transcritos TEL-AML1. Tomada de Gabert, et al; 2003.

El gen TEL o ETV6 codifica para un factor de transcripción de la familia ETS; el cual contiene dos dominios funcionales, el dominio del extremo amino-terminal que está involucrado en la interacción proteína-proteína consigo mismo y otras proteínas, y el dominio carboxilo-terminal que tiene la función de unión al DNA³¹.

El gen AML1 o RUNX1, codifica para la subunidad *alfa* del Core binding factor (CBF), que es un factor de transcripción que une a diversos elementos del "core" con sus respectivos promotores, los cuales se encuentran involucrados en el desarrollo hematopoyético³¹.

AML1 puede funcionar como represor transcripcional debido a su unión con co-represores, descontrolando la expresión de genes mediado por histonas desacetilasas (HDAC)³¹.

La proteína de fusión TEL-AML1 también llamada ETV6-RUNX1, generalmente reprime la actividad de genes específicos requeridos para la hematopoyesis y es antagonista de la activación de genes dependientes de AML1³¹.

Se ha demostrado que la actividad transcripcional de TEL-AML1 implica el reclutamiento del complejo co-represor del receptor nuclear (N-Cor)/HDAC que se une a TEL. La dimerización y oligomerización de AML1-RUNX1 favorecido por el extremo amino-terminal de TEL podrían permitir una mayor afinidad en la unión de AML1 a múltiples sitios de DNA, antagonizando de esta manera la acción normal de AML1, mediante su represión constitutiva³¹.

La $t(12;21)(p13;q22)$ no es identificable mediante las técnicas convencionales de cariotipo, es decir, su detección es por FISH o por biología molecular mediante PCR para la detección de la translocación, o RT-PCR para la detección del transcrito quimérico³¹.

La importancia de la detección de la $t(12;21)(p13;q22)$ radica en la determinación de factores pronósticos, especialmente en las LAL de la infancia, que determina buen pronóstico reflejado en altas tasas de remisión y sobrevida global prolongada; así también en la elección del tratamiento es importante^{31,32}.

1.3.3.3 $t(1;19)(q23;p13.3)$, E2A-PBX1.

La translocación cromosómica $t(1;19)(q23;p13.3)$, se encuentra presente en 2 a 3% de los pacientes adultos con LAL, y en 25% del total de los casos de LAL con fenotipo pre-B; dicha translocación es producto del intercambio de la fracción cromosómica del brazo largo del cromosoma 1 región q23 (gen E2A) y la fracción del brazo corto del cromosoma 19 región q11 (gen PBX1)²⁷.

El transcrito del gen E2A-PBX1 está conformado por la unión del exón 13 del gen E2A y el exón 2 de PBX1, pudiendo encontrar dos variantes que difieren en una secuencia de 27 pb una de otra. Este mRNA tiene como producto a la proteína quimérica E2A-PBX1, la cual combina los dominios de transactivación de E2A con la región del dominio de unión a DNA de la proteína PBX1²⁷.

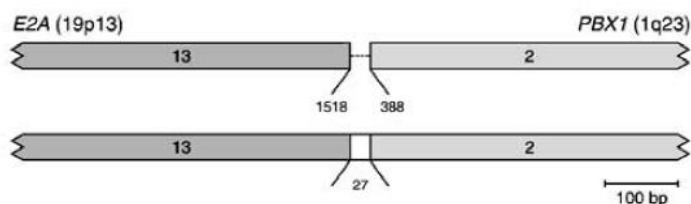


Figura 5. Representación esquemática de los transcritos E2A-PBX1. Tomada de Gabert, et al; 2003.

El gen E2A codifica para miembros de la familia de proteínas E (clase I) de los factores de transcripción “basic hélix-loop-helix” (bHLH). Las proteínas E son un familia de factores de transcripción implicados en procesos de desarrollo de células linaje-especifico, cuyo rol ha sido particularmente caracterizado en linfopoyesis. Estos miembros contienen un dominio bHLH responsable de la unión a secuencias específicas de DNA; así como también contienen dos dominios AD1 y AD2, que pueden funcionar independientemente o cooperativamente para la regulación de la transcripción de genes específicos como CREB, c-Myb y p53, mediante el reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales indispensable para la diferenciación de los progenitores linfoides-B a través de la activación de múltiples genes, entre los que destacan EBF³³.

La proteína quimérica E2A-PBX1, incluye la región amino-terminal de E2A que contiene a los dominios AD1 y AD2, fusionada con la mayor parte de la proteína PBX1, que incluye la región carboxilo-terminal que funge como dominio de unión a DNA³³.

Los mecanismos moleculares exactos por los cuales E2A-PBX1 contribuyen a la leucemogénesis son desconocidos aún; aunque la literatura propone como posible mecanismo, el reclutamiento de co-reguladores de transcripción para genes blanco, que se

unen directamente a los dominios de E2A-PBX1, concretamente al dominio AD1, que interactúa con complejos de histona acetilasa como CBP/300, dicha interacción es requerida para la immortalización de la célula iniciadora de leucemia, mediando de esta manera la oncogénesis³³.

Se puede hallar la presencia de la t(1;19)(q23;p13.3), mediante técnicas citogenéticas y de biología molecular; y su determinación coloca al paciente en un grupo de riesgo estándar²⁵.

1.3.3.4 t(4;11)(q21;q23) AF4-MLL1

Translocaciones que involucran el gen “mixed lineage Leukemia” (MLL) del cromosoma 11 se encuentra en diversas patologías hematológicas, como LAM, LAL-preB, LAL de linaje T y síndromes mielodisplásicos. Los re-arreglos del gen MLL se pueden presentar en la mayoría de las leucemias infantiles y en leucemias secundarias al tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa³⁴.

Los pacientes diagnosticados con LAL acompañada de un re-arreglo en MLL tienen una respuesta pobre al tratamiento con los regímenes de quimioterapia convencionales y tienen un pronóstico desfavorable con una supervivencia global menor del 50%³⁴.

El mecanismo fisiopatológico mediante el cual las translocaciones en MLL causan leucemia no están caracterizados por completo. Perfiles de expresión génica en LAL y LAM con re-arreglos en MLL demuestran un patrón de expresión de genes característico, probablemente guiado por programas de metilación de histonas³⁴.

Más de 70 genes han sido identificados como participantes en translocaciones con MLL en leucemia, sin embargo, el más comúnmente encontrado es en combinación con AF4; dando lugar a la t(4;11)(q21;q23), la cual se presenta en 3 a 7% de los casos de LAL del adulto. La transcripción del gen quimérico AF4-MLL puede dar origen a 6 variedades de transcritos del gen³⁴.

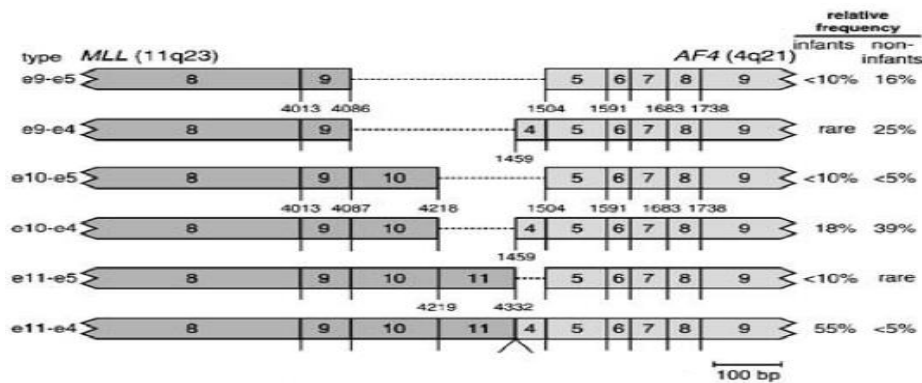


Figura 6. Representación esquemática de los transcritos AF4-MLL1. Tomada de Gabert, et al; 2003.

Las proteínas resultantes de la fusión de MLL fuerzan la sobreexpresión de HOXA9 y MEIS1. La sobreexpresión de genes HOX como HOXA9 y el cofactor de HOX “MEIS1” han sido hallados en hematopatologías como LAL y LAM. HOXA9 y MEIS1 son expresados normalmente en linajes hematopoyéticos tempranos, se hallan en niveles indetectables durante el estadio de

diferenciación; por lo tanto, la sobreexpresión de HOXA9 en LAL induce la expansión de las células neoplásicas y esto está asociado con un mal pronóstico en esta patología³⁵.

Se puede hallar la presencia de la t(4;11)(q21;q23) mediante técnicas citogenéticas y de biología molecular; y su determinación coloca al paciente en un grupo de riesgo elevado debido a la alta tasa de recaídas que presentan los pacientes con la identificación de esta translocación al diagnóstico³⁴

1.3.4 Factores pronósticos en la leucemia aguda linfoblástica

La estimación del grupo de riesgo está fundamentada en datos clínico-patológicos como edad, el número de leucocitos al diagnóstico, marcadores de superficie de la clona leucémica y de los hallazgos citogenéticos y moleculares²¹.

Para las LAL, los casos de mejor pronóstico son aquellos de pacientes jóvenes, sin organomegalias ni infiltración al SNC, con hiperdiploidía, trisomía 4, 10, 17 o 21 y la translocación 12;21 (TEL-AML1), con subtipo pre-B. Los pacientes que carecen de alguno de los datos anteriores deben considerarse de riesgo alto, en especial si se detecta leucocitosis mayor a 30,000 células/ μ L, lo que aumenta la probabilidad de sufrir síndrome de lisis tumoral post quimioterapia; al igual que sí se identifican hipodiploidías o las translocaciones 9;22 (BCR-ABL) o reordenamientos del gen MLL, acrecentando la posibilidad de recaídas tempranas²¹.

Tabla 8. Factores de riesgo en la leucemia linfoblástica aguda. Tomada y modificada de Jaime et al; 2012.

Factor de riesgo	Pronóstico favorable	Pronóstico desfavorable
Edad	< 50 años	> 50 años
Hepatoesplenomegalia	Ausente	Masiva
Leucocitos al diagnóstico	<30,000	>30,000
Tipo morfológico FAB	L1	L2
Respuesta a la inducción a la semana 4	Sin blastos periféricos	Con blastos periféricos
Estado del SNC	Sin infiltración	Infiltración
Citogenética	Hiperdiploidía, trisomías 4, 10, 21	Hipodiploidía, t(9;22), t(4;11)
Genética molecular	TEL/AML1, E2A-PBX1 (riesgo estándar)	BCR-ABL, Reordenamiento del gen MLL
Inmunofenotipo	Precursor de células B	Precursor de células T, LLA de células B maduras

Otro factor pronóstico es la velocidad de respuesta al tratamiento; si se integra una respuesta completa a las 4 semanas, se considera un dato más de buen pronóstico; por el contrario, la falta de respuesta implica mal pronóstico²¹.

1.3.5 Tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica

En general, el tratamiento de la LAL se divide en cuatro etapas: la inducción a la remisión, profilaxis del sistema nervioso central (SNC), intensificación pos-inducción y mantenimiento de erradicación. En condiciones óptimas, la curación puede lograrse en 80% de los niños y hasta en 40% de los adultos³⁶.

En el Hospital General de México, se tiene un protocolo de tratamiento llamado “HGMLAL07”, que cuenta con un pre-tratamiento con esteroides, seguido del esquema de inducción a la remisión con vincristina, esteroides y antraciclinas; consolidación con metotrexato, y mantenimiento por dos años con esteroides y vincristina; la profilaxis al SNC se realiza con quimioterapia intratecal durante la inducción, y metotrexato en la consolidación³⁶.

Tabla 9. Protocolo institucional del HGM para el tratamiento de LAL. Tomada de Ramos, et al; 2011.

Esquema HGMLAL07	Dosis	Vía de administración	Días de administración
Inducción a la remisión (Fase I)			
Daunorrubicina	60 mg/ m2	IV	1 , 8 , 15
Vincristina	1,5 mg/m2	IV	1, 8 , 15, 22
Prednisona	60 mg/m2	IV	1-28
Citarabina	40 mg	IT	1, 8, 15 , 22
Dexametasona	8 mg	IT	1, 8 , 15, 22
Metotrexato	15 mg	IT	1, 8, 15 ,22
Inducción a la remisión (Fase II)			
Ciclofosfamida	650 mg/m2	IV	1 , 8
Citarabina	65 mg/m2	IV	1-4 , 8-11
6- mercaptopurina	50 mg/m2	VO	1-15
Consolidación I			
Metotrexato	1,5 gr/m2	IM, IT	1 , 15 , 45
Intensificación			
Doxorrubicina	30 mg/m2	IV	1 , 8, 15
Vincristina	1,5 mg/m2	IV	1 , 8, 15 , 22
Prednisona	60 mg/m2	VO	1-28
Consolidación II			
Etopósido	100 mg/m2	IV	1-5, 28-32
Citarabina	75 mg/m2	IV	1-5, 28-32
Mantenimiento (2 años)			
6-mercaptopurina	50 mg/m2	VO	Lunes- viernes
Metotrexato	50 mg	IM	Semanal

*IV= Intravenoso, *IM= Intramuscular, *IT= Intratecal, *VO= Vía oral

1.4 LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA (LAM)

La leucemia aguda mieloblástica (LAM) es un grupo heterogéneo de leucemias que proceden de las líneas precursoras de las células mieloides, eritroides, megacariocíticas y monocíticas. Estas resultan de la transformación clonal de precursores hematopoyéticos, a través de la arreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas; las cuales proveen a la clona neoplásica ventajas de proliferación y supervivencia sobre las células hematopoyéticas normales, lo que conduce a la inhibición y sustitución de la hematopoyesis normal³⁷.

Esta leucemia representa 80% de los casos de leucemia aguda en los adultos y de 15 a 20% de las diagnosticadas en niños. En otros casos se presenta como complicación en individuos que sufren mielodisplasia. La mediana de la edad al diagnóstico es de 68 años²¹.

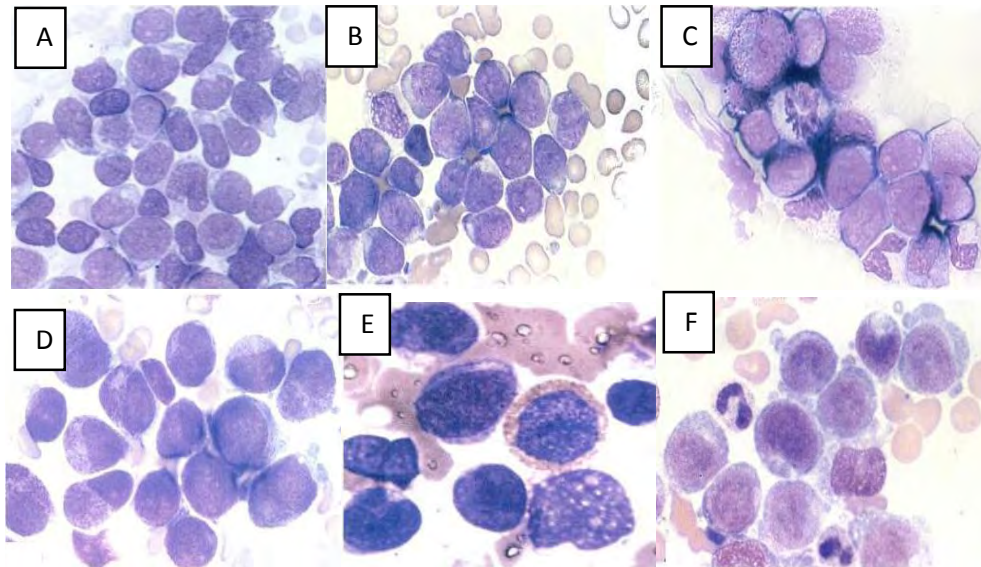
1.4.1 Clasificación de la leucemia aguda mieloblástica

1.4.1.1 Morfológica

La clasificación FAB divide a las LAM en ocho subtipos que comprenden de la variedad M0 a la M7, según la estirpe celular de la cual la leucemia se desarrolla y cuán maduras son²⁰.

Tabla 10. Clasificación morfológica (FAB) de la LAM. Tomada de Bennett, et al; 1976.

Leucemia aguda mieloblástica (LAM)
M0: Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1: Leucemia mieloblástica aguda con maduración mínima
M2: Leucemia mieloblástica aguda con maduración
M3 Leucemia promielocítica aguda (APL)
M4: Leucemia mielomonoblástica aguda
M4eos: Leucemia mielomonoblástica aguda con eosinofilia
M5: Leucemia monocítica aguda
M6: Leucemia eritroide aguda
M7: Leucemia megacarioblástica aguda



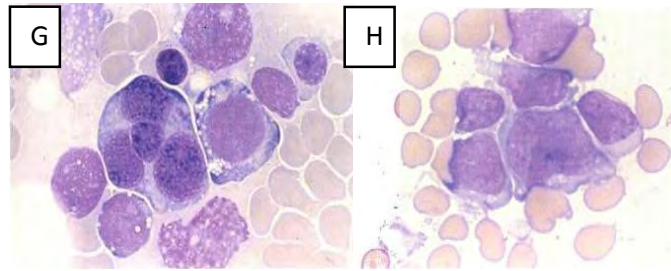


Figura 7. Morfología típica de leucemia aguda mieloblástica. A) Leucemia aguda mieloblástica-M0; B) Leucemia aguda mieloblástica-M1; C) Leucemia aguda mieloblástica-M2; D) Leucemia aguda mieloblástica-M3; E) Leucemia aguda mieloblástica-M4; F) Leucemia aguda mieloblástica-M5; G) Leucemia aguda mieloblástica-M6; Leucemia aguda mieloblástica-M7. Tomada de Ruíz; 1994.

1.4.1.2 Organización mundial de la salud (OMS)

La OMS ha complementado la clasificación propuesta por la FAB con anomalías citogenéticas para dar lugar a la clasificación más actual, la cual en México desafortunadamente no es la más utilizada, ya que en la práctica clínica el diagnóstico, así como la determinación de factores pronósticos y la elección del tratamiento se llevan a cabo tomando en cuenta la clasificación morfológica la cual no toma en consideración muchos de los factores que hoy en día se sabe afectan el pronóstico²².

Tabla 11. Clasificación OMS de LAM. Tomada de Vardiman, et al; 2009.

1) LAM con anomalías citogenéticas recurrentes:

LAM con t(8;21) (q22;q22), (AML1/ETO)
 LAM con Inv (16) (p13;q22), (CBFb/MYH11)
 APL (LAM con t(15;17) (q22;q21), (PML/RAR α y variantes)

2) LAM con displasia multilineaje:

Con síndrome mielodisplásico previo
 Sin síndrome mielodisplásico previo

3) LAM y síndromes mielodisplásicos relacionados con tratamientos previos:

Relacionados con agentes alquilantes
 Relacionados con inhibidor de la topoisomerasa II

4) LAM sin otra especificación:

LAM sin maduración
 LAM mínimamente diferenciada
 LAM con maduración
 Leucemia mielomonocítica aguda
 Leucemia aguda monocítica/monoblástica
 Leucemia aguda eritroide (eritroide/mieloide), eritroleucemia y puro)
 Leucemia aguda megacarioblástica
 Leucemia aguda basófila
 Panmielosis aguda con mielofibrosis
 Sarcoma mieloide

1.4.2 Diagnóstico de la leucemia aguda mieloblástica

El diagnóstico de LAM se lleva a cabo mediante la integración de datos clínico patológicos con la batería de pruebas de laboratorio (biometría hemática, citomorfología de MO, inmunofenotipo, citogenética y biología molecular)²³.

La sospecha de la presencia de esta neoplasia se da inicialmente por la presencia de blastos con cuerpos de Aür en SP, los cuales son característicos de la LAM, casi siempre de la M3. Sin embargo, siempre es necesario efectuar un estudio del aspirado de la MO para conocer el linaje celular afectado, el cual debe complementarse con el resultado de la citometría de flujo que exhiba marcadores de superficie característicos de células inmaduras (CD34+) y marcadores de linaje mielóide según su origen (CD13 y CD33, por ejemplo), la realización de cariotipo puede evidenciar o no anomalías citogenéticas como monosomías y deleciones (comúnmente de los cromosomas 5 y 7), translocaciones cromosómicas como t(15;17), t(8;21), e inversiones de los cromosomas 3 (Inv 3) y 16 (Inv 16); el análisis de biología molecular identifica presencia y/o expresión de los genes quiméricos PML-RAR α , AML1-ETO y CBF β -MYH11; con el objetivo de definir con exactitud el subtipo de leucemia mieloblástica al que se enfrenta²⁹. La suma de estos estudios con los hallazgos clínicos, construye el diagnóstico diferencial correcto de LAM en más de 95% de los casos²¹.

1.4.3 Alteraciones citogenéticas en la leucemia aguda mieloblástica

De acuerdo a la clasificación de la OMS, las anomalías citogenéticas con mayor frecuencia y significado en la LAM, son las translocaciones (15;17)(q21;q22) de la LAM-M3, la translocación (8;21)(q22;q22) de la LAM-M2; la translocación (9;11) (q22;q23) (menos frecuente), además de la inversión del cromosoma 16 (Inv16) presente en LAM-M4²². La detección de estas alteraciones permite establecer el diagnóstico, la variedad de la leucemia, y es la principal herramienta en el seguimiento de los pacientes, identificando la enfermedad mínima residual una vez lograda la remisión del padecimiento⁴.

Las translocaciones (15;17), (8;21), y la Inv 16 se relacionan con un mejor pronóstico, con una mayor probabilidad de lograr la remisión y una supervivencia más prolongada. Las decisiones terapéuticas prácticas más importantes en la LAM dependen de la clasificación citogenética y molecular²¹.

1.4.3.1 t(15;17)(q22;q21), PML-RAR α

Los dos genes fusionados en la t(15;17), son PML localizado en el brazo largo del cromosoma 15 y el receptor del ácido retinoico α (RAR α) en el brazo largo del cromosoma 17²⁷.

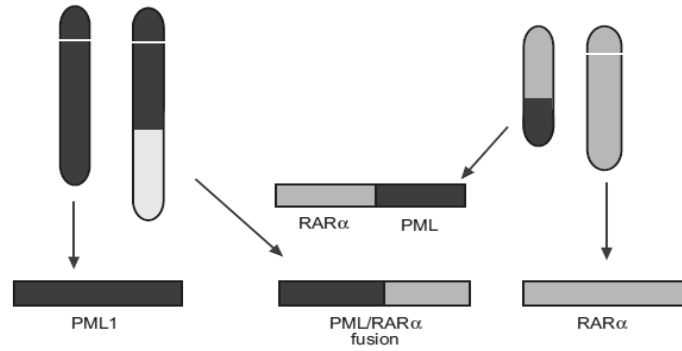


Figura 8. Representación esquemática de la t(15;17). Tomada de O'Donnell, et al; 2012.

Los puntos de corte en RARA siempre ocurren en el intrón 2 de dicho gen y tiene 17kb de longitud. En contraste, PML puede presentar tres regiones de corte involucrados en la t(15;17): intrón 6 (bcr1; 55% de los casos), exón 6 (bcr2; 5%) y en el intrón 3 (bcr3; 40%). Como consecuencia hay tres posibles isoformas de PML-RARA, referidas como “larga” (L o bcr1), variante (V o bcr2) y corta (S, o bcr3)²⁷.

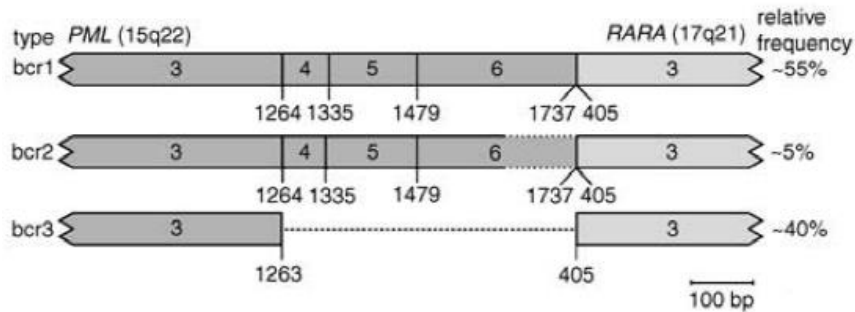


Figura 9. Representación esquemática de los transcritos PML-RARα. Tomada de Gabert, et al; 2003.

La proteína quimérica PML-RARα es un represor de la transcripción. En ausencia de su ligando (ácido retinóico), esta se une al DNA en conjunto con co-represores como N-CoR (nuclear receptor co-repressor), el cual forma parte de un complejo que incluye histonas desacetilasas (HDAC); lo que hace que la cromatina quede inaccesible a activadores transcripcionales o a la maquinaria de transcripción basal, resultando en el silenciamiento de la transcripción de genes necesarios para la diferenciación mieloide³⁸.

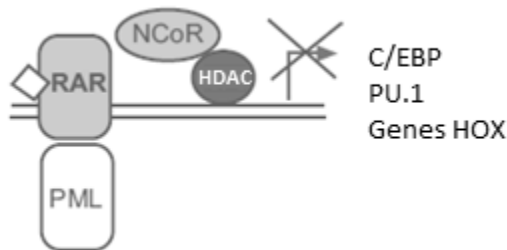


Figura 10. Representación esquemática del mecanismo de inhibición transcripcional por PML-RARα.

Tomada de O'Donnell, et al; 2012.

La unión del ácido retinoico a RAR α conduce a la liberación de los co-represores, dando lugar a la unión de los co-activadores, los cuales acetilan a las histonas. Sin embargo, la proteína quimérica PML-RAR α retiene el complejo desacetilante, moderando la habilidad de la proteína de activar la transcripción³⁸.

Algunos casos de leucemia promielocítica aguda (LAM-M3) presentan morfología normal en sus cromosomas o alguna otra anomalía citogenética. Otros genes han sido hallados en fusión con RAR α en raros casos de leucemia promielocítica aguda con t(15;17) negativa, como lo es PLZF en el cromosoma 11q23, NPM en 5q35, NUMA en 11q13 y STAT5B en 17q21³⁸.

La detección de la translocación (15;17) se puede hacer mediante estudios citogenéticos, FISH o biología molecular; y es de suma importancia debido a que su presencia permite una estrategia terapéutica específica para el tratamiento de las leucemias promielocíticas agudas con ATRA y trióxido de arsénico, dando lugar a altas tasas de remisión, atribuyéndole un carácter de buen pronóstico³⁸.

1.4.3.2 t(8;21)q22;q22), AML1-ETO

La translocación (8;21)(q22;q22), se presenta en aproximadamente 15% de todas las LAM y hasta en 40% de las LAM-M2. Esta translocación es causada por el intercambio balanceado de material genético del brazo largo del cromosoma 8 región q22 (gen ETO) y del cromosoma 21 región q22 (gen AML1)²⁷.

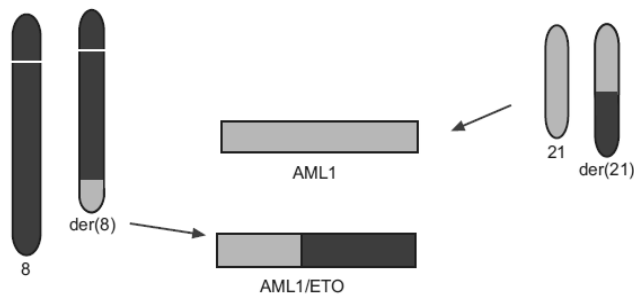


Figura 11. Representación esquemática de la t(8;21). Tomada de O'Donnell, et al; 2012.

El mRNA que surge de la transcripción de este gen es el llamado AML1-ETO o MTG8-RUNX1 que consta de la unión del exón 5 del gen AML1 y el exón 2 del gen ETO, causante de la producción de la oncoproteína AML1-ETO²⁷.

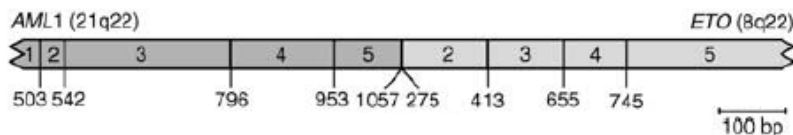


Figura 12. Representación esquemática del transcrito AML1-ETO. Tomada de Gabert, et al; 2003.

La proteína quimérica AML1-ETO consta del extremo amino-terminal de AML1, y casi toda la porción de la proteína ETO, que interacciona con co-represores como N-Cor/SMRT, mSim3a y con histonas desacetilasas (HDAC), funcionando como represor para una amplia variedad de factores de transcripción³⁹.

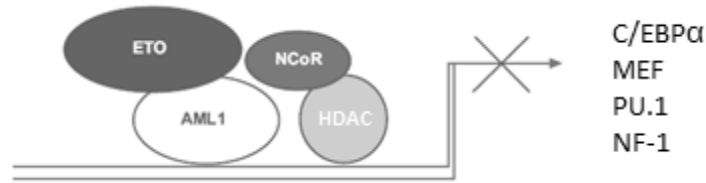


Figura 13. Representación esquemática del mecanismo de inhibición transcripcional por AML1-ETO.

Tomada de O'Donnell, et al; 2012.

Se sabe que AML1-ETO impacta en múltiples procesos involucrados en el desarrollo normal de los mielomonoblastos, donde la proteína de fusión interfiere con diversas señales de transcripción, así como promueve la auto-renovación de las células mieloides, interfiriendo la diferenciación hematopoyética adecuada. AML1-ETO interfiere directamente con el reclutamiento de cofactores esenciales requeridos por factores de transcripción cruciales en hematopoyesis como C/EBP y PU.1, bloqueando así las funciones de diferenciación³⁹.

La determinación de la presencia de esta translocación se puede llevar a cabo mediante pruebas citogenéticas y de biología molecular, y su expresión coloca al paciente en un grupo de riesgo favorable⁴.

1.4.4 Factores pronósticos en la leucemia aguda mieloblástica

Las mejores respuestas se obtienen en pacientes jóvenes, los mayores de 55 años presentan complicaciones más graves y tienen peor pronóstico. Se consideran de buen pronóstico las variedades M1, M2, M3 y M4, al igual que los casos con leucocitosis menor a 50,000/ μ L, así como los hallazgos moleculares de la inversión del cromosoma 16 y las translocaciones (15;17) y (8;21)²¹.

La presencia de comorbilidades, la respuesta al esquema de inducción, así como las alteraciones genéticas y moleculares son factores asociados al pronóstico; siendo los análisis citogenéticos y moleculares la principal guía para la asignación de grupos de riesgo y para la elección del tratamiento. Para ciertos grupos de personas con características favorables, la tasa de curación puede alcanzar 40 a 70%³⁷.

Tabla 12. Factores pronósticos característicos de LAL. Tomada y modificada de Jaime y Gómez; 2012.

Factor pronóstico	Pronóstico favorable	Pronóstico desfavorable
Edad	<55 años	≥55 años
Hepatoesplenomegalia	Ausente	Masiva
Leucocitos al diagnóstico	<50,000	>50,000
Tipo morfológico FAB	M1, M2, M3, M4 M5	M0, M6 y M7
Respuesta a la inducción	Sin blastos periféricos	Con blastos periféricos
Estado del SNC	Sin infiltración	Con infiltración
Comorbilidades	Ausentes	Presentes
Citogenética	t(8;21)(q22;q22) t(15;17)(q22;q12) inv (16)(p13q22), Cariotipo normal, +8 (riesgo estándar), t(9;11)(p22;q23).	Cariotipo complejo, -5, -5q, -7, -7q, inv. (3)(q21q26.2), t(6;9)(p23q34), t(9;22).
Genética molecular	AML1-ETO PML-RARα CBFB-MYH11 Mutación en NPM1, CEBPa	Re-arreglos de MLL Mutación en FLT3

1.4.5 Tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica

El esquema adoptado a nivel mundial desde 1982, y que es el utilizado actualmente en el HGM como estándar de tratamiento es el publicado por el Cancer and Leukemia Group B (CALG B) llamado (7+3), el cual consiste en tres etapas que son: inducción, consolidación y mantenimiento. En la etapa de inducción se administra la combinación de un antracíclico (daunorrubicina) durante tres días y un inhibidor de la síntesis de DNA (citarabina) durante siete días (7+3); en la fase de consolidación se administran dosis altas de citarabina y en el mantenimiento se administra 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclofosfamida y vincristina. El uso del esquema (7+3) proporciona tasas de remisión completa en 65 a 85% de los casos de LAM en el grupo de edad de 20 a 59 años; en grupos de edades avanzadas esta tasa disminuye considerablemente, siendo de 21 a 36% en pacientes mayores de 60 años, observándose mortalidad hasta en 65% de los pacientes, dejando de manifiesto que la edad es un factor pronóstico a considerar para la elección del esquema de tratamiento óptimo⁴⁰.

La leucemia promielocítica (M3) es una variedad especial, ya que es la única que responde al tratamiento con ácido trans-retinóico (ATRA) y trióxido de arsénico. El ATRA al igual que el trióxido de arsénico, induce remisión por diferenciación celular sin producir aplasia, pero sin eliminar a la clona de las células iniciadoras de leucemia. Al combinar la administración de ATRA y trióxido de arsénico con un esquema de quimioterapia con antracíclicos (daunorrubicina) las tasas de remisión completa se observan en más del 80% de los casos de LAM-M3⁴¹.

1.5 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

Las leucemias crónicas de mayor importancia son: la leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica y leucemia de células peludas o tricoleucemia; su curso indolente, larga evolución y ausencia de células indiferenciadas, las distinguen de las leucemias agudas⁴.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico (SMPC), causado a partir de la expansión clonal de la célula madre pluripotencial de la MO que resulta en la proliferación excesiva de células de linaje mieloide, eritroide y plaquetas en SP, ocasionada por una importante hiperplasia de la MO⁴²; dichas células se caracterizan por poseer la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22 (cromosoma Philadelphia), la cual se encuentra en más del 95% del total de los pacientes con esta patología⁴³.

El curso clínico de la enfermedad se divide en tres etapas, fase crónica, fase acelerada y crisis blástica, las cuales presentan diversos signos y síntomas característicos que las diferencian una de otra. Aproximadamente 85% de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la enfermedad, fase que es la que mejor responde al tratamiento⁴².

1.5.1 Clasificación de la leucemia mieloide crónica

La LMC pertenece al grupo de los llamados síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC). Actualmente la clasificación de la OMS de los SMPC incluye las siguientes entidades: LMC CrPh+ o BCR-ABL+, la leucemia neutrofílica crónica, la leucemia crónica eosinofílica/síndrome hipereosinofílico, policitemia vera, mielofibrosis primaria, trombocitemia esencial y la enfermedad mieloproliferativa crónica inclasificable⁴⁴.

Tabla 13. Clasificación OMS de los SMPC. Tomada de Vardiman, et al; 2011.

Síndromes Mieloproliferativos Crónicos

Leucemia mieloide crónica BCR-ABL positivo
Policitemia vera
Trombocitemia esencial
Mielofibrosis primaria
Leucemia neutrofílica crónica
Leucemia eosinofílica crónica/síndrome hipereosinofílico
Síndrome mieloproliferativo crónico inclasificable

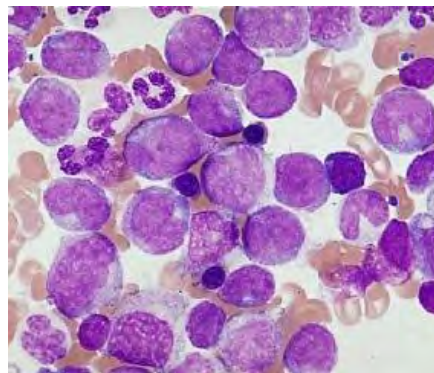


Figura 14. Morfología típica de la LMC. Tomada de Ruíz; 1994.

1.5.2 Diagnóstico de la leucemia mieloide crónica

Para llevar a cabo el diagnóstico de LMC, se requiere del conjunto de las características clínicas del paciente con una serie de pruebas, tales como biometría hemática, aspirado de MO, así como pruebas citogenéticas y de biología molecular que evidencien la presencia de la t(9;22); que en conjunto determinan el diagnóstico diferencial de esta patología²³.

El resultado de la biometría hemática, puede tener recuentos de leucocitos que van desde los 50,000/ μ l hasta valores superiores a 200,000/ μ l. Las células mieloides en SP se muestran en todas sus fases de maduración. En un número considerable de pacientes puede haber cifras mayores de 1,000,000 de plaquetas/ μ l⁴.

La MO es hipercelular con una relación mieloide-eritroide elevada; durante la fase crónica predominan los mielocitos y metamielocitos, los blastos deben ser inferiores a 5%; puede haber un aumento de megacariocitos y tejido fibroso. La fase acelerada se distingue por un recuento de blastos >10% en MO, además de basofilia, eosinofilia y trombocitopenia en SP, así como esplenomegalia. En la crisis blástica se reconoce más de 30% de blastos que en 60 a 70% de los casos son mieloides y en el restante 20 a 30% son de tipo linfoide. El 85% de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la enfermedad²¹.

El diagnóstico diferencial debe realizarse con las neoplasias mieloproliferativas crónicas y en ocasiones debe descartarse además la presencia de una "reacción leucemoide". En estos casos, la detección de la translocación (9;22) hace el diagnóstico diferencial de LMC⁴⁴.

1.5.3 Alteraciones citogenéticas en la leucemia mieloide crónica

En más del 95% de los pacientes diagnosticados con LMC en fase crónica se determina la presencia de la t(9;22)(q34;q11), denominada Cromosoma Philadelphia, la cual por sí misma es causante del fenotipo de la patología³²⁻³⁴. Conforme la enfermedad progresa de la fase acelerada a la crisis blástica se pueden adicionar anormalidades citogenéticas como presencia de isocromosoma 17q (i17q) y trisomía del cromosoma 8⁴². Se ha encontrado también la presencia de translocaciones que involucran al gen MLL (t(4;11) y t(9;11)) en pacientes con LMC en fase acelerada que son tratados con Imatinib⁴⁵.

1.5.3.1 t(9;22)(q34;q11), BCR-ABL rompimiento mayor

Esta aberración cromosómica es el resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, la cual está presente más del 95% de los pacientes con LMC. Molecularmente esta translocación implica al oncogén ABL del cromosoma 9 y el gen BCR del cromosoma 22^{4,27,42,43}.

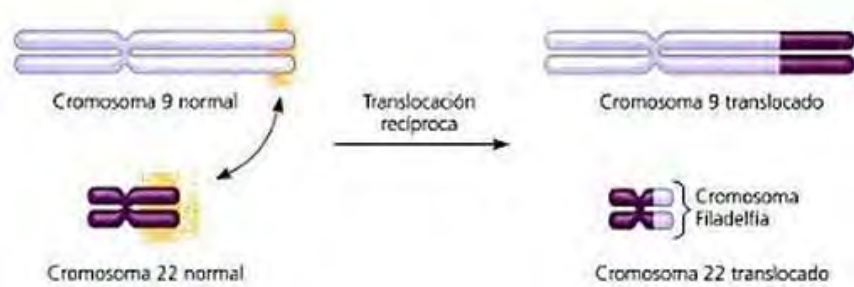


Figura15. Representación esquemática de la t(9;22). Tomada de Ruíz; 2009.

La fusión de los genes BCR-ABL se transcribe en un mRNA quimérico iniciado en el promotor del gen BCR en el extremo 5' del punto de corte de la translocación, dejando la parte del gen ABL en la posición "rio abajo" del punto de la translocación. Posterior al "splicing" del transcrito primario del gen, se genera un mRNA maduro de 8 kb, unido por las secuencias del exón 14 de BCR y el exón 2 de ABL (b3a2) y/o el exón 13 de BCR y el exón 3 de ABL (b2a2)²⁷.

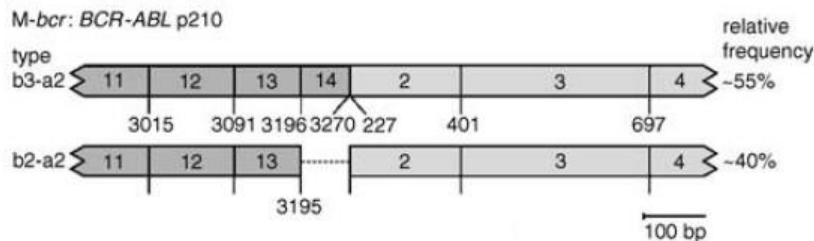


Figura 16. Representación esquemática de los transcritos BCR-ABL M. Tomada de Gabert, et al; 2003.

Ese mRNA se traduce en una proteína de 210 kDa única en las células presentes en la LMC; la cual posee una mayor actividad de tirosin cinasa en comparación con las proteínas ABL normales; lo cual conlleva a la transformación de las células hematopoyéticas normales, causando la LMC⁴³.

BCR-ABL activa múltiples vías de señalización responsables de la protección de la apoptosis, induce la proliferación independiente de factores de crecimiento, modula la habilidad de adhesión/invasión e induce la resistencia a drogas y radiación γ ⁴⁶.

La tirosin cinasa citoplasmática BCR-ABL actúa como regulador de diversos factores de transcripción como MYC, MYB, JUN, NF- κ B, BACH2 y EGR-1, lo que sugiere que el perfil de expresión génica de las células BCR-ABL positivas es significativamente diferente a la de sus homólogos ABL normales; dado que estos factores de transcripción desempeñan papeles importantes en la leucemogénesis. Por otra parte, la oncoproteína BCR-ABL induce un efecto proliferativo, al tener efectos sobre vías de señalización celulares pre-existentes, como la activación de las vías RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT y PI3K/AKT⁴⁶.

La determinación de la presencia de esta translocación se puede llevar a cabo mediante pruebas citogenéticas, FISH y de biología molecular, y su expresión coloca al paciente en un grupo de riesgo estándar⁴.

1.5.4 FACTORES PRONÓSTICOS EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Se señala que la edad, tamaño del bazo, recuento de plaquetas y porcentaje de blastos circulantes, los niveles de deshidrogenasa láctica (DHL) así como la presencia de alteraciones citogenéticas adicionales al cromosoma Philadelphia son datos de valor pronóstico. Con base en esos factores, se puede catalogar a la población de pacientes con diferentes probabilidades de supervivencia en bajo riesgo, intermedio y alto, de acuerdo a la puntuación obtenida en el “test Sokal”^{21,47}.

1.5.5 TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

El principal objetivo terapéutico de la LMC es lograr la remisión hematológica, citogenética y molecular, es decir, desaparecer todo signo de la enfermedad y obtener una biometría hemática y una clínica compatible con la de un individuo sano, además de conseguir que la translocación BCR-ABL sea indetectable (remisión molecular), señal de que la clona leucémica se ha erradicado.^{21,48}

Tabla 14. Criterios de remisión en LMC. Tomada y modificada de Deininger; 2005.

Remisión		Definición
Hematológica	Completa	BH con leucocitos y plaquetas normales, recuento diferencial normal, sin esplenomegalia ni síntomas.
	Parcial	<50% del recuento leucocitario pretratamiento o recuento leucocitario normal con diferencial anormal o esplenomegalia persistente.
Citogenética	Completa	0% de metafases con CrPh.
	Mayor	1-34% de metafases con CrPh.
	Parcial	35 – 90% de metafases con CrPh.
	Ausente	91-100% de metafases con CrPh.
Molecular	Completa	BCR-ABL no detectable.
	Mayor	Reducción >3 log en los transcritos de BCR-ABL.

El primer tratamiento efectivo que se utilizó en pacientes con LMC, fue la glucoproteína Interferón alfa (INF α) en la década de los 80; las propiedades antiproliferativas de este compuesto, en conjunto con la quimioterapia convencional, inducían respuestas citogenéticas completas en 35 a 50% de los pacientes⁴².

En la actualidad, el blanco molecular ideal para el tratamiento de la LMC es la inhibición de la oncoproteína BCR-ABL, la cual tiene altos niveles de expresión y es la causante del fenotipo de la patología. Sobre este hecho, se han desarrollado fármacos que inhiben dicha enzima, como el Imatinib, nilotinib, y dasatinib, que son el tratamiento de primera línea para los pacientes en fase crónica e inducen remisiones citogenéticas y moleculares completas de la enfermedad en más de 50% de los casos⁴⁹⁻⁵¹. De estos medicamentos, el más comúnmente prescrito como tratamiento de primera línea y que es el adoptado por el Hospital General de México, es el Imatinib; el nilotinib y dasatinib se usan sobre todo para casos de intolerancia y/o resistencia

al Imatinib. Las principales causas de resistencia al tratamiento con Imatinib son la mutación T315I y la sobreexpresión de los genes de resistencia a multidrogas (MDR)^{42, 52}.

1.6 MULTIDROGORRESISTENCIA Y GENES ABC

En la actualidad, la resistencia celular a la quimioterapia representa la principal causa de falla en el tratamiento de neoplasias⁵³, como el sarcoma indiferenciado⁵⁴, carcinoma hepatocelular⁵⁵, linfoma nasal de células NK/T⁵⁶, cáncer mamario⁵⁷, cáncer de células germinales⁵⁸; así como en las neoplasias onco-hematológicas^{59,60}; lo cual se traduce en elevadas tasas de mortalidad⁶⁰.

En los tejidos tumorales una expresión elevada de los genes de resistencia a multidrogas (MDR: MultiDrug Resistance), podría contribuir a la quimioresistencia inicial desarrollada por ciertos cánceres. El fenotipo de MDR puede ser también adquirido en el curso de la quimioterapia. Se sabe que el promotor del gen MDR-1 puede ser activado *in vitro* por moléculas que pueden provocar alteraciones en las células, tales como los medicamentos citotóxicos⁶¹.

La multidrogorresistencia es un complicado fenómeno multifactorial mediante el cual las células neoplásicas se vuelven resistentes a una gran variedad de agentes quimioterapéuticos; este fenómeno es causado por distintos mecanismos celulares, como la reducción de la concentración intracelular del fármaco dependiente de los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette)^{61,62}.

Los genes de resistencia a drogas, también llamados genes ABC, codifican para glucoproteínas que tienen roles clave en muchos procesos celulares, como el transporte de sustratos a través de la membrana plasmática, incluyendo los fármacos utilizados durante la quimioterapia⁶³. La sobreexpresión de los genes ABC lleva a un aumento de la resistencia de las células tumorales a una serie de fármacos administrados durante la terapia de inducción o incluso después de la quimioterapia⁶⁴.

1.6.1 Multidrogorresistencia y genes abc en hematología

En las leucemias agudas; como ya se mencionó, uno de los factores que se ha asociado con la supervivencia y el éxito del tratamiento; es la respuesta al tratamiento, y si se integra una respuesta completa a las 4 semanas²¹. Este factor depende en gran medida de la presencia o ausencia de la expresión de los genes de resistencia a multidrogas. En las leucemias agudas tanto mieloides como linfoides, la expresión del gen ABC-B1 se ha asociado a la falla al tratamiento de inducción a la remisión y por ende a una menor tasa de supervivencia⁶⁵.

La multidrogorresistencia contribuye al fracaso terapéutico en varias neoplasias hematológicas principalmente cuando son tratadas con regímenes intensivos de quimioterapia que contienen antracíclicos (doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), epipodófiloxinas (etopósido, tenipósido), e inhibidores de tirosin cinasa (Imatinib, dasatinib) los cuales son sustratos de las glucoproteínas ABC-B1 y ABC-G2. Debido a la afinidad de estas glucoproteínas por sus sustratos, las concentraciones de los fármacos quimioterapéuticos son reducidas por estas proteínas. Las

células leucémicas, por ejemplo, pueden ser resistentes a la quimioterapia de inducción, fenómeno que conduce a un comportamiento refractario de la enfermedad, lo cual puede dar lugar a recaídas y en la última instancia a la muerte del paciente⁶⁵⁻⁶⁷.

Uno de los mecanismos más estudiados en la resistencia a los diversos agentes quimioterápicos y quizás el más importante, es la presencia de la P-glucoproteína (ABC-B1) y la glucoproteína BCRP (ABC-G2)⁶⁸.

Balderas en 2014; encontró asociación significativa de la presencia del gen ABC-B1 con un peor comportamiento clínico en pacientes con LAL, los cuales fueron refractarios al tratamiento, recayeron a MO o a sistema nervioso central o murieron; así también halló que en la mayoría de los pacientes (86%) que fallecieron eran positivos para ABC-B1⁶⁹.

Olarte, et al, en 2010 reportaron una frecuencia de 39% de expresión del gen ABC-B1 en pacientes con LAM *de novo* y en 71% de los pacientes con LAM en recaída del Hospital General de México, en donde determinaron una correlación significativa entre la expresión del gen ABC-B1-1 y la presencia de refractariedad al tratamiento de inducción a la remisión, lo que condiciona a una leucemia a ser refractaria⁶⁰.

La frecuencia de expresión de ABC-B1 en LAM al diagnóstico es cercana a 33%, sin embargo en la recaída, se ha informado hasta de 40%. En el caso de la LAL al diagnóstico, se han reportado frecuencias de 23.1%⁶⁹, sin embargo ante la recaída, la frecuencia es en promedio de 35%⁷⁰. Actualmente se desconocen los factores que propician el aumento en la expresión de este gen, sin embargo su sobreexpresión en pacientes en recaída, es un indicativo para un pronóstico desfavorable⁷⁰.

ABC-B1 no es el único transportador MDR asociado con peor respuesta a la terapia y sobrevida en leucemia aguda. Múltiples estudios han asociado la expresión del gen ABC-G2 y la expresión de su producto proteico BCRP con peor pronóstico y pobre respuesta al tratamiento.

La sobreexpresión de la proteína ABC-G2 en leucemia mieloide aguda ha sido asociada con un respuesta pobre a la quimioterapia convencional e incrementa el riesgo de recaída. Pacientes con sobreexpresión de ABC-G2 al diagnóstico tienen menor sobrevida libre de leucemia e incrementa la incidencia de recaídas comparado con los pacientes ABC-G2 negativos⁷¹.

Las células leucémicas resistentes a la quimioterapia de inducción conducen a refractariedad de la enfermedad o recaída y en la última instancia a la muerte temprana del paciente⁷⁰.

1.6.1.1 ABC-B1

El gen MDR-1 que codifica para la proteína ABC-B1 está localizado en el cromosoma 7q21.1, comprende un fragmento de 120 kb, y está constituido por 29 exones y 28 intrones. Dicho gen es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad de conferir resistencia a drogas debido a su expresión o sobreexpresión en células tumorales. Este gen codifica para la P-gp, una proteína transportadora dependiente de ATP, que es capaz de eliminar del interior de las células las sustancias citotóxicas, permitiendo su resistencia a la terapia antitumoral⁷².

La P-gp está formada por 1280 aminoácidos y tiene un peso aproximado de 170 kDa, cuenta con dos dominios de unión a ATP citoplasmáticos y dos dominios hidrofóbicos, formados cada uno de ellos por seis fragmentos transmembranales que determinan la especificidad de sustrato, al formar la vía por la que este atraviesa la membrana⁷³.

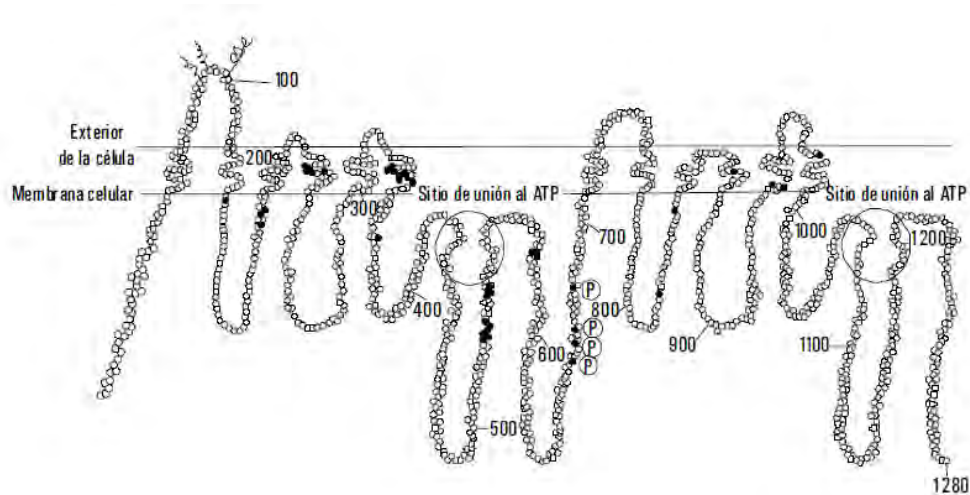


Figura 17. Representación esquemática de la proteína ABC-B1. Tomada de Fernández, et al; 1998

1.6.1.2 ABC-G2

El gen ABC-G2 está localizado en el cromosoma 4q22 y está constituido por 19 exones. Esta proteína también llamada BCRP, por sus siglas en inglés (Breast Cancer Resistance Protein), es el segundo miembro de la subfamilia G de la superfamilia de los transportadores ABC. ABC-G2 es una proteína de 75 kDa, identificada por primera vez en 1998⁷⁴.

Esta proteína funciona como un transportador de xenobióticos que juega un rol importante en la resistencia a multidroga. Es también una proteína a la cual se le ha atribuido un papel crucial en la resistencia al tratamiento en cáncer de mama⁷⁴.

El transportador ABC-G2 humano consta de 655 aminoácidos y posee 6 dominios transmembranales (residuos 397 a 655) y un sitio de unión a ATP (residuos 1 a 396)⁷⁴.

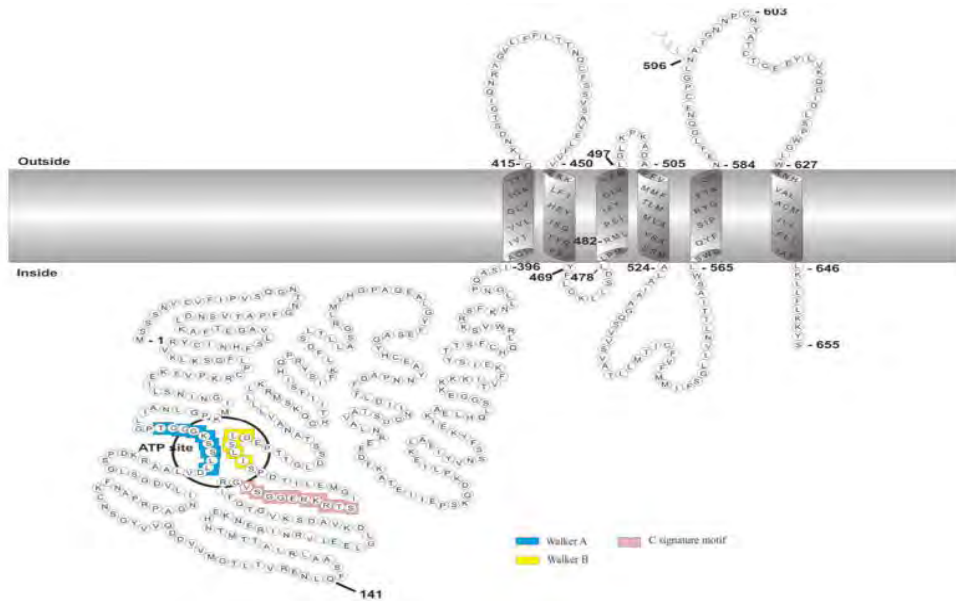


Figura 18. Representación esquemática de la proteína ABC-G2. Tomada de Ni, et al; 2010.

1.7 ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (ATC)

El término ATC se refiere a un grupo de genes que codifican para antígenos reconocidos por los linfocitos T citotóxicos⁷⁵; los cuales no se encuentran en tejidos normales, ya que su expresión está restringida normalmente en tejidos como el testicular, ovárico, placenta y tejido en fases iniciales del desarrollo; estos antígenos se detectan en células embrionarias o fetales, pero las células de los adultos dejan de expresarlos⁷⁶. Las propiedades inmunogénicas proporcionadas por los ATC, vuelven a estos antígenos en atractivos blancos para la inmunoterapia en cáncer⁷⁷.

Cuando estos genes pierden su regulación fisiológica debido a la transformación maligna de la célula, codifican proteínas que se comportan como antígenos tumorales y evocan la correspondiente respuesta inmunitaria humoral, así como la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T citotóxicos⁷⁸. Se desconocen en muchos casos las funciones que desempeñan las proteínas codificadas por estos genes⁷⁷. No son necesarios para el fenotipo maligno de las células neoplásicas y sus estructuras son idénticas a las de los genes de las células normales⁷⁹. Estos antígenos tumorales se acoplan a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase 1, por tal motivo pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺⁷⁷.

De forma similar se ha demostrado la activación aberrante de los ATC en diversos tipos de cáncer humano⁸⁰, como melanoma⁸¹, cáncer pulmonar⁸², sarcoma⁸³, mieloma múltiple⁸⁴, linfomas⁸⁵ y leucemias⁸⁶, entre otros tipos de cáncer. La frecuencia de la expresión de los ATC es muy variable entre los diferentes tipos de tumores. El melanoma, el cáncer ovárico, y el cáncer de pulmón se consideran tumores con alta frecuencia de expresión de ATCs, mientras que los tumores presentes en cáncer renal, de colon, pancreático y los hematopoyéticos, se consideran tumores con baja frecuencia de expresión⁸⁷; aunque existen excepciones a esta observación entre las neoplasias hematológicas, como lo son la alta expresión de MAGE-C1 en el mieloma múltiple⁸⁴, y CT45 en el linfoma de Hodgkin clásico⁸⁷.

Se ha hallado correlación de la expresión de los ATC con las características clínico-patológicas en diferentes tipos de tumores, demostrando asociación de la positividad de los ATC con un mayor grado tumoral, estadios avanzados, comportamiento metastásico y la peor evolución clínica de los pacientes⁸⁹.

Existen más de 100 antígenos testiculares de cáncer reportados en la literatura, pero la función biológica de la mayoría de los ATC permanece sin ser claro⁶⁴. Estudios revelan que los ATC tienen propiedades anti-apoptóticas, modificando la regulación de la proliferación celular y la adhesión de las células cancerígenas⁷⁵; hecho que podría explicar la persistencia de la enfermedad mínima residual en algunos tumores malignos⁸⁷.

Los ATC comprenden 70 familias de genes, entre las que se encuentran MAGE (melanoma antígeno), BAGE (melanoma antígeno B), GAGE (antígeno G), NY-ESO (melanoma antígeno IB), LAGE (Antígeno L), etc. Cada una de ellas contiene múltiples miembros, por ejemplo la familia MAGE contiene las subfamilias A, B, C y cada una contiene a diversos genes o miembros como A1, A2, A3, A4, A6, A7, A8, A10, A11 y A12. En total se han reportado 140 transcritos descritos en diferentes tumores y algunos de ellos son inmunogénicos⁸⁹.

Los miembros de cada familia de ATC se encuentran clasificados en dos grandes grupos; en los que se encuentran en el cromosoma X (CT-X), y los que no se encuentran en el cromosoma X (no CT-X)⁹⁰, ubicándose en los cromosomas 1, 4, 8, 21, entre otros⁸⁹.

1.7.1 Expresión de los ATC en tejido normal.

La función de los genes ATC en células normales no es clara aún, sin embargo se relacionan con el desarrollo embrionario, posiblemente inhibiendo la apoptosis y teniendo un rol esencial en el mantenimiento de las células germinales primordiales masculinas y femeninas. La mayoría de los ATC presentes en el cromosoma X, incluyendo NY-ESO1, MAGE-A, CT7/MAGE-C1, CT10/MAGE-C2, GAGE, CT47, SAGE1, y NXF2, etc., presentan elevada expresión en la espermatogonia⁹⁵.

Se ha descrito la expresión de diversos ATC en la fase de desarrollo embrionario, así como en tejido testicular adulto. Se ha detectado la presencia de MAGE-A y GAGE durante la migración y proliferación de las células germinales primordiales; así como la expresión de MAGE-A, GAGE, NY-ESO1, NXF2 y GAGE, entre otros, durante la proliferación de las células germinales primordiales para llevar a cabo la colonización de la gónada⁸⁸.

En el tejido testicular adulto, se ha descrito la presencia de diversos ATC para llevar a cabo procesos fundamentales en el desarrollo espermatogénico; por ejemplo, se ha implicado a la familia MAGE-A, GAGE, NY-ESO1, SSX, SAGE1, NXF2, TDRD1 y TEX15 en la proliferación de la espermatogonia como parte de la manutención de la reserva de células del tallo; así también se ha observado el papel de SCP1, ADAM2, SPO11, TSP50, BORIS, TPTE, LDHC, TPX1, entre otros, en los procesos de la división meiótica de espermatoцитos primarios a espermatoцитos secundarios y en la motilidad de los mismos; y por último, el rol de SPANX, ADAM2, SP17, ACRBP, GAGE, AKAP4, ZNF645, TPTE, etc. en la motilidad del espermatozoide maduro⁸⁸.

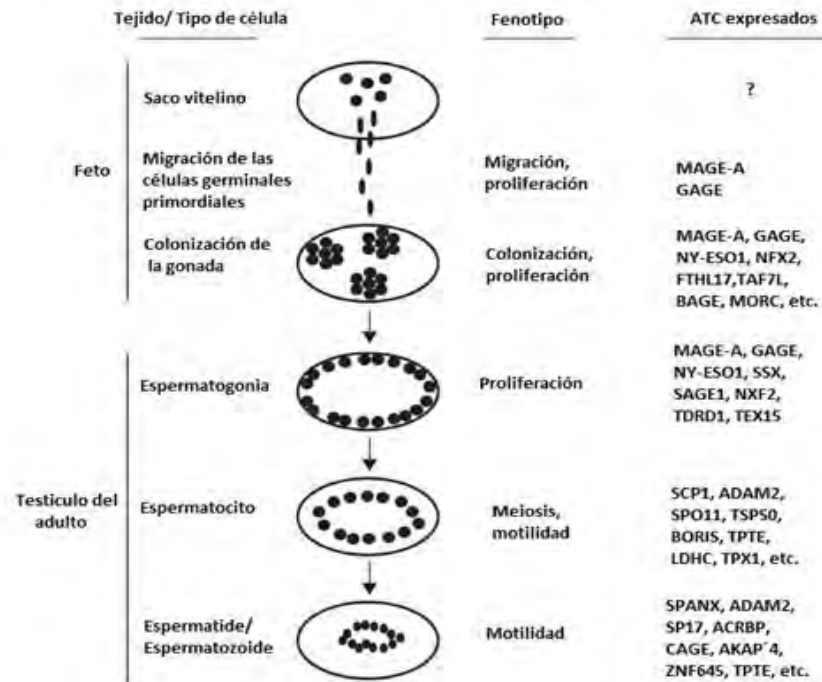


Figura 19. ATC implicados en etapas del desarrollo embrionario y en tejido adulto.

Tomada de Gjerstorff, et al; 2015.

1.7.2 Regulación de la expresión de los ATC

El control de la expresión de los genes ATC en células normales se realiza mediante el proceso de metilación/desmetilación de la región promotora⁹⁶. La metilación es un mecanismo epigenético, que tiene un papel importante en el silenciamiento de genes y la inactivación del cromosoma X. La metilación es llevada a cabo por la DNA metil-transferasa 1 (DNMT1) que cataliza la adición covalente de un grupo metilo a la S-adenocilmationina en posición 5' del dinucleotido CpG que están localizadas frecuentemente en zonas promotoras del gen⁹⁷.

La pérdida de la metilación genómica (hipometilación o desmetilación) se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la progresión de la enfermedad. En los genes de las células pre-neoplásicas y cancerosas comparten cambios importantes en los niveles de metilación⁹⁷.

La hipometilación conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación por lo que existe sobreexpresión y alteración de las proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis. La hipermetilación de genes está implicada con el silenciamiento de genes, como en los genes supresores de tumor y en la regulación génica durante el desarrollo embrionario⁹⁸.

En tejidos normales los promotores de los genes ATC están hipermetilados, excepto en tejido testicular donde los genes se expresan en las células que dan origen a la serie espermatogénica, principalmente la espermatogonia y el espermatocito primario donde se ha detectado la expresión de las proteínas MAGE⁹⁸. Se ha sugerido que durante la embriogénesis la expresión de los genes MAGE bloquea la apoptosis que no se presenta en las células

embrionarias testiculares; al llevarse a cabo la diferenciación testicular permanecen encendidos únicamente en las células germinales primordiales del tejido testicular⁹⁹.

Los promotores del resto de las células son metilados por lo que los genes son silenciados o inactivados. Se ha observado que el patrón de metilación de la región promotora del gene MAGE-A3 es transmitida de una generación a otra, lo que corrobora la implicación de un mecanismo de control epigenético. Otros genes que codifican para ATCs, tales como MAGE-A1, MAGE-A2, GAGE y NY-ESO1 mantienen el mismo patrón de metilación¹⁰⁰.

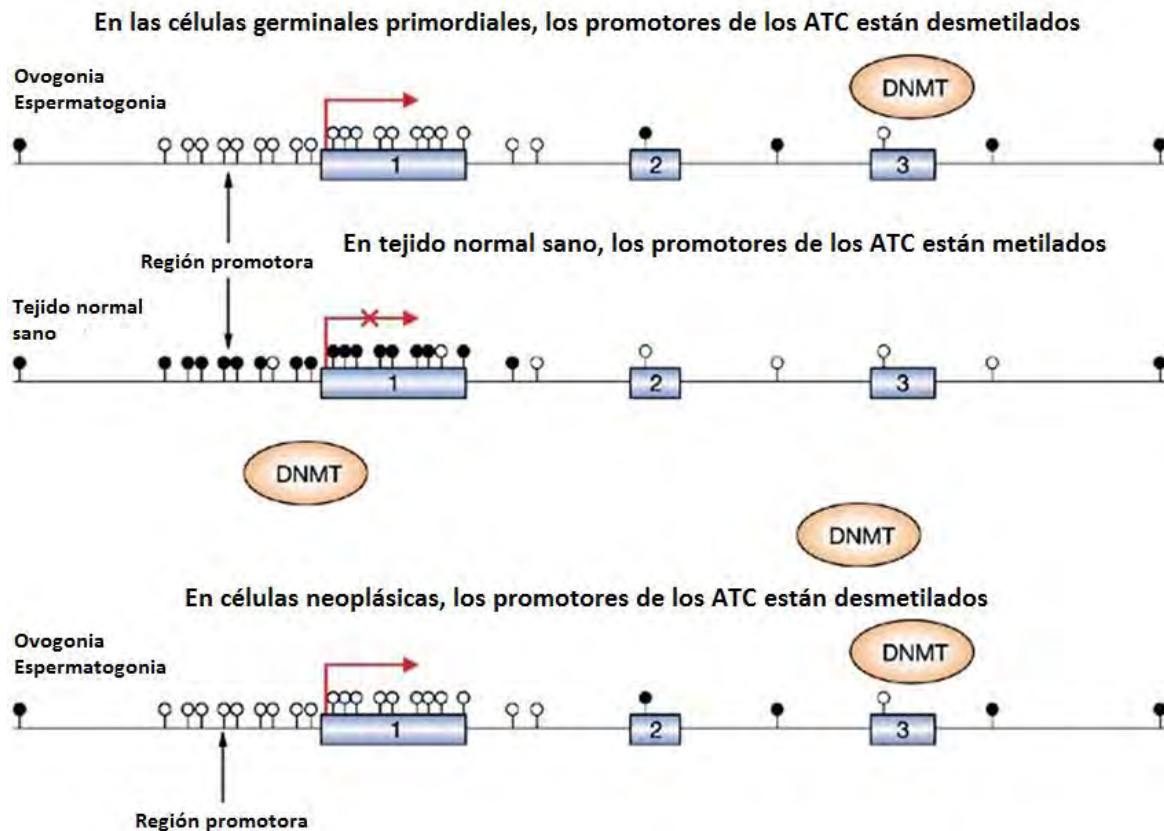


Figura 20. Perfiles de metilación/desmetilación de promotores de genes ATC en tejido normal y cáncer.
Tomada y modificada de Baylin; 2005

1.7.3 Expresión de los ATC en cáncer.

Se han hallado la activación aberrante y la expresión de mRNA en diversos cánceres humanos como, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, particularmente el de células escamosas, se han encontrado frecuencias altas de la expresión de los ATC, algunas veces son referidos como "tumores ricos en ATC". En contraste, las neoplasias hematológicas, incluidos linfomas y leucemias, así como los cánceres renal, de colon y pancreático, se han descrito una notable baja frecuencia en la expresión de ATCs. Es posible que estos ATC tengan funciones biológicas específicas en estos tipos de neoplasias, pero dichos roles no se han determinado aún con exactitud; aunque recientes estudios han demostrado evidencia de que los ATC tienen un rol importante en la tumorigénesis⁷⁷.

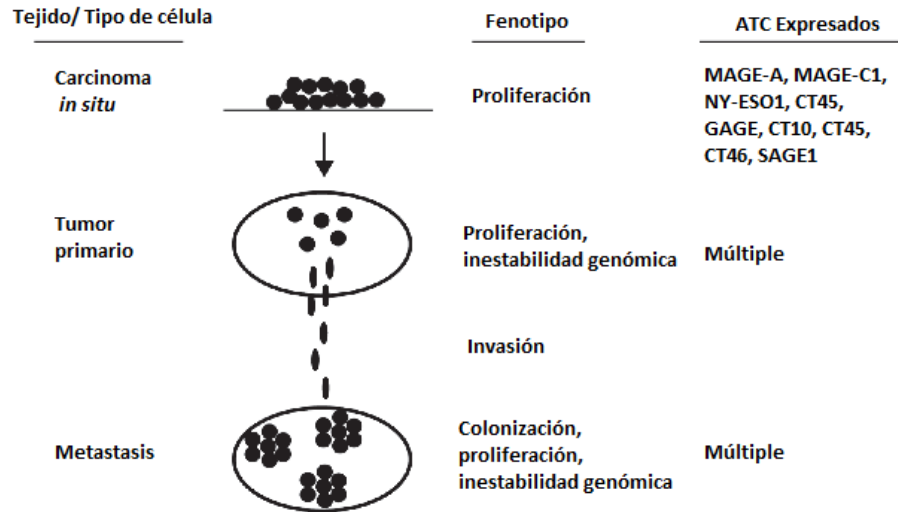


Figura 21. ATC implicados en etapas del desarrollo carcinogénico. Tomada de Gjerstorff, et al; 2015.

Para determinados tipos de cáncer, a menudo una mayor frecuencia de expresión de ATC se correlaciona con un mal pronóstico. En cáncer avanzado y en el caso de tumores metastásicos se han hallado también mayor frecuencia de expresión de ATC que en tumores primarios. Por ejemplo, NY-ESO1 se ha determinado en una expresión de 40% en cáncer de pulmón en grado 3, 23% en tumores de grado 2, y ausente en tumores de grado 1¹⁰¹. De manera similar, la expresión de MAGE-A1 se ha encontrado en la fase metastásica de melanoma en comparación con el 16% del melanoma primario¹⁰².

Tabla 15. Correlación de la expresión de las proteínas ATC con parámetros clínico-patológicos.

Tomada de Caballero, et al; 2009

Tipo de tumor	Antígeno	Asociación
Melanoma	MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4	Masa tumoral y metástasis
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A10, MAGE-C1	Tumoración avanzada, etapa patológica y nodal, invasión pleural
Cáncer de páncreas	MAGE-A3	Sobrevida pobre
Carcinoma hepatocelular	MAGE-C1	Reducción en la sobrevida global
Mieloma múltiple	MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-C1	Fase y riesgo de la enfermedad
Carcinoma ovárico	MAGE-A4	Correlación inversa entre expresión y sobrevida.
Melanoma	NY-ESO-1	Lesiones primarias más gruesas y mayor frecuencia de metástasis

1.7.3.1 MAGE-A3

Este gen es un miembro de la familia MAGE-A, localizado en el cromosoma Xq28 y consta de 6 exones, que para una proteína que es un 50 – 80% idéntica a los otros miembros de la familia MAGE. Los promotores y los primeros exones de los genes MAGE-A muestran una considerable variabilidad, lo que sugiere que la existencia de esta familia de genes permite su expresión bajo diferentes controles transcripcionales⁸¹.

De los ATC estudiados, el antígeno de melanoma de la familia A3 (MAGE-A3) es uno de los ATC más comúnmente expresados en una gran variedad de neoplasias. Sin embargo, la expresión y función de MAGE-A3 en las células iniciadoras de cáncer no es del todo claro aún⁸¹.

Sin embargo, algunas de las funciones que han sido descritas para este miembro de la familia MAGE es su implicación en la supervivencia de las células neoplásicas; actuando como supresor de p53, al favorecer la unión con su correpresor Kap-1⁹¹. Adicional a esto, se ha demostrado que MAGE-A3 bloquea directamente la interacción de p53 con la cromatina, inhibiendo el efecto de regulador transcripcional de p53, también regula negativamente la función de este mediante el reclutamiento de represores de la transcripción como histonas desacetilasas (HDAC), para los genes regulados por esta proteína⁹². Adicionalmente se ha identificado a MAGE-A3 como regulador de las ubiquitin ligasas de E3, que facilitan la degradación de proteínas, incluida p53⁹³.

1.7.3.2 NY-ESO1

Este gen se encuentra en una región duplicada del cromosoma Xq28, se halló por primera vez en cáncer esofágico; cuenta con un total de 3 exones que codifican para su producto funcional. La proteína codificada por este gen es un antígeno que se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer pero se encuentra expresado de manera normal en tejido testicular, espermatogonia y placenta. En tejido sano e incluso en diversas líneas celulares hematológicas se encuentra ausente, sin embargo, en líneas celulares neoplásicas se ha demostrado la inducción de su expresión mediante el uso de fármacos que actúan sobre mecanismos epigenéticos como la 5-aza-2'-desoxicitidina⁹⁴.

En diversos tipos de cáncer humano como el carcinoma de células escamosas de laringe y osteosarcoma, la expresión de NY-ESO1 se asocia a un mal pronóstico y a una supervivencia corta. Sin embargo, NY-ESO1 es uno de los ATC de particular interés, debido a la excepcional capacidad de generar respuesta celular y humoral, siendo uno de los ATC con mayores propiedades inmunogénicas al ser el ATC con mayores títulos de anticuerpos que se ha determinado; esto lo posiciona como un atractivo candidato para la formulación de vacunas terapéuticas para el cáncer⁹⁴.

1.7.4 Implicación clínica de los ATC en hematología.

La expresión de los ATC es reconocida en diversos tumores sólidos. Son embargo, su expresión en neoplasias hematológicas permanece sin ser clara aún⁷⁷. Andrade et al., Analizó la expresión de los ATC en pacientes con mieloma múltiple (MM), encontrando la frecuencia de expresión de 14 ATC en 39 pacientes; obteniendo que MAGE-C1/CT7 estuvo presente en 77% de los pacientes, LAGE-1 en 49%, MAGE-A3/6 41%, MAGE-A2 36%, GAGE 33%, NY-ESO1 33%, BAGE-1 28%, MAGE-A1 26%, PRAME 23%, SSX-1 26% MAGE-A12 20.5%, y MAGE-A4 y MAGE-A10 estuvieron ausentes; determinando que los pacientes con expresión de MAGE-C1/CT7, MAGE-A3/6 y LAGE-1 son buenos candidatos para inmunoterapia, así como la expresión de estos genes en 85% de los casos totales de MM¹⁰³.

Olarte, et al; en 2012; demostró que existe expresión de los ATC en pacientes con linfoma, encontrando una frecuencia de MAGE-A3 de 44.9%, NY-ESO1 33.3%, MAGE-A4, MAGE-B2 y LAGE con 27%, 21% y 20% respectivamente; los genes GAGE, BAGE y MAGE-C1 tuvieron frecuencia menores del 20% (15.9%, 13% y 7.2%). En el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) se encontraron frecuencias para MAGE-A3 de 39.28% y de NY-ESO1 de 46.42%; y en el caso de linfoma de Hodgkin se encontró presencia de MAGE-A3 en 30% de los casos de celularidad mixta y un 15.38% en el linfoma de variedad esclerosis nodular, en este estudio se demostró que los pacientes con LDCGB que tuvieron ausencia de expresión de ATC tenían una mayor sobrevida que los que presentaban expresión de estos; así también los pacientes que presentaban expresión de solo 1 ATC tenían mayor sobrevida que en los que se determinó co-expresión de diversos ATC, determinando la presencia de los ATC como un factor de mal pronóstico¹⁰⁴.

En población mexicana el primer estudio sobre este grupo de genes en leucemia fue realizado por Martínez, et al; en 2007, en donde se analizaron 115 muestras de leucemias (34 de LAM, 76 de LAL y 5 de LMC) para los genes MAGE-A1, MAGE-A3 y MAGE-B2. La expresión hallada para MAGE-A3 fue de 32.17% y MAGE-B2 en 16%, este trabajo confirmó la presencia de genes de la familia MAGE en este tipo de neoplasias⁷³, contrario a lo que había reportado Chambost, et al; en 1993, quienes realizaron un estudio en 45 pacientes, 16 con LAM, 11 con LAL, 12 con LMC y 6 con LLC, en donde no se encontró expresión del gen MAGE-1 a nivel de mRNA en estos tipos de neoplasias¹⁰⁵.

Mendoza, et al; en 2012 determinó la presencia de MAGE-A3, MAGE-B2, MAGE-C1, MAGE-4, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO1 en pacientes con LMC. En este estudio se hallaron correlaciones de la expresión de ATC con parámetros clínicos como sexo, número de leucocitos y número de plaquetas; determinando que existe menor expresión de MAGE-A3 en el género femenino; así como la ausencia de expresión de MAGE-C1 en pacientes con plaquetas mayores a $80 \times 10^3 / \mu\text{l}$ y con leucocitos mayores a $50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ¹⁰⁶.

1.7.5 Elección de panel de biomarcadores moleculares pronósticos en leucemia agudas y leucemia mieloide crónica

En la actualidad, la detección de biomarcadores moleculares en leucemias se ha vuelto fundamental para el diagnóstico, el establecimiento de factores pronósticos y la determinación de tratamientos adecuados de los padecimientos. Para tales fines, las técnicas de biología molecular que cuentan con una gran especificidad y sensibilidad, nos ofrecen la capacidad de detectar dichos marcadores en muestras de MO que contengan desde miles hasta una sola célula neoplásica por cada millón de células normales. Implementando un panel de marcadores moleculares que permita detectar: translocaciones cromosómicas, antígenos testiculares de cáncer y genes de resistencia a drogas; se pueden determinar factores pronósticos, determinación de la progresión de la enfermedad y asociación a resistencia al tratamiento, respectivamente.

Tabla 16. Biomarcadores moleculares de impacto en leucemias agudas y leucemia mieloide crónica.

Panel de biomarcadores				
Biomarcador	Genes asociados	Leucemia asociada	Frecuencia en adultos	Pronóstico clínico
Gen de fusión	BCR-ABL m	LAL	25 – 30%	Desfavorable
Gen de fusión	E2A-PBX1	LAL pre-B	2 – 3%	Riesgo estándar
Gen de fusión	TEL-AML1	LAL pre-B	2%	Favorable
Gen de fusión	AF4-MLL	LAL	3 – 7%	Desfavorable
Gen de fusión	AML1-ETO	LAM-M2	40% de las LAM-M2	Favorable
Gen de fusión	PML-RAR α	LAM-M3	bcr 1= 55% bcr 2= 5% bcr 3= 40%	Favorable
Gen de fusión	BCR-ABL M	LMC	>95%	Riesgo estándar
Gen de multidrogo resistencia	ABC-B1	LAL, LAM, LMC	Variable	Sobreexpresión (Desfavorable)
Gen de multidrogo resistencia	ABC-G2	LAL, LAM, LMC	Variable	Sobreexpresión (Desfavorable)
Gen asociado a tumor (ATC)	MAGE-A3	LAL, LAM, LMC	Variable	Desfavorable
Gen asociado a tumor (ATC)	NY-ESO1	LAL, LAM, LMC	Variable	Desfavorable

2. JUSTIFICACIÓN

En México, las leucemias son el segundo grupo de enfermedades onco-hematológicas más frecuente (solo por debajo de los linfomas), siendo la neoplasia hematológica con la más alta tasa de mortalidad. A pesar de los avances moleculares en el diagnóstico y en la caracterización de la enfermedad; en nuestro país el diagnóstico de estas neoplasias, así como su clasificación, determinación de factores pronósticos, la elección del tratamiento y el seguimiento del padecimiento se fundamentan aún en hallazgos clínico-patológicos y pruebas de laboratorio como biometría hemática, inmunofenotipo, y aspirado de médula ósea, que si bien son fundamentales en el estudio de estas patologías, deben ser complementadas con las técnicas de biología molecular que proporcionan más información para la caracterización completa de estos padecimientos; es por eso, que se propone la inclusión de la determinación de un panel de biomarcadores, mediante pruebas de biología molecular de alta especificidad y sensibilidad (RT-PCR y qRT-PCR), las cuales desafortunadamente en México aún no se cuenta con ellas para su uso rutinario en los servicios de salud públicos; el cual se pueda incluir en la batería de pruebas solicitadas por los médicos en las instituciones de salud, para que con la información obtenida a partir de este, se pueda realizar y/o apoyar al diagnóstico, clasificación, detección de factores pronósticos, determinación de blancos moleculares para los tratamientos y causas de resistencia a este; así como el monitoreo de la progresión de la enfermedad, para fortalecer el manejo de los pacientes que sufren dichos padecimientos y se puedan tener mayores tasas de éxito en el tratamiento de estas enfermedades.

3. HIPÓTESIS

Sí se incluye la detección de un panel de biomarcadores mediante técnicas de biología molecular para el estudio de rutina de los pacientes con leucemia, entonces se logrará determinar y/o reforzar el diagnóstico, clasificación, criterios de elección del tratamiento, factores pronósticos y de resistencia al tratamiento, así como se podrá llevar a cabo un monitoreo más eficiente del seguimiento de la enfermedad, que permitan el mejor manejo de este grupo de neoplasias.

4. OBJETIVO

4.1 GENERAL

Detectar y analizar un panel demarcadores moleculares implicados en el diagnóstico, pronóstico, la progresión de la enfermedad y la resistencia al tratamiento; mediante RT-PCR y qRT-PCR, para fortalecer el estudio de los pacientes con leucemias agudas y leucemia mieloide crónica.

4.2 PARTICULARES

Determinar la frecuencia de los genes de fusión BCR-ABL Mayor, BCR-ABL Menor, TEL-AML1, AF4-MLL, E2A-PBX1, AML1-ETO, y PML-RAR α ; de los antígenos testiculares de cáncer MAGE-A3 y NY-ESO1; y de los genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2, en pacientes con LAL, LAM y LMC *de novo*.

Aplicar el panel de biomarcadores en una población de pacientes *de novo* y una población subsecuente, para determinar biomarcadores de interés diagnóstico, pronóstico, utilizados como blancos moleculares para el tratamiento y de resistencia a este.

Determinar, comparar y analizar los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2, en individuos sanos, pacientes leucémicos *de novo* y pacientes subsecuentes.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Estudio de tipo experimental, descriptivo, transversal y prospectivo.

5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes con diagnóstico de LAL, LAM y LMC que ingresaron al servicio de Hematología del Hospital General de México.
2. Hombres y mujeres.
3. Que se les haya realizado toma de muestra de MO para el estudio morfológico y de biología molecular.
4. Mayores de 18 años.
5. Que cuenten con carta de consentimiento informado.

5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con muestra insuficiente (celular o de material genético) para el estudio de biología molecular.
2. Pacientes que presenten co-morbilidad con algún otro tipo de cáncer.
3. Pacientes que no cuenten con historial clínico.

5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes que abandonen el tratamiento y/o seguimiento.
2. Pacientes que se trasladen a otro centro hospitalario.

5.4 VARIABLES DE ESTUDIO

5.4.1 Variables independientes

- Expresión cualitativa de los genes de fusión BCR-ABL Mayor, BCR-ABL Menor, TEL-AML1, AF4-MLL, E2A-PBX1, AML1-ETO, y PML-RAR α .
- Expresión cualitativa de los antígenos testiculares de cáncer (ATC) MAGE-A3 y NY-ESO1.
- Expresión cualitativa de los genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2.
- Niveles de expresión de los genes ABC-B1.
- Niveles de expresión de los genes ABC-G2.

Tabla 17. Definición de variables independientes de estudio.

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Expresión de genes de fusión	Identificación de los genes por RT-PCR	Cualitativa	Nominal dicotómica	Presencia/ Ausencia
Expresión de genes ATC	Identificación de los genes por RT-PCR	Cualitativa	Nominal dicotómica	Presencia/ Ausencia
Expresión de genes ABC	Identificación de los genes por RT-PCR	Cualitativa	Nominal dicotómica	Presencia/ Ausencia
Niveles de expresión de los genes ABC-B1	Cuantificación relativa de niveles de expresión por qRT-PCR	Cuantitativa	Nominal	Ausente Normal Sobreexpresado
Niveles de expresión de los genes ABC-G2	Cuantificación relativa de niveles de expresión por qRT-PCR	Cuantitativa	Nominal	Ausente Normal Sobreexpresado

5.4.2 Variables dependientes

- Determinación de grupos de riesgo de acuerdo a la detección de marcadores moleculares pronósticos.
- Determinación de blancos moleculares para el tratamiento de las neoplasias

5.5 METODOLOGÍA

5.5.1 Material biológico

5.5.1.1 Aspirado de médula ósea (MO) de pacientes con leucemia

A los pacientes con probable diagnóstico de leucemia se les realizó un aspirado de MO para el análisis citomorfológico y de biología molecular. El diagnóstico morfológico de leucemia se realizó en el laboratorio de Hematología especial del servicio de Hematología del HGM.

5.5.1.2 Aspirado de MO normocelular

Se obtuvieron muestras de MO normocelular de pacientes sin diagnóstico de neoplasias hematológicas y sin alteraciones morfológicas. Estas fueron utilizadas como controles negativos de la expresión de genes de fusión y antígenos testiculares de cáncer (ATC); así también se utilizaron para establecer niveles de expresión normal de los genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2.

5.5.1.3 Sangre periférica (SP) de donadores sanos

Se obtuvieron muestras de SP de individuos sanos del Banco de Sangre del HGM para la obtención de controles negativos de la expresión de genes de fusión y ATC; de igual manera se utilizaron para evaluar y establecer los niveles de expresión de los genes ABC.

5.5.1.4 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares K-562 [LMC, positiva para BCR-ABL Mayor (BCR-ABL M), MAGE-A3, NY-ESO1, ABC-B1, ABC-G2], SUP-B15 [LAL Ph+, positiva para BCR-ABL menor (BCR-ABL m)]; REH (LAL no T, no B, positiva para TEL-AML1), RS-4 (LAL, positiva para AF4-MLL), NB-4 (LAM-M3, positiva para PML-RAR α) y Kasumi-1 (LAM-M2, positiva para AML1-ETO), como controles positivos de la expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC. Dichas células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA), piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratories), penicilina/estreptomicina 1% (Gibco, Life Technologies). Las células crecieron en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C; fueron cosechadas para preparar alícuotas de 1-2 x10⁶células para extracción de RNA.

5.5.2 Separación de leucocitos de MO de pacientes, normocelulares y SP de donadores sanos

Se mezclaron las muestras de MO en proporción 1:5 con solución lítica (solución hipertónica) causando lisis eritrocitaria. Las muestras se incubaron durante 5' a 4°C y se centrifugaron a 2000 rpm/5'. Se formaron botones leucocitarios y se eliminó el sobrenadante (lisado eritrocitario). Los leucocitos se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron a 2000 rpm/5'. Los leucocitos fueron alícuotados en paquetes de aproximadamente 1 - 2 x 10⁶células.

5.5.3 Extracción de RNA total de leucocitos y líneas celulares

El RNA total fue aislado mediante el uso de Solución D (Chomczynski-Sacchi). Se homogenizaron los paquetes celulares con 550 μL de Solución D y se incubó durante 10' a 4°C. Se adicionó consecutivamente 150 μL de solución de ácido acético/acetato de sodio 2M, pH=3; 500 μL de solución de fenol/agua (1:1); y 200 μL de cloroformo/alcohol isoamilico (49:1); se homogenizó vigorosamente durante 15'' en vortex. Se centrifugó a 12,000 rpm/15' a 4°C. Después de la centrifugación se observaron tres fases: una fase fenólica (orgánica) inferior; una interfase (DNA y proteínas precipitadas), y una fase superior acuosa (RNA soluble); se separó esta última y se mezcló con isopropanol, incubando a -20°C/1 hora para precipitar el RNA. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm/15' a 4°C; el botón obtenido se lavó con etanol al 75%, centrifugando a 8,000 rpm/7' a 4°C, luego se secó el botón a temperatura ambiente y se resuspendió en agua inyectable. Para eliminar estructuras secundarias del RNA, se linealizó incubando a 70°C/10'¹⁰⁷.

5.5.4 Determinación de la integridad y cuantificación del RNA

Se determinó la concentración y pureza del RNA total mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). La integridad del RNA se corroboró mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, cargando 2 μL de RNA mezclado con 2 μL de buffer de carga y 2 μL de TAE 1X; corriendo en cámara de electroforesis durante 40' a 70 volts. En el gel se observaron las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal (rRNA) que confirma la integridad. El RNA se almacenó a -80°C hasta ser requerido.

5.5.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

El cDNA de los pacientes, individuos sanos y líneas celulares, se sintetizó a partir de 2500 ng de RNA total a un volumen final de 25 μL . El RNA se mezcló con 1 μL de Oligo dT (PROMEGA, Madison WI, USA) y el volumen correspondiente de H₂O inyectable; se incubó a 70°C/10'. Luego se añadieron 6 μL de buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH=8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 10mM DTT) (PROMEGA, Madison WI, USA), 3 μL de dNTPs 10 μM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) y 1 μL de transcriptasa reversa MML-V (200 U/ μL) (PROMEGA, Madison WI, USA) incubando a 37°C/50'. La enzima MML-V se inactivó incubando la muestra a 70°C/10'.

En el caso de los pacientes con LMC en la reverso transcripción se agregó 1.5 μL de oligo específico 3' (Reverse) del transcrito de BCR-ABL M siguiendo las condiciones ya mencionadas.

El cDNA se almacenó a -80°C hasta su utilización.

5.5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction) de biomarcadores

Las reacciones de amplificación de los biomarcadores se prepararon de la siguiente manera.

Tabla 18. Composición de los sistemas de PCR para biomarcadores.

	5X Buffer	MgCl ₂ (25mM)	dNTPs (10mM)	Oligo Fw (10 μM)	Oligo Rw (10 μM)	DNA Polimerasa	cDNA	Volumen final
GAPDH	2.5 μL	1.3 μL	0.3 μL	0.4 μL	0.4 μL	0.1 μL	1.5 μL	11 μL
B-2-M								
BCR-ABL M								
E2A-PBX1								
TEL-AML1								
AF4-MLL								
PML-RAR α								
AML-ETO								
MAGE-A3								
ABC-B1								
ABC-G2								
NY-ESO1			0.4 μL	0.7 μL	0.7 μL			11.9 μL
BCR-ABL m	3.8 μL	1.2 μL	0.6 μL	0.6 μL	0.6 μL			20 μL

Se utilizó GAPDH y β -2-Microglobulina como genes constitutivos para determinar integridad del material genético de cada muestra analizada. Las condiciones de amplificación se describen con más detalle en la Tabla 19.

Tabla 19. Perfiles térmicos para amplificación de biomarcadores.

Gen	Fragmento(pb)	Condiciones de amplificación
GAPDH	221	Desnaturalización: 94°C/5'. Amplificación: 94°C/45'', 60°C/45'', 72°C/45'' Elongación: 72°C/10'. Templado: 4°C /10'
B2M	397	
BCR-ABL M	304	
TEL-AML1	103	
AF4-MLL	156	
E2A-PBX1	105	
PML-RAR α	127	
ABC-B1	221	
ABC-G2	206	

MAGE-A3	725	Desnaturalización: 94°C/5'. Amplificación: 94°C/45'', 60°C/45'', 72°C/45'' (35 ciclos), Elongación: 72°C/10', Templado: 4°C/10'.
NY-ESO1	302	
BCR-ABL m	150	Desnaturalización: 94°C/5'. Amplificación: 94°C/45'', 56°C/45'', 72°C/45'' (35 ciclos), Elongación: 72°C/10', Templado: 4°C/10'.
AML1-ETO	95	Desnaturalización: 94°C/5'. Amplificación: 94°C/45'', 61.7°C/45'', 72°C/45'' (35 ciclos), Elongación: 72°C/10', Templado: 4°C/10'.

5.5.7 qRT-PCR para genes de resistencia a drogas ABC-B1 Y ABC-G2

Para establecer los niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas, se usaron 1.5 μL de cDNA, 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), 0.2 μL de oligo Forward (10 μM) y 0.2 μL de oligo Reverse (10 μM) a un volumen final de 20 μL ajustado con agua libre de nucleasas (NFW, Nuclease Free Water). El perfil térmico utilizado fue el mismo que se utilizó para PCR punto final. Se utilizó como gen endógeno β -2-microglobulina y como muestra de referencia K562. La determinación de los niveles de expresión se obtuvieron con el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ en el equipo Step One™ Applied Biosystems®.

6 RESULTADOS

Se incluyó una población de 90 pacientes del servicio de hematología del HGM (37 con LAL, 18 con LAM, 24 con LMC y 11 con LMC Subsecuentes); de los cuales 14 pacientes con LAL fueron excluidos del estudio (13 por ausencia de expediente clínico y 1 por material biológico insuficiente). Dos pacientes más fueron excluidos por material genético insuficiente (un paciente con LAM y otro con LMC). Por lo tanto, la población final fue de 74 pacientes (23 con LAL, 17 con LAM, 23 con LMC y 11 con LMC Subsecuentes).

6.1 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO

Se aisló RNA de la totalidad de las muestras, observando las bandas características del RNA ribosomal 28S y 18S (Figura 22)

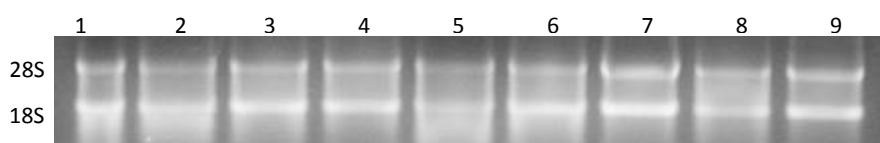


Figura 22. Determinación de la integridad de RNA. Carril 1–3: líneas celulares; carril 4-6 individuos sanos; carril 7–9: pacientes.

La eficiencia de la síntesis de cDNA se corroboró amplificando los genes β -2-microglobulina (B-2-M) y GAPDH (394 pb y 221 pb respectivamente).

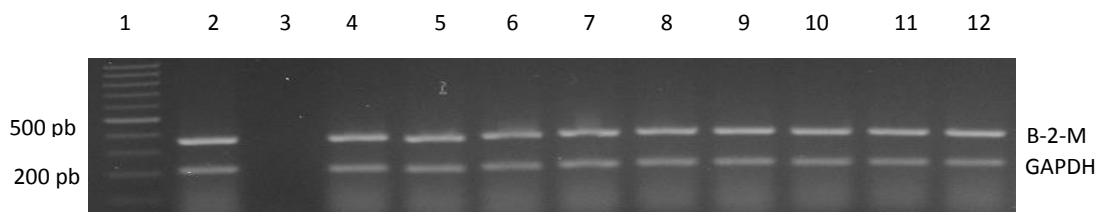


Figura 23. Amplificación de los genes constitutivos genes β -2-microglobulina y GAPDH. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: Control positivo (K562); carril 3: Control negativo (H2O); carril 4 – 6: líneas celulares; carril 7 -9: individuos sanos; carril 10 - 12: Muestras problema (líneas celulares, individuos sanos y pacientes).

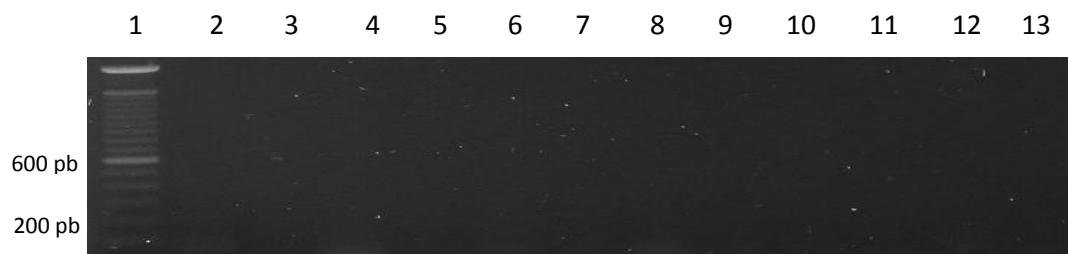


Figura 24. Controles de reacción. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (-) y GAPDH (-); carril 3: BCR-ABL M(-); carril 4: BCR-ABL m (-); carril 5: E2A-PBX1(-); carril 6: TEL-AML1(-); carril 7: AF4-MLL1(-); carril 8: PML-RAR α (-); carril 9: AML1-ETO(-); carril 10: MAGE-A3(-); carril 11: NY-ESO1(-); carril 12: ABC-B1 (-); carril 13: ABC-G2 (-).

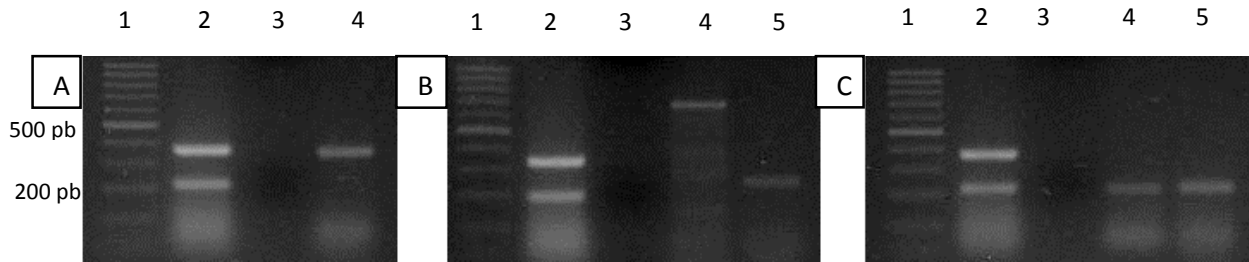


Figura 25. Controles positivos obtenidos a partir de la línea celular K562. A) Control positivo BCR-ABL M. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221pb); carril 3: control de reacción; carril 4: BCR-ABL M (304 pb). B) Controles positivos ATC. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: control de reacción; carril 4: MAGE-A3 (725 pb); carril 5: NY-ESO1 (302 pb). C) Controles positivos ABC. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: control de reacción; carril 4: ABC-B1 (201 pb); carril 5: ABC-G2 (206 pb).

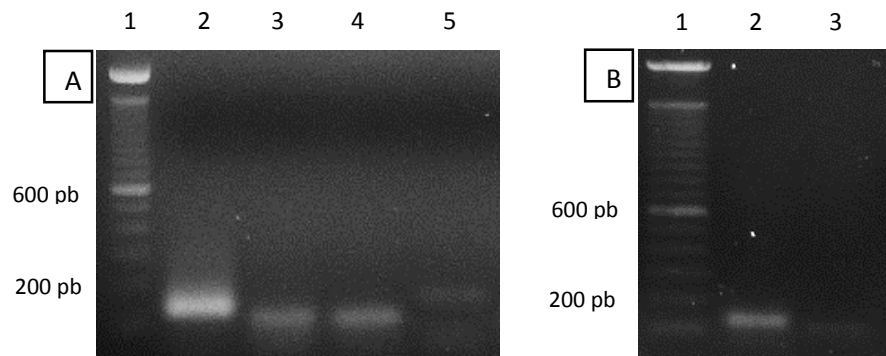


Figura 26. Controles positivos de translocaciones en leucemias agudas. A) Controles positivos de LAL. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: BCR-ABL m (150 pb); carril 3: TEL-AML1 (103 pb); carril 4: E2A-PBX1 (105 pb); carril 5: AF4-MLL (156 pb). B) Controles positivos de LAM. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: PML-RAR α (127 pb), AML1-ETO (95 pb)

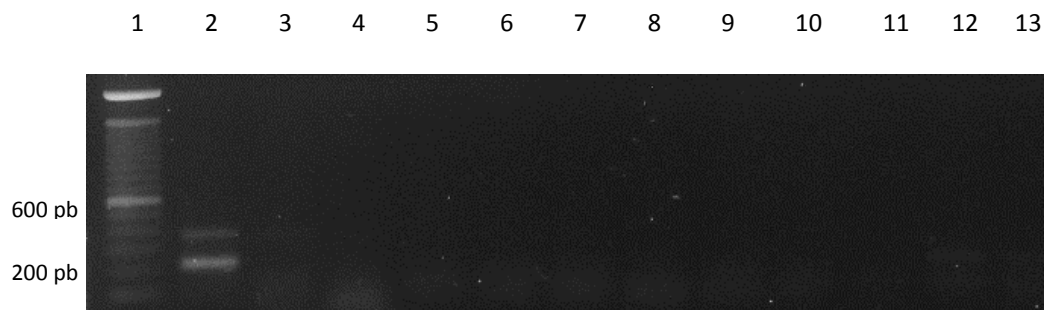


Figura 27. Biomarcadores en individuos sanos. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397pb) y GAPDH (221); carril 3: BCR-ABL M(-); carril 4: BCR-ABL m (-); carril 5: E2A-PBX1(-); carril 6: TEL-AML1(-); carril 7: AF4-MLL1(-); carril 8: PML-RAR α (-); carril 9: AML1-ETO(-); carril 10: MAGE-A3 (-); carril 11: NY-ESO1(-); carril 12: ABC-B1 (201 pb); carril 13: ABC-G2 (206 pb).

6.2 EXPRESIÓN DE GENES DE FUSIÓN, ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (ATC) Y GENES DE RESISTENCIA A DROGAS (ABC) EN MÉDULA ÓSEA (MO) NORMOCELULAR Y DONADORES SANOS

Se corroboró que no existe expresión de los biomarcadores (a excepción de los genes ABC), en individuos sanos, esto al determinar el panel en SP de 10 donadores clínicamente sanos y 6 MO normocelulares, como se muestra en la Figura 27.

Para los genes ABC, se determinó un rango de expresión normal para ABC-B1 y ABC-G2 en 68 muestras de donadores sanos mediante qRT-PCR para obtener niveles de expresión fisiológicos.

Se determinó que el 36.8% (25/68) de los individuos sanos tuvieron ausencia de ABC-B1, y 63.2% (43/68) fueron positivos, presentando un nivel medio de expresión de 0.298 (rango 0.143 – 0.528) (Gráfico 1). El valor de los percentiles fue $p_{25} = 0.184$, $p_{50} = 0.274$ y $p_{75} = 0.396$, siendo p_{75} el valor el límite superior para considerar valores de expresión normales (Gráfico 2).

El gen ABC-G2 estuvo ausente en 29.4% (20/68) de los individuos, es decir, fue positivo en el 70.6% (48/68), con un nivel medio de expresión de 0.481 (0.283 – 0.647) (Gráfico 1). El valor de los percentiles fue $p_{25} = 0.283$, $p_{50} = 0.488$, $p_{75} = 0.647$, siendo el valor de p_{75} el límite superior para considerar valores de expresión normales (Gráfico 2).

Realizando una comparación gráfica de los niveles de ABC-B1 vs ABC-G2 en individuos sanos se observa el siguiente comportamiento.

Gráfico 1. Determinación de los niveles de expresión de los genes ABC en donadores sanos.

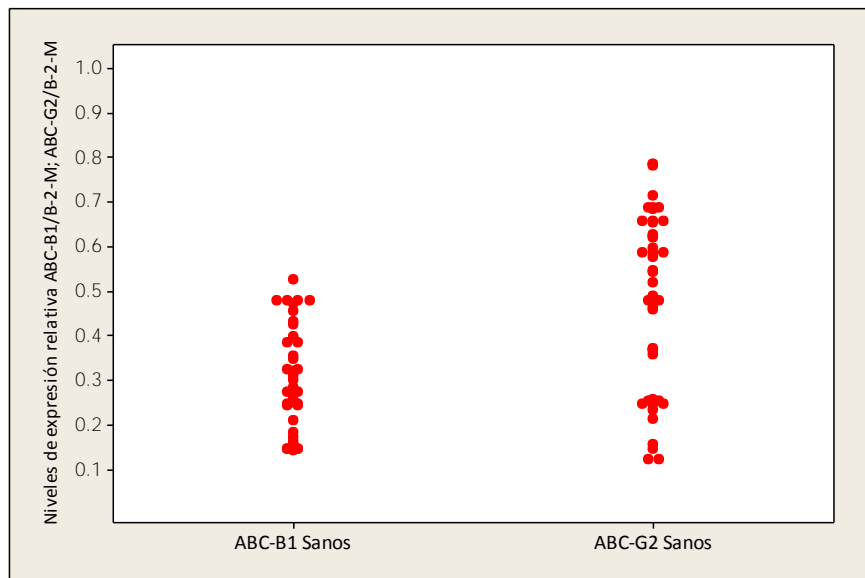
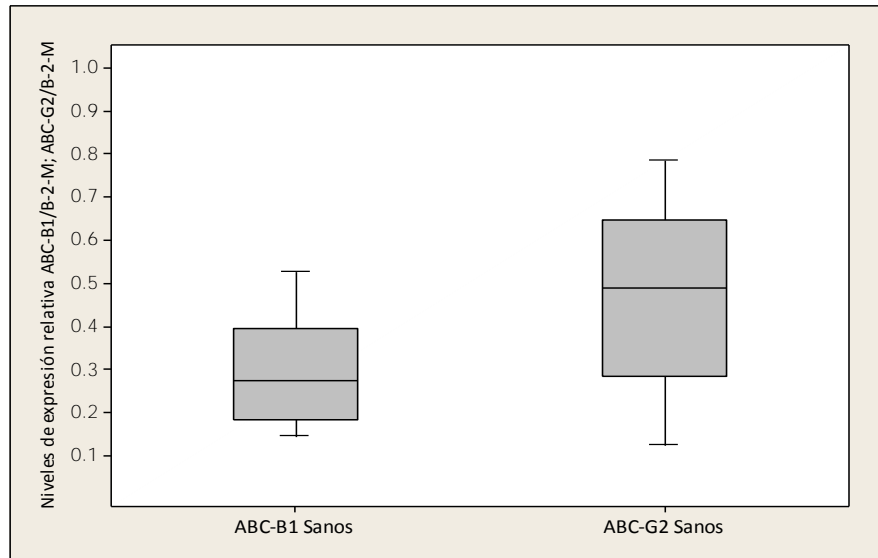
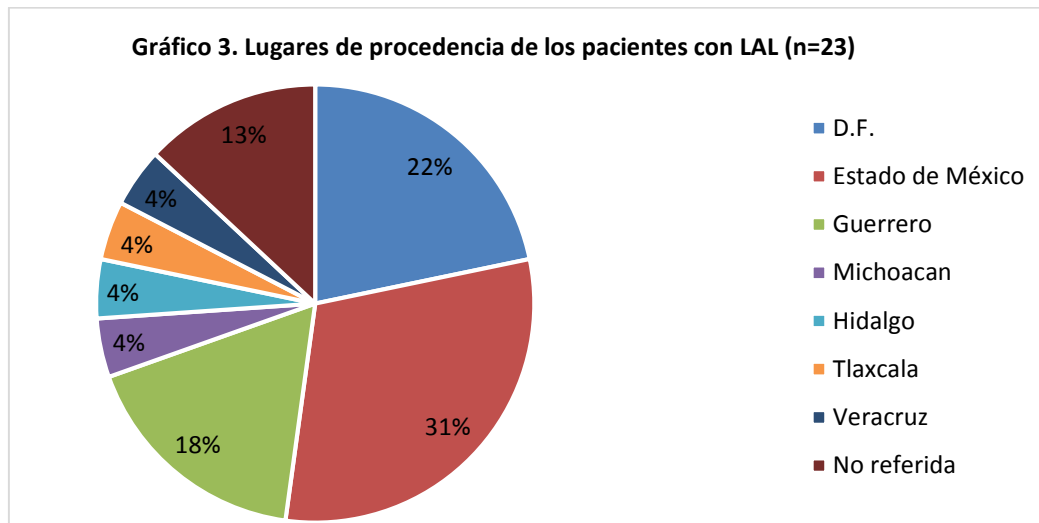


Gráfico 2. Determinación de cuartiles de los valores de expresión de genes ABC en donadores sanos.

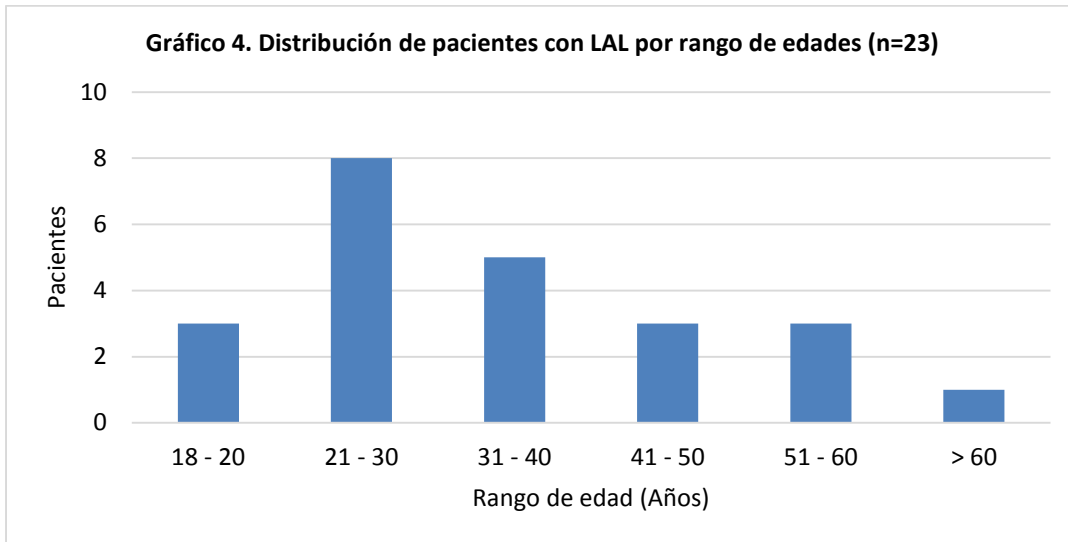


6.3 CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICO-PATOLÓGICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOIDE (LAL)

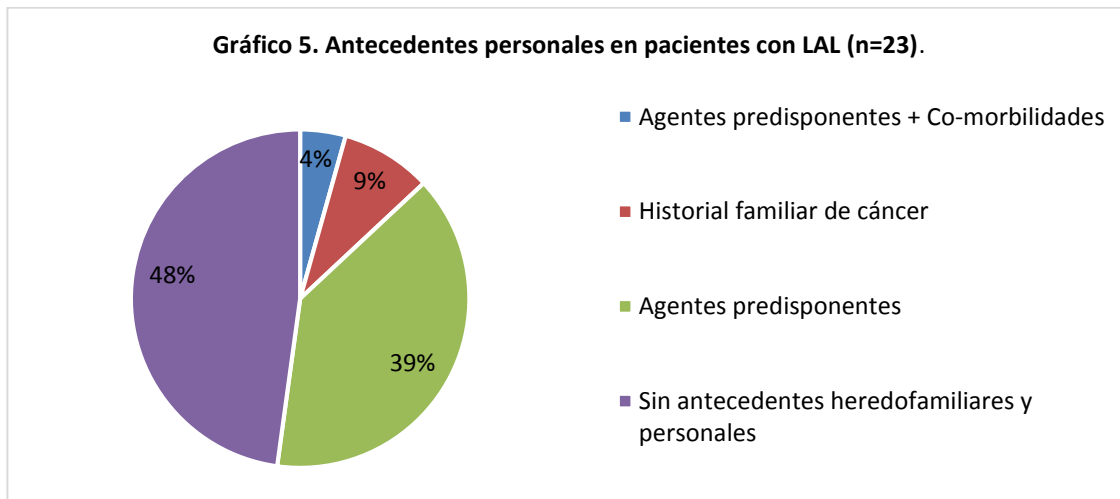
Se llevó a cabo el estudio de una población de 23 pacientes (15 hombres y 8 mujeres), procedentes de diversas regiones del país, siendo predominantes (30.4%) los pacientes procedentes del Estado de México (7/23) (Gráfico 3).



La media de edades de los sujetos fue de 34.1 años (18 - 61 años), siendo el intervalo de 21 a 30 años el que más elementos conjuntó (Gráfico 4).

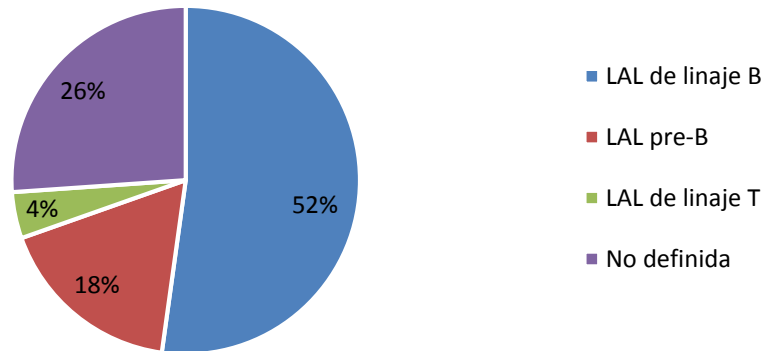


El 39.1% (9/23) de los individuos analizados refirieron contacto con agentes tóxicos (alcoholismo, tabaquismo, exposición a fertilizantes, radiación, herbicidas, insecticidas, marihuana y solventes); 8.7% (2/23) reportaron historial familiar de cáncer; un paciente (4.3%) presentó co-morbilidad con Diabetes Mellitus tipo 2 e Hipertensión Arterial Sistémica, aunado con alcoholismo; y el 47.8% restante (11/23) no refiere antecedentes heredo-familiares, co-morbilidades o contacto con agentes tóxicos de riesgo (Gráfico 5).



El estudio citomorfológico e inmunológico determinó que el 100% de los casos fueron Leucemia Aguda Linfoide del tipo L-2, de los cuales 52.2% (12/23) fueron de linaje B, un 17.4% (4/23) de tipo pre-B temprano; 4.3% (1/23) de linaje T, y 26.1% (6/23) no contaban con inmunofenotipo que definiera el linaje linfocitario afectado (Gráfico 6).

Gráfico 6. Clasificación inmunológica de los pacientes con LAL (n=23).

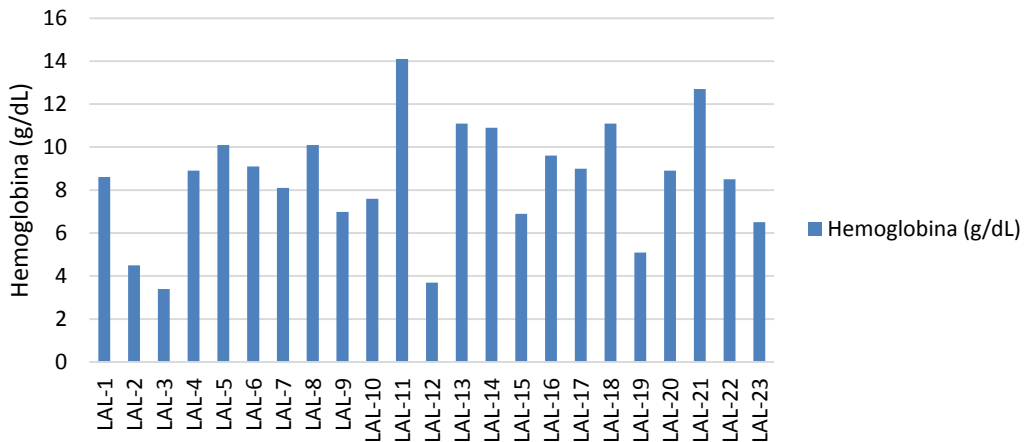


En sus cuentas leucocitarias se encontró un valor medio de 77.7×10^3 leucocitos/ μL ($0.4 - 406.2 \times 10^3$ leucocitos/ μL), hallando a 17.4% (4/23) co cuenta leucocitaria normal, 8.7% (2/23) leucopenia y 73.9% (17/23) leucocitosis (Tabla 20).

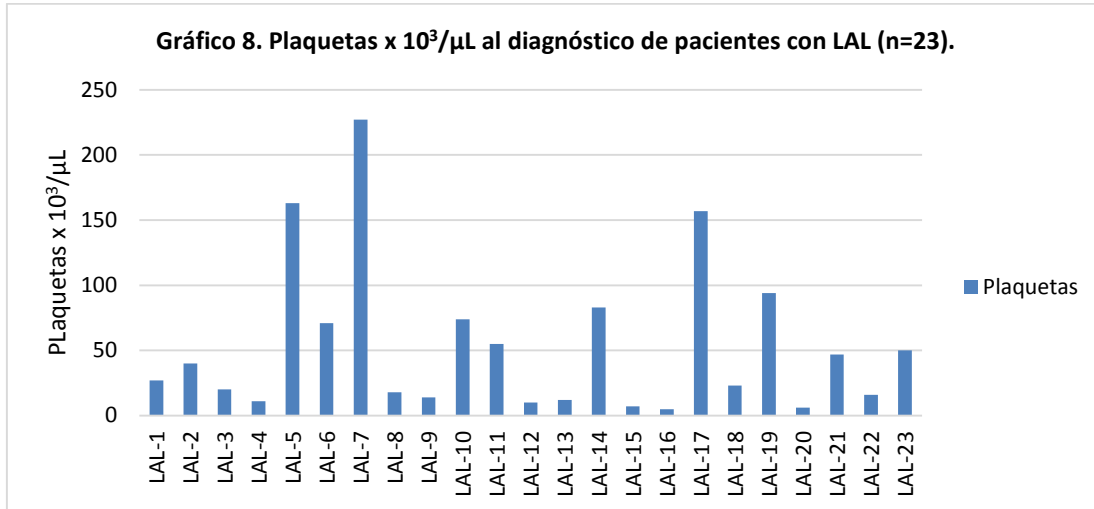
En el conteo diferencial se hallaron cifras de blastos en SP en el 52.2% (12/23) de los pacientes, con una media de 32.7% (0 - 99%) (Tabla 20).

Los valores de hemoglobina tuvieron una media de 8.5 g/dL (3.4 - 14.1 g/dL) (Tabla 20), presentándose anemia en 91.3% (21/23) de los casos; y valores normales en el 8.7% (2/23) (Gráfico 7).

Gráfico 7. Hemoglobina (g/dL) al diagnóstico en pacientes con LAL (n=23).

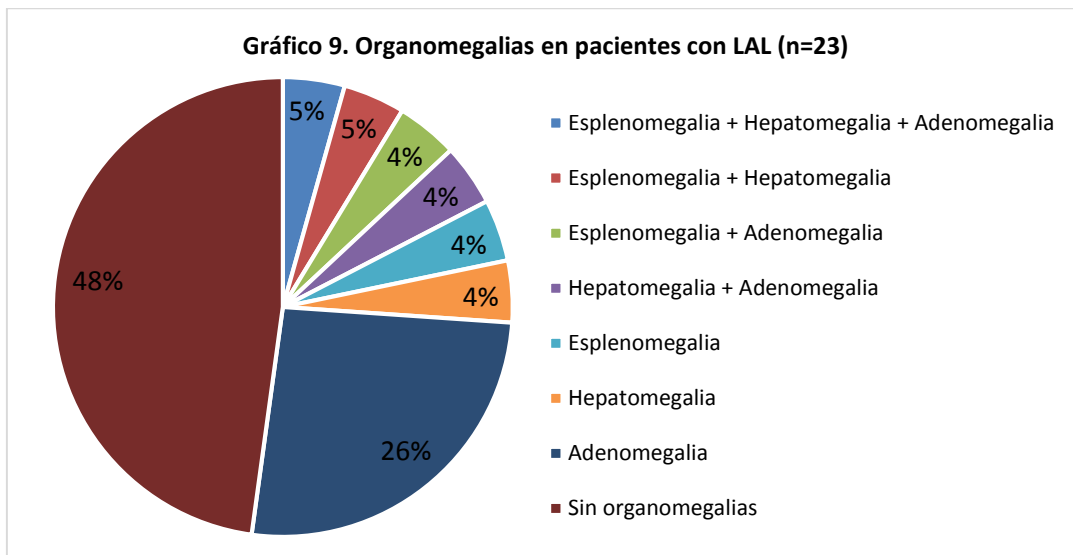


Las plaquetas tuvieron un valor medio de $53.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($5 - 227 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Tabla), encontrando trombocitopenia en 87% (20/23) de los pacientes y 13% (3/23) con valores normal (Gráfico 8).



Los valores de deshidrogenasa láctica (DHL) tuvieron una media de 935.8 U/L (125 -5360 U/L) (Tabla 20), encontrando 21.7% (5/23) de los pacientes con valores normales y 78.3% (18/23) con valores elevados.

La frecuencia de las organomegalias presentadas por los pacientes se distribuyó como se describe en el Gráfico 9.



En las pruebas citogenéticas, se halló a 17.4% (4/23) de los pacientes con cariotipo normal (46 X,X ó 46 X,Y), 8.7% (2/23) con hiperdiploidías (48 – 60 cromosomas y >100 cromosomas), 4.3% (1/23) con hipodiploidía (38 – 45 cromosomas), 4.3% (1/23) no fueron valorables por ausencia de metafases y 65.2% no presentaron el estudio (Tabla 20).

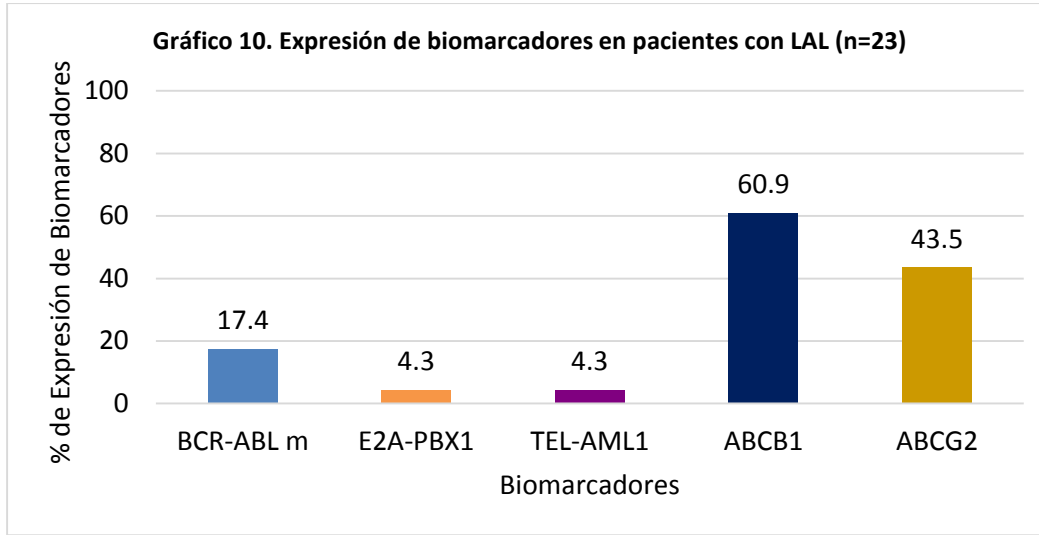
Tabla 20. Características clínico-patológicas de los pacientes con LAL (n=23) del HGM.

		N (%)	Media	Mínimo	Máximo
Edad (años)			53.5	18	61
	18 - 20	3 (13)			
	21 - 30	8 (34.8)			
	31 - 40	5 (21.7)			
	41 - 50	3 (13)			
	51 - 60	3 (13)			
	>60	1 (4.3)			
Sexo	Masculino	15 (65.2)			
	Femenino	8 (34.8)			
Leucocitos (x 10³/μL)			77.7	0.4	406.2
	<30	11 (47.8)			
	≥30	12 (52.2)			
%Blastos			32.6	0	99
Hemoglobina (g/dL)			8.5	3.4	14.1
Plaquetas			53.5	5	227
DHL (U/L)			935.8	125	5360
	<500	13 (56.5)			
	≥500	10 (43.5)			
Esplenomegalia	Si	4 (17.4)			
	No	19 (82.6)			
Hepatomegalia	Si	4 (17.4)			
	No	19 (82.6)			
Adenomegalia	Si	9 (39.1)			
	No	14 (60.9)			
Inmunofenotipo	No realizado	6 (26.1)			
	Linaje B	12 (52.2)			
	Pre B –Temprana	4 (17.4)			
	Linaje T	1 (4.3)			
Citogenética	No realizado	15 (65.2)			
	No valorable	1 (4.3)			
	Normal	4 (17.4)			
	Hiperdiploidia	2 (8.7)			
	Hipodiploidia	1 (4.3)			

6.4 FRECUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LAL

El 26.1 % (6/23) de los pacientes expresaron por lo menos un gen de fusión, siendo BCR-ABL m el de mayor frecuencia con 17.4% (4/23); seguido de E2A-PBX1 y TEL-AML1 con 4.3% respectivamente (1/23) y AF4-MLL al igual que los ATC estuvieron ausentes (Tabla 21). Es de suma importancia mencionar que en el laboratorio en donde se realizó este estudio, el único marcador que se determina rutinariamente en los pacientes con LAL es BCR-ABL m.

Para los genes de resistencia a drogas, ABC-B1 tuvo una frecuencia de 60.9% (14/23) y ABC-G2 de 43.5% (10/23) (Gráfico 10, Tabla 21).



Se detectó que el 21.7% (5/23) de pacientes presentaron co-expresión de al menos un gen de fusión y al menos un gen de resistencia a drogas; siendo 8.7% (2/23) los pacientes que expresaron BCR-ABL m y co-expresión con ABC-B1 y ABC-G2; 4.3% (1/23) presentó co-expresión de BCR-ABL m y ABC-B1; 4.3% (1/23) co-expresó TEL-AML1 con ABC-B1 y ABC-G2; 4.3% (1/23) se encontró con expresión de E2A-PBX1 y ABC-B1; y 4.3% (1/23) presentó BCR-ABL m sin expresión de genes de resistencia a drogas.

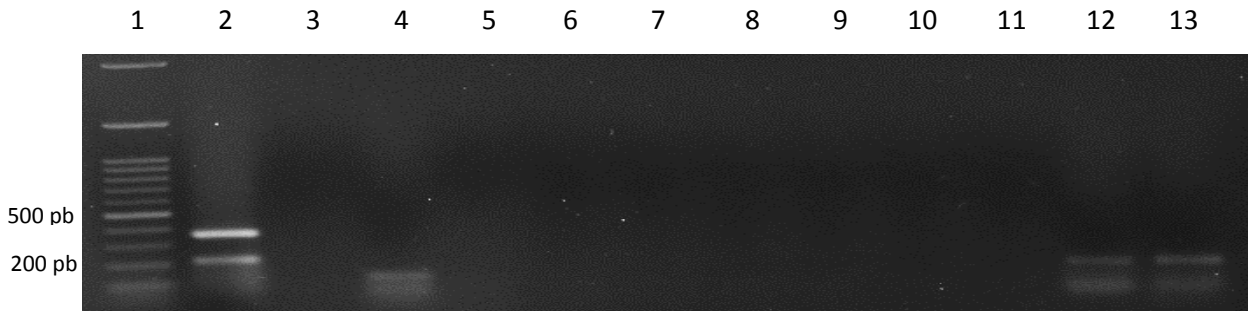


Figura 28. Determinación de biomarcadores en paciente con LAL. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β-2-microglobulina (394 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: BCR-ABL M(-); carril 4: BCR-ABL m (150 pb); carril 5: E2A-PBX1(-); carril 6: TEL-AML1(-); carril 7: AF4-MLL1(-); carril 8: PML-RARα(-); carril 9: AML1-ETO(-); carril 10: MAGE-A3(-); carril 11: NY-ESO1(-); carril 12: ABC-B1 (201 pb); carril 13: ABC-G2 (206 pb).

Por último, 30.4% (7/23) no presentaron expresión de ningún biomarcador (Tabla 21)

Tabla 21. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LAL (n=23)

	Biomarcadores										
	BCR ABL M	BCR ABL m	TEL AML1	E2A PBX1	AF4 MLL1	PML RARα	AML1 ETO	MAGE A3	NY ESO1	ABC B1	ABC G2
LAL-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
LAL-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAL-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LAL-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LAL-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-11	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAL-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAL-15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAL-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAL-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAL-22	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAL-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

6.5 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A DROGAS (ABC) EN PACIENTES CON LAL POR qRT-PCR

Con el estudio de qRT-PCR se encontró que ABC-B1 estuvo sobreexpresado en 21.7% (5/23), tuvo niveles normales en 39.1% (9/23), y estuvo ausente en 39.1% (9/23) (Grafico 11).

Gráfico 11. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL. (n=23)

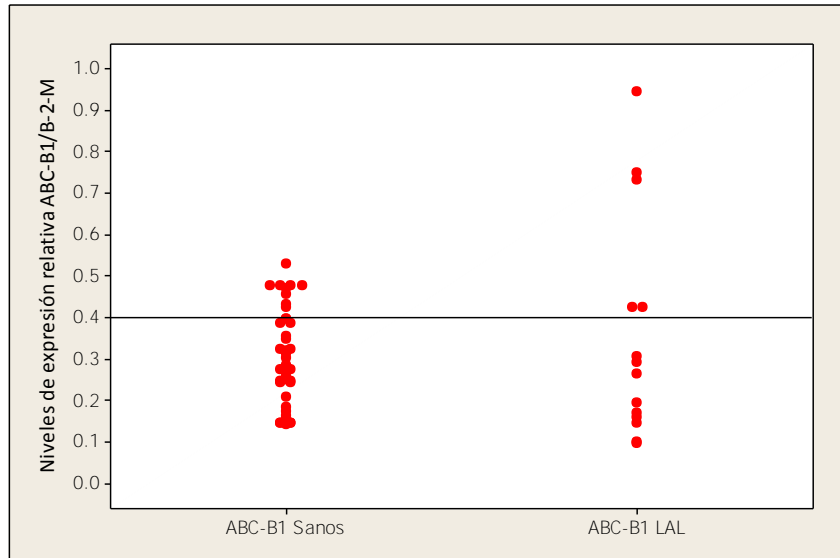
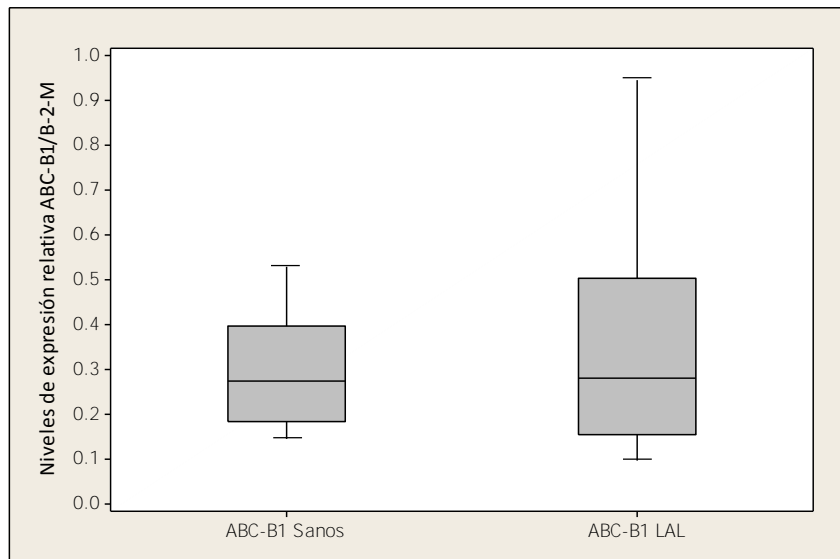


Gráfico 12. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL. (n=23)



Para el caso de ABC-G2 se determinó sobreexpresado en 4.3% (1/23), expresado de manera normal en 39.1% (9/23), y ausente en 56.2% (13/23) (Gráfico 13).

Gráfico 13. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL (n=23).

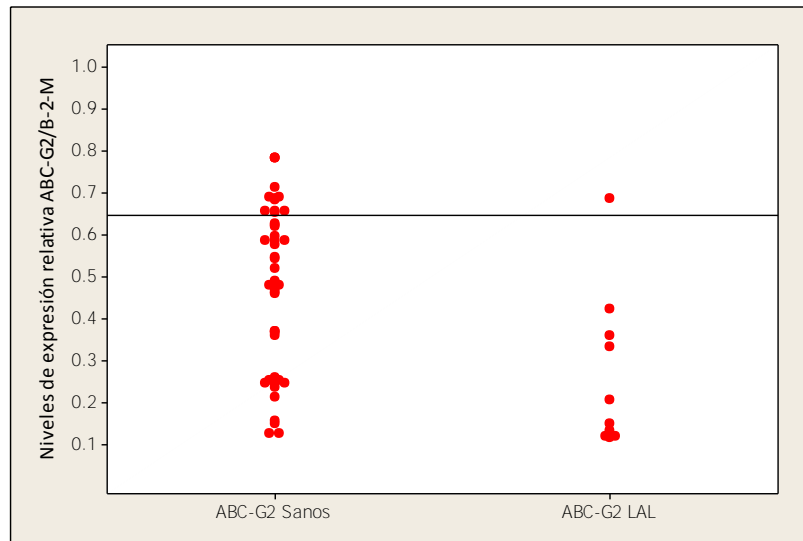
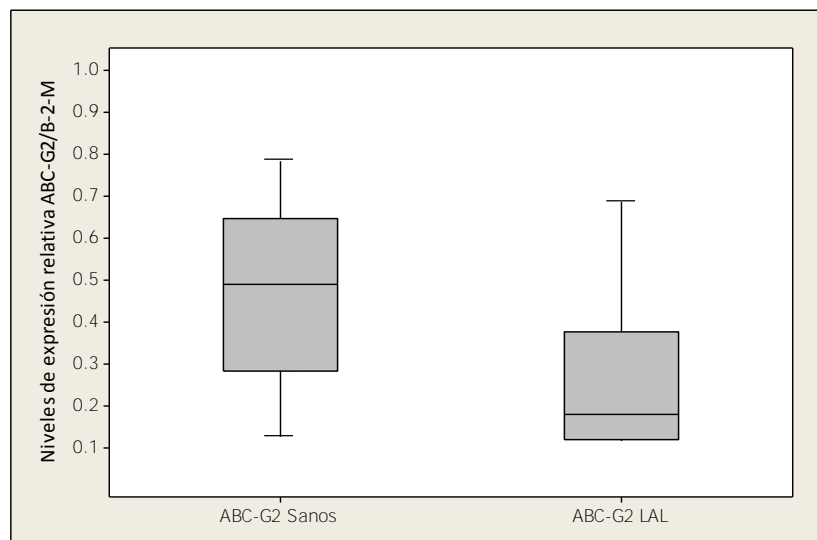


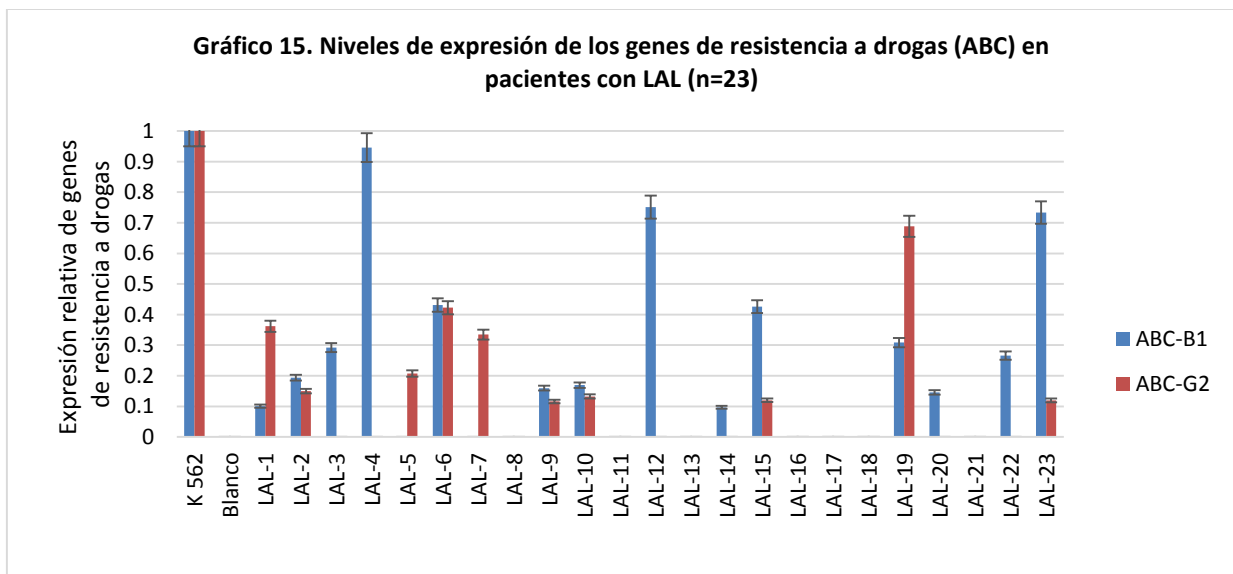
Gráfico 14. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAL (n=23).



Se observó también que 13% (3/23) de la población presentó ABC-B1 sobreexpresado con ABC-G2 normal, 8.7% (2/23) ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 ausente, 17.4% (4/23) ABC-B1 y ABC-G2 normales, 17.4% (4/23) ABC-B1 normal y ABC-G2 ausente, 4.3% (1/23) ABC-B1 normal y ABC-G2 sobreexpresado, y 8.7% (2/23) ABC-G2 normal con ABC-B1 ausente (Tabla 22).

Tabla 22 Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) pacientes con LAL (n=23).

Pacientes	Nivel de expresión relativa ABC-B1/B-2-M	Estratificación	Nivel de expresión relativa ABC-G2/B-2-M	Estratificación
LAL-1	0.100	Normal	0.361	Normal
LAL-2	0.193	Normal	0.149	Normal
LAL-3	0.292	Normal	0	Ausente
LAL-4	0.945	Sobreexpresión	0	Ausente
LAL-5	0	Ausente	0.207	Normal
LAL-6	0.425	Sobreexpresión	0.422	Normal
LAL-7	0	Ausente	0.334	Normal
LAL-8	0	Ausente	0	Ausente
LAL-9	0.159	Normal	0.116	Normal
LAL-10	0.169	Normal	0.132	Normal
LAL-11	0	Ausente	0	Ausente
LAL-12	0.751	Sobreexpresión	0	Ausente
LAL-13	0	Ausente	0	Ausente
LAL-14	0.096	Normal	0	Ausente
LAL-15	0.425	Sobreexpresión	0.119	Normal
LAL-16	0	Ausente	0	Ausente
LAL-17	0	Ausente	0	Ausente
LAL-18	0	Ausente	0	Ausente
LAL-19	0.308	Normal	0.688	Sobreexpresión
LAL-20	0.146	Normal	0	Ausente
LAL-21	0	Ausente	0	Ausente
LAL-22	0.266	Normal	0	Ausente
LAL-23	0.733	Sobreexpresión	0.119	Normal

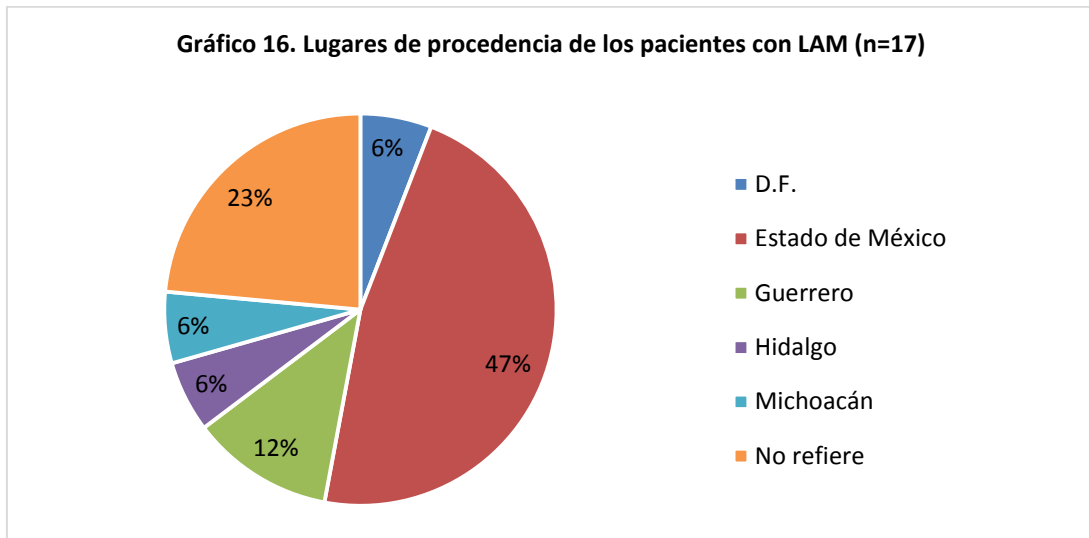


En cuanto a co-expresión de genes de fusión y genes de resistencia a drogas, 8.7% (2/23) tuvo expresión de BCR-ABL m con ABC-B1 y BC-G2 normales; 4.3% (1/23) expresó BCR-ABL m y

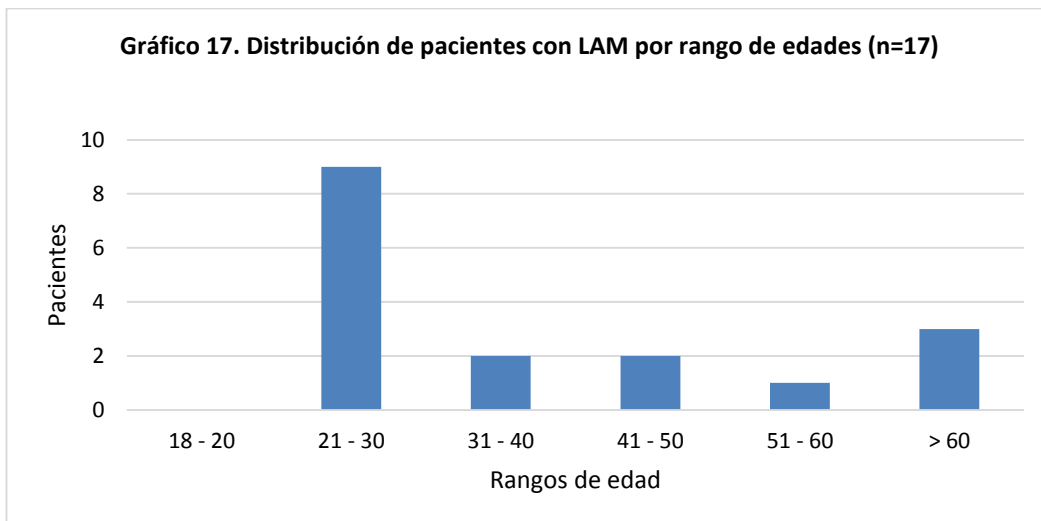
ABC-B1 normal; 4.3% (1/23) fue positivo para TEL-AML1 con ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 normal; y 4.3% (1/23) fue positivo para E2A-PBX1 con ABC-B1 normal.

6.6 CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICO-PATOLÓGICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA MIELOIDE (LAM)

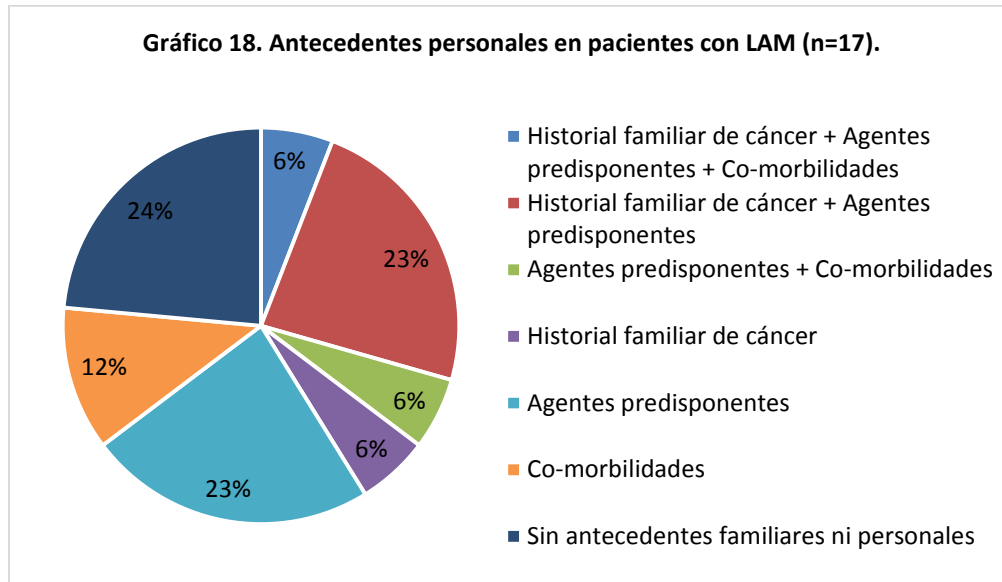
La población de estudio de LAM fue conformada por 17 pacientes (6 hombres y 11 mujeres), con procedencia del Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, D.F. y 23.5% (4/17) no especificaron su lugar de residencia. (Gráfico 16)



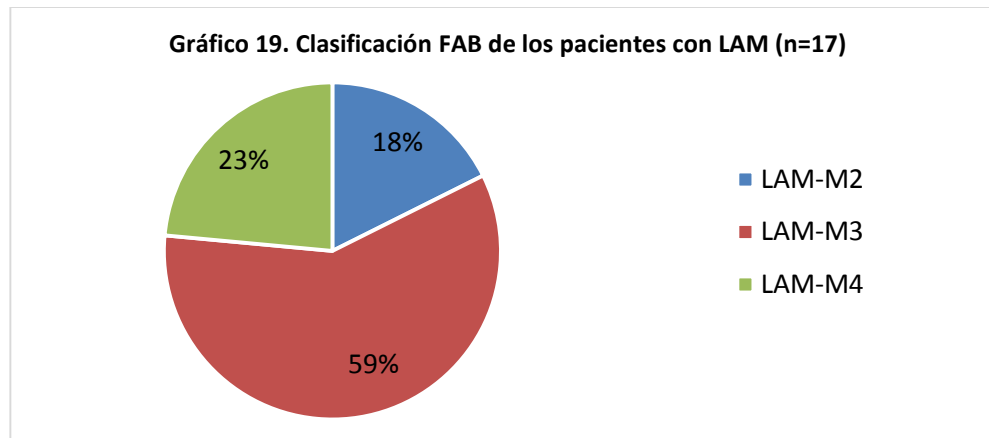
La edad media de los pacientes fue de 38.5 años (21 a 71 años), siendo 21 a 30 años el rango de edad que más elementos conjunta (Gráfico 17).



La referencia de historial familiar de cáncer, así como la presencia de co-morbilidades y exposición a agente predisponentes se describe a detalle en el Gráfico 18



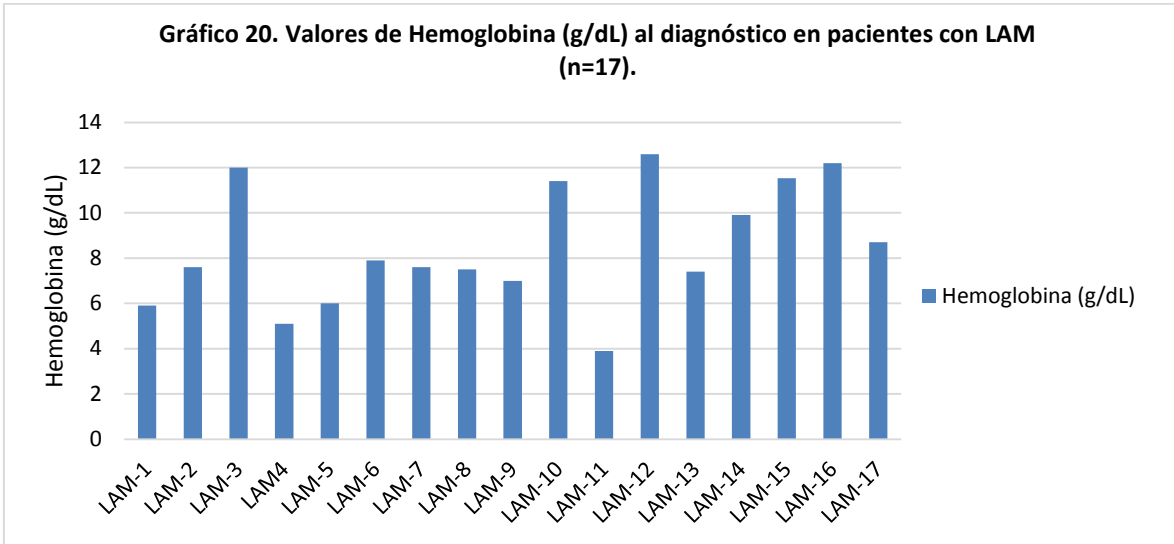
Los estudios de citomorfología e inmunofenotipo determinaron la clasificación FAB de los casos de estudio, teniendo 17.6% (3/17) con LAM-M2, 58.8% (10/17) con LAM-M3, y 23.5% (4/17) con LAM-M4 (Gráfico 19).



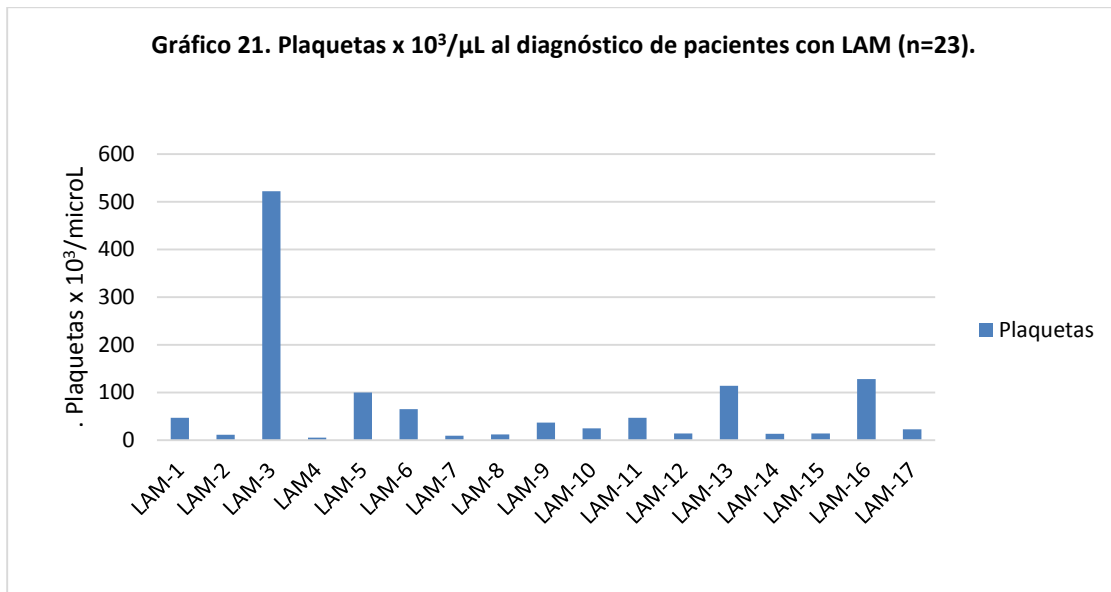
Al diagnóstico se encontró un valor medio de leucocitos de $41.3 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ($0.8 - 190 \times 10^3$ leucocitos/ μL), estableciendo que 41.2% (7/17) presentaron leucopenia, 52.9% (9/17) leucocitosis y 5.9% (1/17) valores normales (Tabla 23).

Se reportó la presencia de blastos circulantes en 29.4% (5/17) de los pacientes, obteniéndose un valor medio de 16.1% (0 -94%) (Tabla 23).

La determinación de hemoglobina mostró un valor medio de 8.5 g/dL (3.9 – 12.6 g/dL), observando 82.4% (14/17) de los pacientes con anemia (Tabla 23).

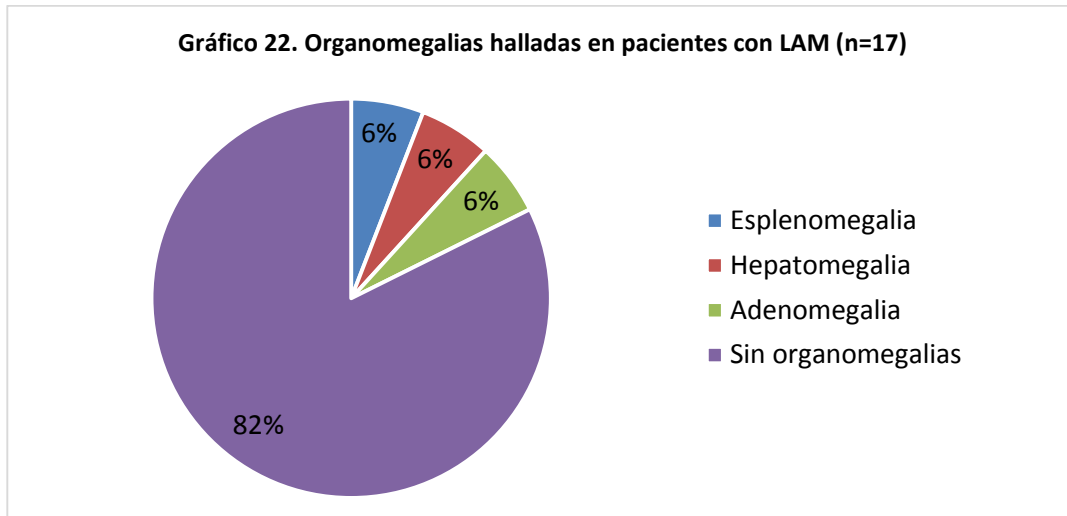


El valor medio de plaquetas fue de $69.8 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ($5 - 522 \times 10^3$ plaquetas/ μL), teniendo a 94.1% (16/17) de los pacientes con trombocitopenia y a 5.9% (1/17) con trombocitosis (Gráfico 21).



Los valores de DHL tuvieron un valor medio de 440.6 U/L (137 – 1282 U/L), mostrando 11.8% (2/17) de los sujetos con valores normales, 82.4% (14/17) con niveles elevados y al paciente restante (5.9%) no se le realizó la determinación (Tabla 23).

En los datos clínicos se halló un 5.9% (1/17) de los pacientes con esplenomegalia, 5.9% (1/17) con hepatomegalia y 5.9% (1/17) con adenomegalias, el resto de los pacientes no presentaron organomegalias (Gráfico 22).



En los estudios citogenéticos se encontró que 64.7% (11/17) de los pacientes no contaban con el estudio, 29.4% (5/17) presentaron citogenética normal (46 X,X ó X,Y), y 5.9% (1/17) presentó hiperdiploidía (>50 cromosomas).

Tabla 23. Características clínico-patológicas de los pacientes con LAM (n=17).

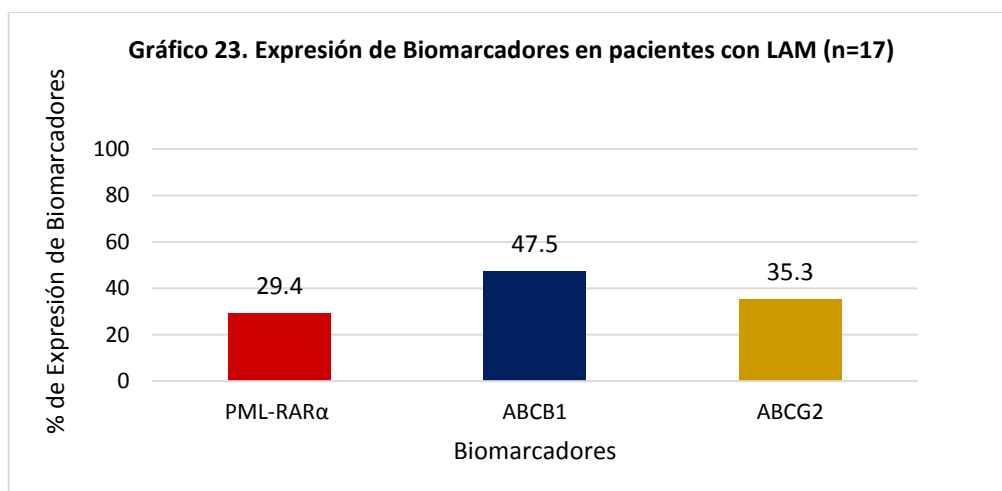
		N (%)	Media	Mínimo	Máximo
Edad (años)			38.5	21	71
	18 – 20	0			
	21 – 30	9 (52.9)			
	31 – 40	2 (11.8)			
	41 – 50	2 (11.8)			
	51 – 60	1 (5.9)			
	>60	3 (17.6)			
Sexo	Masculino	6 (35.3)			
	Femenino	11 (64.7)			
Leucocitos (x 10³/μL)			41.3	0.8	190
	<30	10 (58.8)			
	≥30	7 (41.2)			
%Blastos			16.1	0	94
Hemoglobina (g/dL)			8.5	3.9	12.6
Plaquetas			69.8	5	522
DHL (U/L)			440.6	137	1282
	No determinada	1 (5.9)			
	<500	12 (70.6)			
	≥500	4 (23.5)			
Esplenomegalia	Si	1 (5.9)			
	No	16 (94.1)			
Hepatomegalia	Si	0			
	No	17 (100)			
Adenomegalia	Si	2 (11.8)			
	No	15 (88.2)			

Inmunofenotipo	LAM-M2	3 (17.6)
	LAM-M3	10 (58.8)
	LAM-M4	5 (23.5)
Citogenética	No realizado	11 (64.7)
	Normal	5 (29.4)
	Hiperdiploidia	1 (5.9)

6.7 FRECUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LAM

Se encontró en la población de estudio una frecuencia de expresión del gen de fusión PML-RAR α (isoforma bcr1) de 29.4% (5/17); AML1-ETO y los ATC no se hallaron en ninguno de los 17 pacientes.

En lo que se refiere a la expresión de los genes de resistencia a drogas 52.9% (9/17) de los pacientes expresaron al menos un gen de resistencia (ABC-B1 y/o ABC-G2), de los cuales 29.4% (5/17) tuvieron co-expresión de ambos, 47.5% (8/17) expresó ABC-B1 y 35.3% (6/17) ABC-G2 (Gráfico 23).



Se encontró en 5.9% (1/17) de los pacientes co-expresión de PML-RAR α con ABC-B1 y ABC-G2, y 23.5% (4/17) presentó solamente PML-RAR α . El 47.1% de los pacientes no presentaron expresión de ningún biomarcador (Tabla 24).

Tabla 24. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LAM (n=17)

	Biomarcadores										
	BCR ABL M	BCR ABL m	TEL AML1	E2A PBX1	AF4 MLL1	PML RAR α	AML1 ETO	MAGE A3	NY ESO1	ABC B1	ABC G2
LAM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAM-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAM-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LAM-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LAM-8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
LAM-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAM-10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LAM-11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LAM-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAM-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAM-15	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LAM-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
LAM-17	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

6.8 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A DROGAS (ABC) EN PACIENTES CON LAM POR qRT-PCR

Con el estudio de qRT-PCR se pudo determinar ABC-B1 sobreexpresado en 23.5% (4/17), normal en 23.5% (4/17), y ausente en 53% (9/17) (Gráfico 24).

Gráfico 24. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)

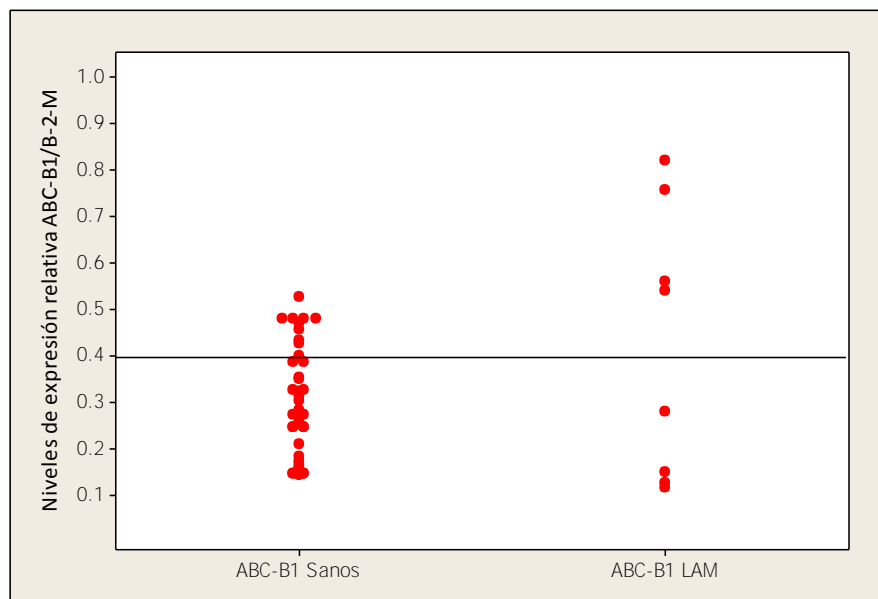
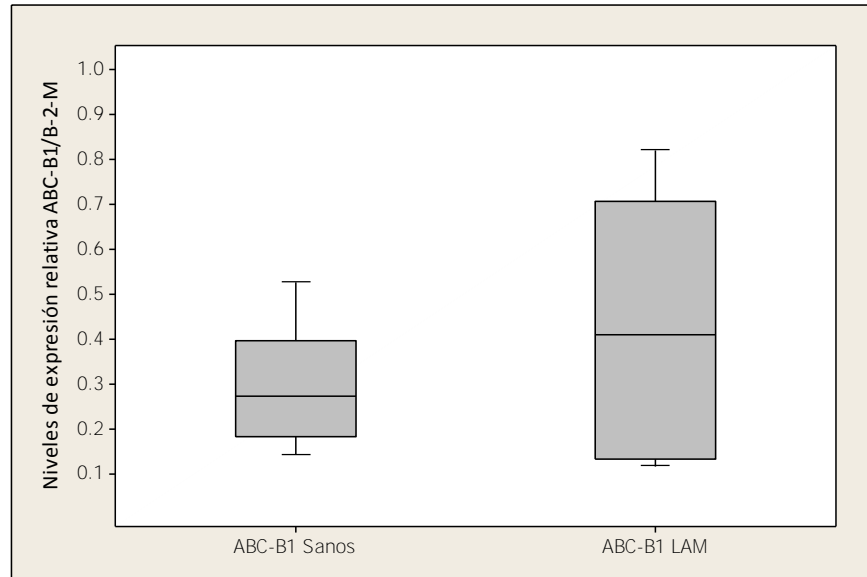


Gráfico 25. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)



Se estableció también que ninguno de los 17 pacientes tuvieron sobreexpresión de ABC-G2, mientras que 35.3% (6/17) tuvo niveles normales, y 64.7% (11/17) lo tuvieron ausente (Gráfico 26).

Gráfico 26. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)

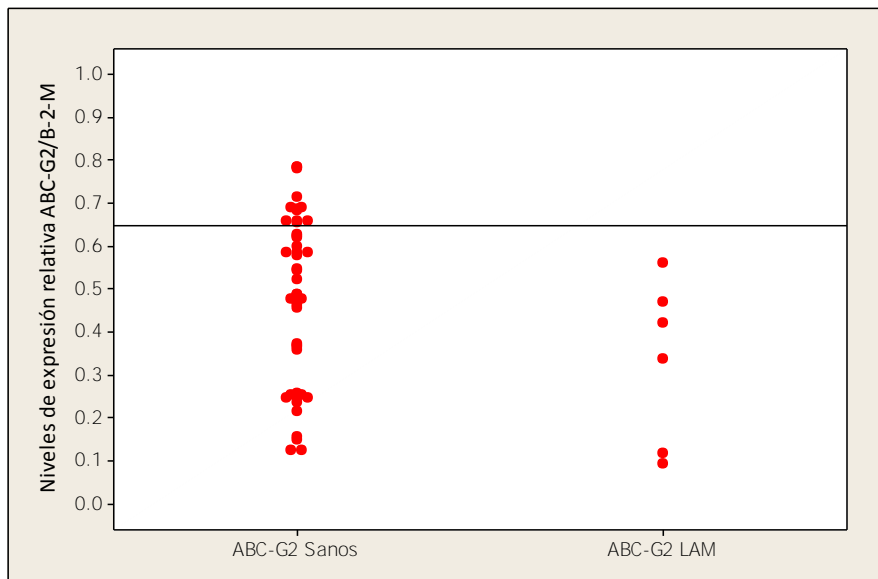
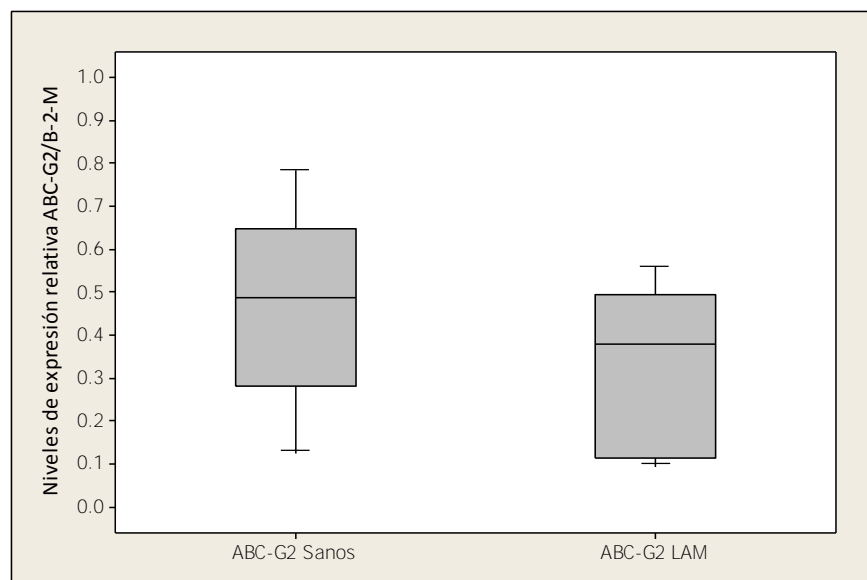


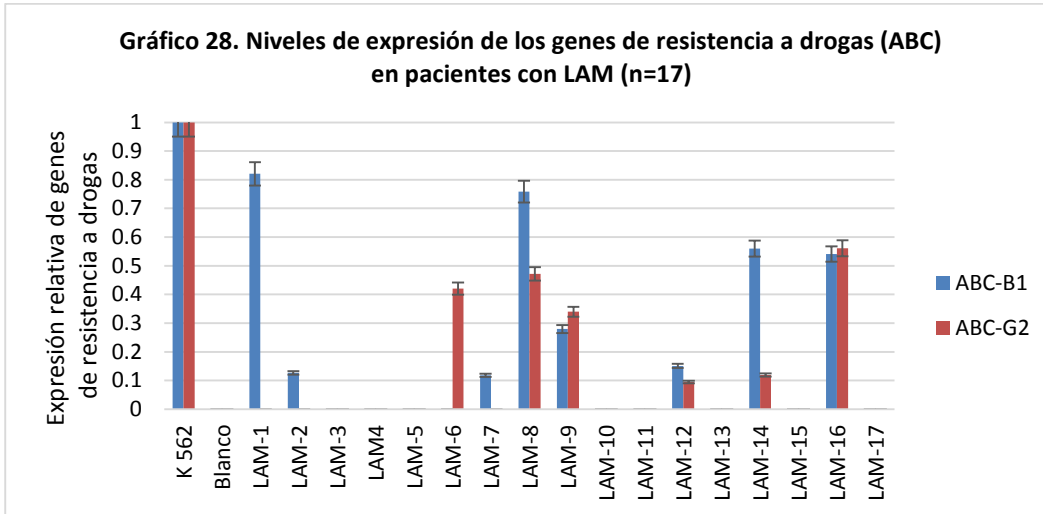
Gráfico 27. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LAM. (n=17)



Se halló 29.4% (5/17) con ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 normal; 11.8% (2/17) con ABC-B1 y ABC-G2 normales; 5.9% (1/17) con ABC-B1 sobreexpresado; 11.8% (2/17) con ABC-B1 normal; y 5.9% (1/17) expresó ABC-G2 de manera normal (Tabla 25).

Tabla 25. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LAM (n=17)

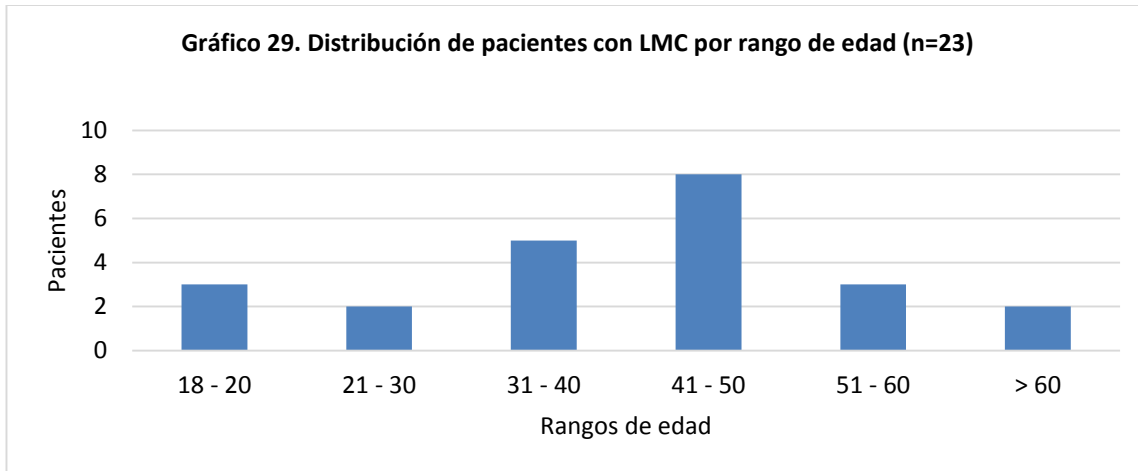
Pacientes	Nivel de expresión relativa ABC-B1/B-2-M	Estratificación	Nivel de expresión relativa ABC-G2/B-2-M	Estratificación
LAM-1	0.820	Sobreexpresión	0	Ausente
LAM-2	0.126	Normal	0	Ausente
LAM-3	0	Ausente	0	Ausente
LAM-4	0	Ausente	0	Ausente
LAM-5	0	Ausente	0	Ausente
LAM-6	0	Ausente	0.420	Normal
LAM-7	0.117	Normal	0	Ausente
LAM-8	0.758	Sobreexpresión	0.471	Normal
LAM-9	0.279	Normal	0.339	Normal
LAM-10	0	Ausente	0	Ausente
LAM-11	0	Ausente	0	Ausente
LAM-12	0.150	Normal	0.094	Normal
LAM-13	0	Ausente	0	Ausente
LAM-14	0.559	Sobreexpresión	0.119	Normal
LAM-15	0	Ausente	0	Ausente
LAM-16	0.541	Sobreexpresión	0.561	Normal
LAM-17	0	Ausente	0	Ausente



Se detectó que en un 5.9% (1/17) de los pacientes existió presencia de PML-RAR α con ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 normal; y 23.5% (4/17) expresó PML-RAR α sin expresión de los genes ABC1 y ABC-G2.

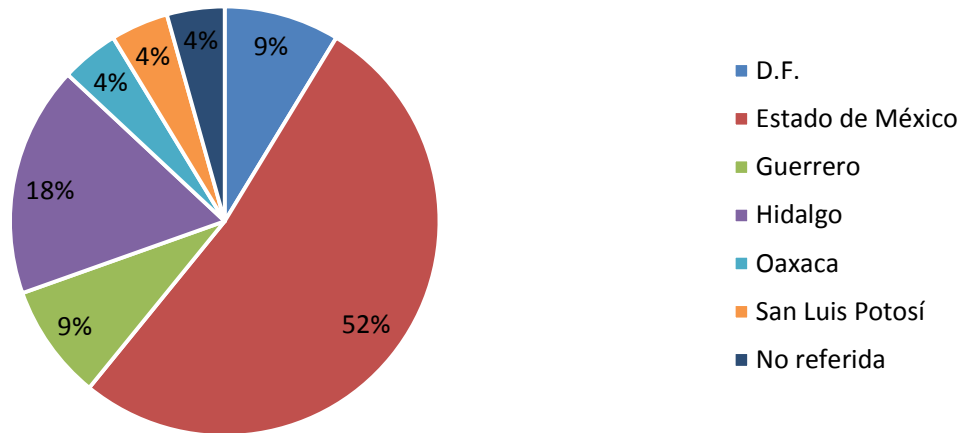
6.9 CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICO-PATOLÓGICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

Para dicho estudio se incluyeron 23 pacientes (16 hombres y 7 mujeres), con una edad media de 40.6 años (18 - 67 años) (Gráfico 29).



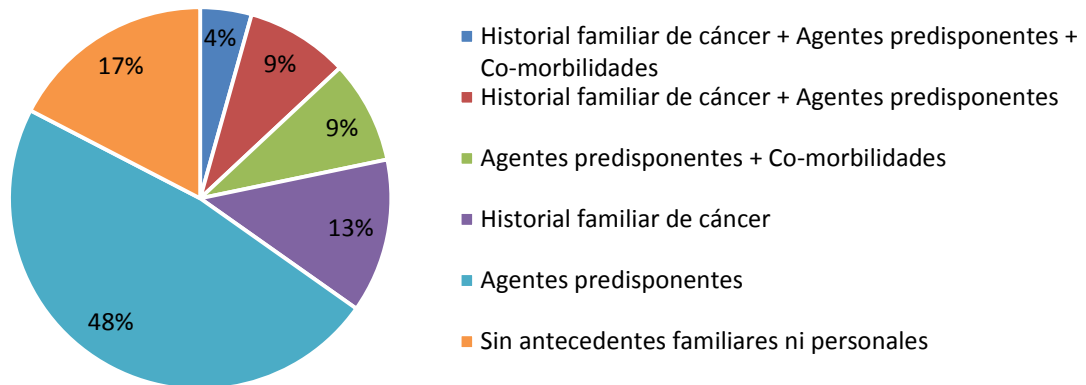
Los pacientes fueron provenientes de diversos estados de la república (D.F., Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, San Luis Potosí y una ubicación no referida) siendo predominantes (12/23 = 52.2%) los sujetos procedentes del Estado de México (Gráfico 30).

Gráfico 30. Lugares de procedencia de los pacientes con LMC (n=23)



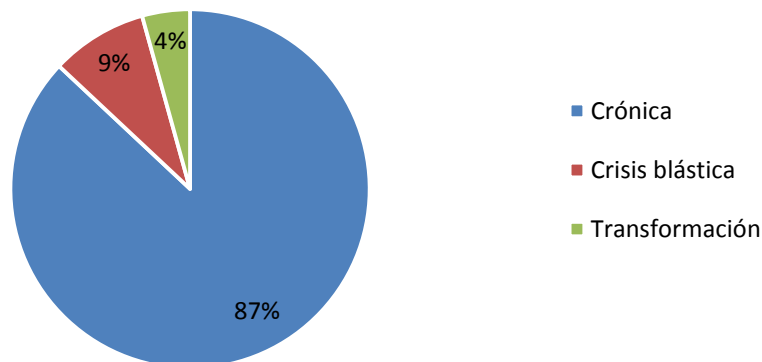
La referencia de historial de cáncer, co-morbilidades y exposición a agentes predisponentes se desglosan en el Gráfico 31.

Gráfico 31. Antecedentes personales en pacientes con LMC (n=23).



Con el estudio de MO se determinó la fase de la enfermedad que cursaban los pacientes, encontrando a 86.9% (20/23) en fase crónica, 8.7% (2/23) en crisis blástica y 4.3% (1/23) en fase de acelerada (Gráfico 32).

Gráfico 32. Determinación de la fase de enfermedad en pacientes con LMC (n=23)



Para completar el diagnóstico de LMC, es necesario hallar la t(9;22). Para tal fin se realizaron las técnicas de FISH, citogenética y PCR en muestras de MO. Es de suma importancia mencionar que al 47.8% (11/23) de los pacientes no se les realizó el estudio de FISH; 52.2% (12/23) si lo presentaron, y dentro de estos pacientes, 91.7% (11/12) resultó positivo para la presencia de BCR-ABL M, en tanto que 8.3% (1/12) presentó resultado negativo para dicha translocación.

Respecto al estudio de citogenética, 26.1% (6/23) de los pacientes no lo presentaron, 56.2% (13/23) no fueron valorables por ausencia de metafases; y solo 17.4% (4/23) tuvieron resultado del estudio; de los cuales 75% (3/4) se hallaron positivos para la t(9;22) y 25% (1/4) tuvo un cariotipo normal (46 X, Y).

Tabla 26. Detección de la translocación t (9;22) en pacientes con LMC por diversos métodos diagnósticos.

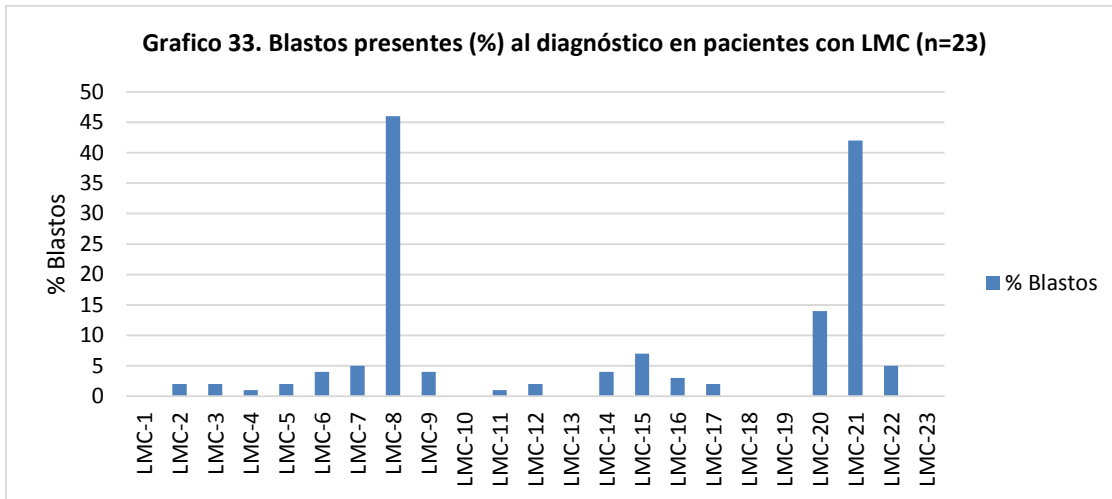
Pacientes	FISH	Citogenética	Detección de t(9;22) (Sin biología molecular)	Detección de t(9;22) (Con biología molecular)
LMC-1	+	NV	Si	Si
LMC-2	NP	NV	No	Si
LMC-3	NP	NP	No	Si
LMC-4	NP	+	Si	Si
LMC-5	+	NV	Si	Si
LMC-6	NP	NP	No	Si
LMC-7	+	NV	Si	Si
LMC-8	-	NV	No	Si
LMC-9	+	NV	Si	Si
LMC-10	NP	NP	No	Si
LMC-11	NP	NP	No	Si
LMC-12	NP	NV	No	Si
LMC-13	NP	+	Si	Si
LMC-14	+	NV	Si	Si
LMC-15	+	NV	Si	Si
LMC-16	+	NV	Si	Si
LMC-17	+	-	Si	Si
LMC-18	+	NV	Si	Si
LMC-19	+	+	Si	Si
LMC-20	NP	NP	No	Si
LMC-21	NP	NV	No	Si
LMC-22	+	NP	Si	Si
LMC-23	NP	NV	No	Si

*NP= No Presenta

**NV= No Valorable

En la biometría hemática se encontró que ningún paciente tuvo cifras normales de leucocitos, ya que el 100% (23/23) presentaron leucocitosis con un valor medio de $233.6 \times 10^3 /\mu\text{L}$ ($23.3 \times 10^3 - 524.3 \times 10^3$ leucocitos/ μL) (Tabla 27).

La cuenta diferencial de blastos promedio fue de 6.3% (0 a 46%), aunque únicamente 73.9% (17/23) presentó blastos en SP con un promedio de 8.6% (1 a 46%) (Gráfico 33)

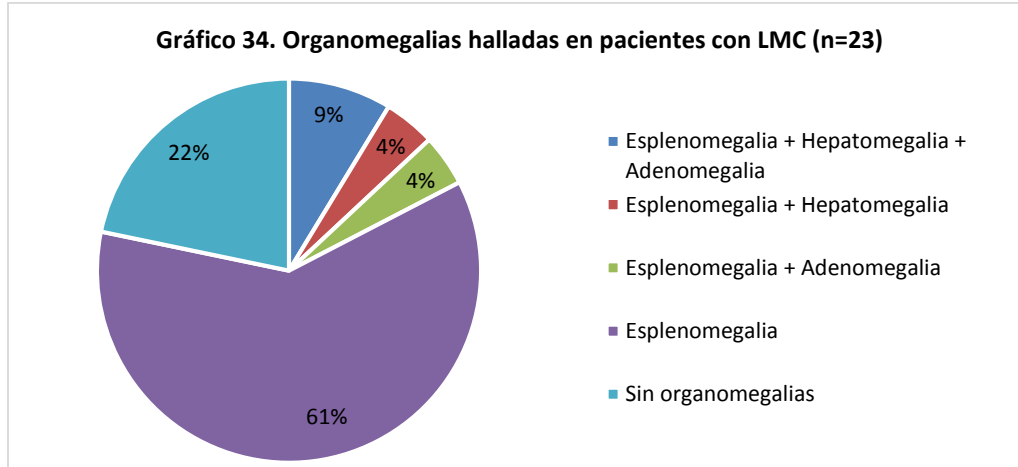


El valor medio de hemoglobina fue de 12.6 g/dL (9.8 – 14.3 g/dL), teniendo 91.3% (21/23) de los pacientes con anemia (Tabla 27).

La cuenta plaquetaria tuvo una media de 712.5×10^3 plaquetas/ μ L (81 - 3221×10^3 plaquetas/ μ L), teniendo a 4.3% (1/23) de los pacientes con trombocitopenia, 39.1% (9/23) con trombocitosis y 56.5% (13/23) con valores normales (Tabla 27).

Las cifras de DHL tuvieron un valor medio de 721.6 U/L (90 – 1744 U/L) (Tabla 27)

La presencia de organomegalias en los pacientes se desglosa en el Gráfico 34.



Con los hallazgos clínicos y de laboratorio, se pudo determinar el grupo de riesgo según el puntaje Sokal, en donde se encontró que 69.6% (16/23) de los pacientes cayeron en un grupo de riesgo bajo, 8.7% (2/23) se ubicaron en el grupo de riesgo intermedio y 21.7% (5/23) correspondieron a un grupo de alto riesgo (Gráfico 35).

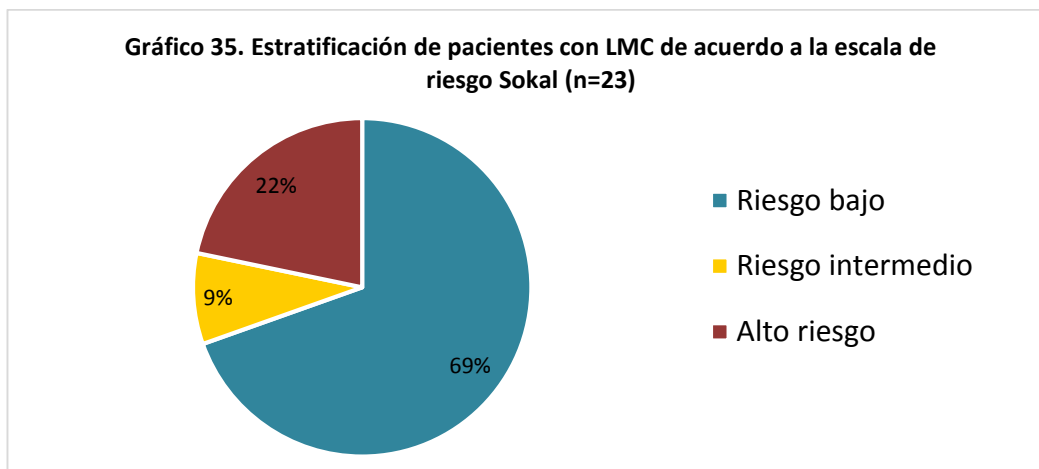


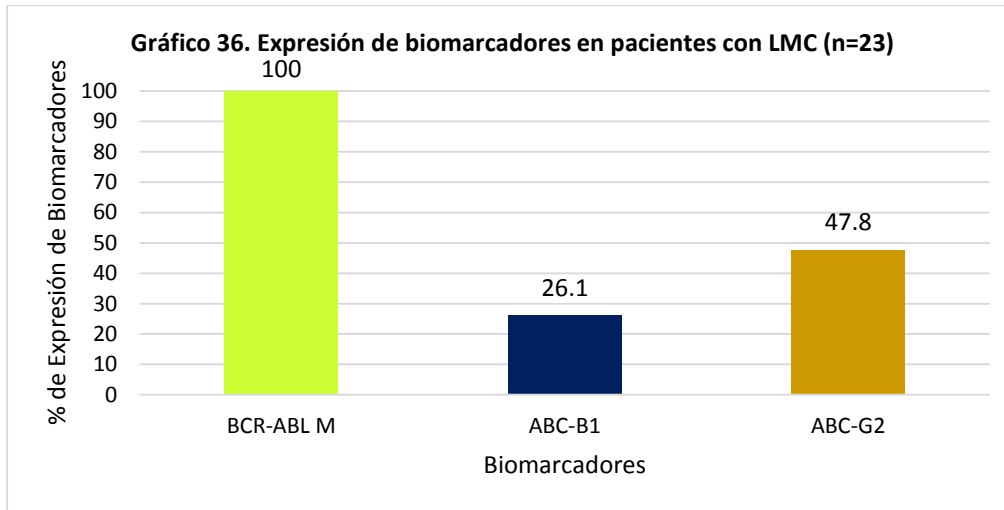
Tabla 27. Características de laboratorio de los pacientes con LMC (n=23) del HGM.

		N (%)	Media	Mínimo	Máximo
Edad (años)			40.6	18	67
	18 – 20	3 (13)			
	21 – 30	2 (8.7)			
	31 – 40	5 (21.7)			
	41 – 50	8 (34.8)			
	51 – 60	3 (13)			
	>60	2 (8.7)			
Sexo	Masculino	16 (69.6)			
	Femenino	7 (30.4)			
Leucocitos (x 10³/μL)			233.6	23.3	524.3
	<30	1 (4.3)			
	≥30	22 (95.7)			
%Blastos			6.3	0	46
Hemoglobina (g/dL)			10.1	9.9	11.2
Plaquetas			712.5	81	3221
DHL (U/L)			721.6	90	1744
	<500	7 (30.4)			
	≥500	16 (69.6)			
Esplenomegalia	Si	18 (78.3)			
	No	5 (21.7)			
Hepatomegalia	Si	3 (13)			
	No	20 (87)			
Adenomegalia	Si	3 (13)			
	No	20 (87)			
FISH	Normal	1 (4.3)			
	t(9;22)	11 (47.8)			
	No realizado	11 (47.8)			
Citogenética	Normal	1 (4.3)			
	t(9;22)	3 (13)			
	No valorable	13 (56.5)			
	No realizado	5 (26.1)			

6.10 FRECUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LMC

BCR-ABL M se encontró en el 100% (23/23) de los pacientes, no se encontró expresión de ningún otro gen de fusión, ni de los ATC.

En cuanto a la expresión de los genes de resistencia a multidrogas, 52.2% (12/23) de los pacientes expresaron al menos un gen de resistencia (ABC-B1 y/o ABC-G2), de los cuales el 17.4% (4/23) de los pacientes co-expresaron ambos, ABC-B1 se encontró en 26.1% (6/23) y ABC-G2 en 47.8% (11/23) (Gráfico 36).



Se encontró que: 52.2% (12/23) co-expresó BCR-ABL M con al menos un gen de resistencia a drogas; siendo 21.7% (5/23) los que expresaron BCR-ABL M con los dos genes de resistencia a drogas; 4.3% (1/23) expresó BCR-ABL M y ABC-B1; y 26.1% (6/23) tuvo expresión de BCR-ABL M y ABC-G2 (Tabla 28).

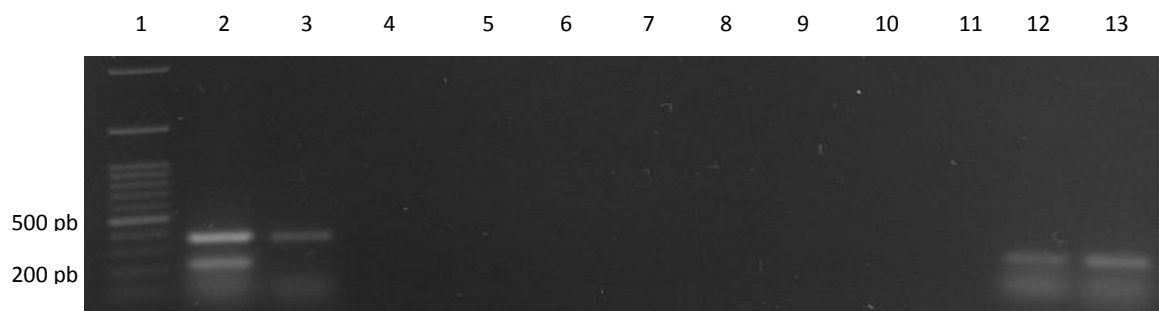


Figura 29. Panel de biomarcadores en paciente con LMC. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (+) y GAPDH (+); carril 3: BCR-ABL Mayor (304 pb); carril 4: BCR-ABL Menor (-); carril 5: E2A-PBX1 (-); carril 6: AF4-MLL (-); carril 7: TEL-AML1 (-); carril 8: PML-RAR α (-); carril 9: AML1-ETO (-); carril 10: NY-ESO1, (-); carril 11: MAG-E-A3 (-); carril 12: ABC-B1 (201 pb); carril 13: ABC-G2 (206 pb).

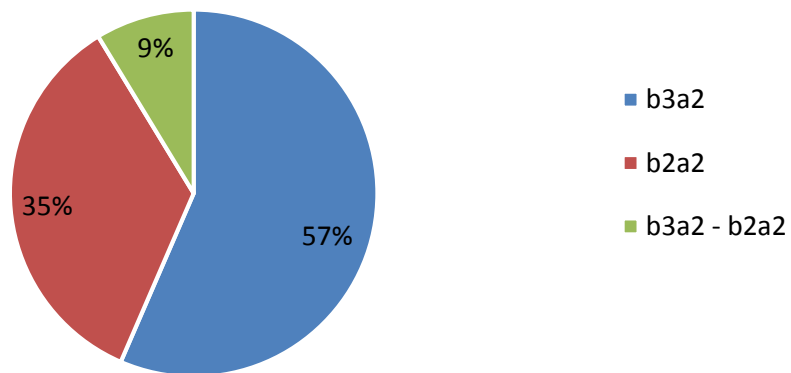
En el 47.8% (11/23) de los pacientes se halló expresión de BCR-ABL M sin expresión de algún gen de resistencia a drogas (Tabla 28).

Tabla 28. Expresión de genes de fusión, ATC y genes ABC en pacientes con LMC (n=23)

	Biomarcadores										
	BCR ABL M	BCR ABL m	TEL AML1	E2A PBX1	AF4 MLL1	PML RARα	AML1 ETO	MAGE A3	NY ESO1	ABC B1	ABC G2
LMC-1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LMC-6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LMC-10	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LMC-11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-13	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LMC-14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-19	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LMC-20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LMC-21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LMC-23	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

También se determinó la isoforma del transcrito de BCR-ABL M, hallando 56.5% (13/23) con la isoforma b3a2; 34.8% (8/23) con b2a2, y el 8.7% (2/23) con ambas (b3a2 y b2a2).

Gráfico 37. Frecuencia de las isoformas del transcrito BCR-ABL M en pacientes con LMC (n=23).



6.11 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A DROGAS (ABC) EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) POR qRT-PCR

Con el estudio de qRT-PCR se pudo determinar que ABC-B1 estuvo sobreexpresado en 13% (3/23) de los pacientes, normal en 13% (3/23), y 73.9% (17/23) lo tuvo ausente (Gráfico 38).

Gráfico 38. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC. (n=23)

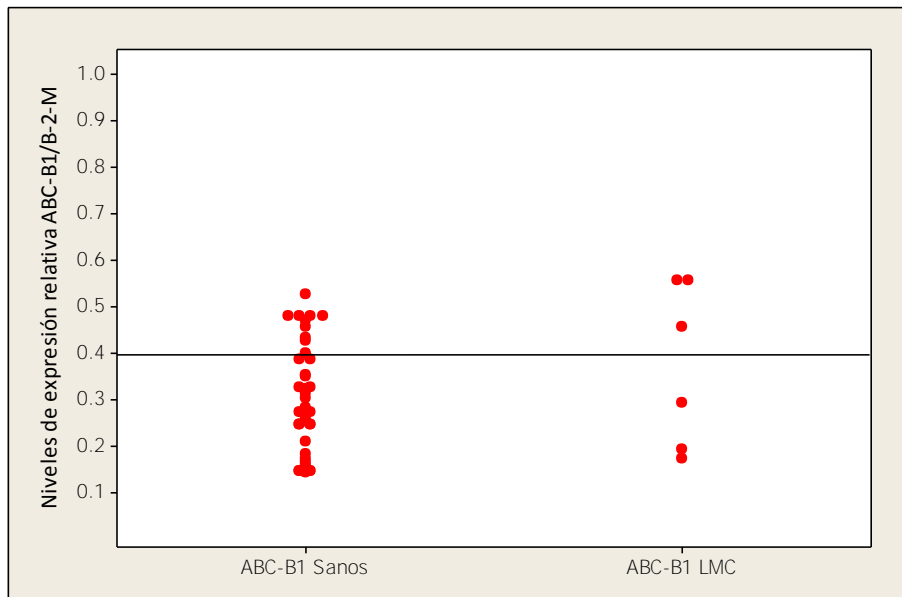
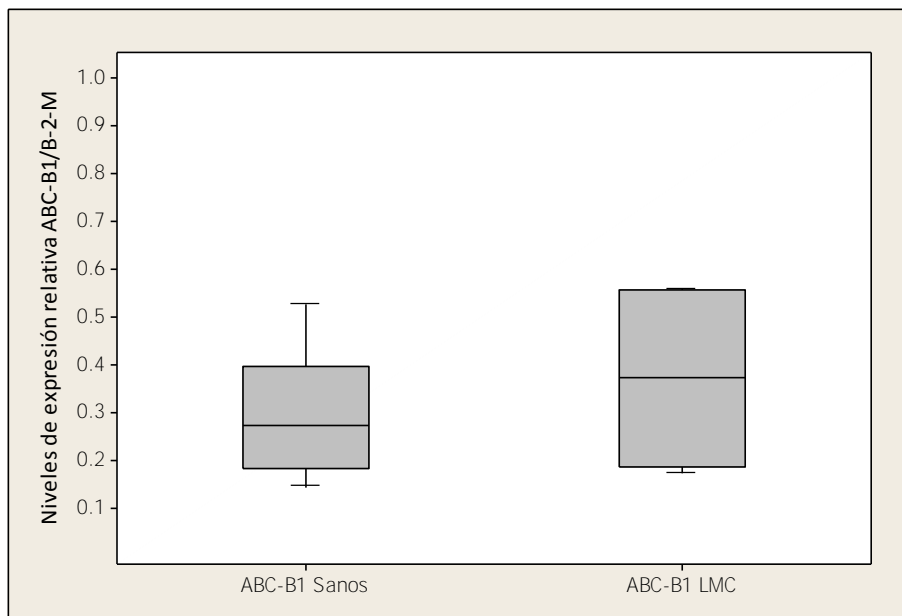


Gráfico 39. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC. (n=23)



Se estableció también que 8.7% (2/23) de los pacientes tuvieron sobreexpresión de ABC-G2, mientras que 39.1% (9/23) tuvo niveles normales, y 52.2% (12/23) lo tuvieron ausente (Gráfico 40).

Gráfico 40. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC. (n=23)

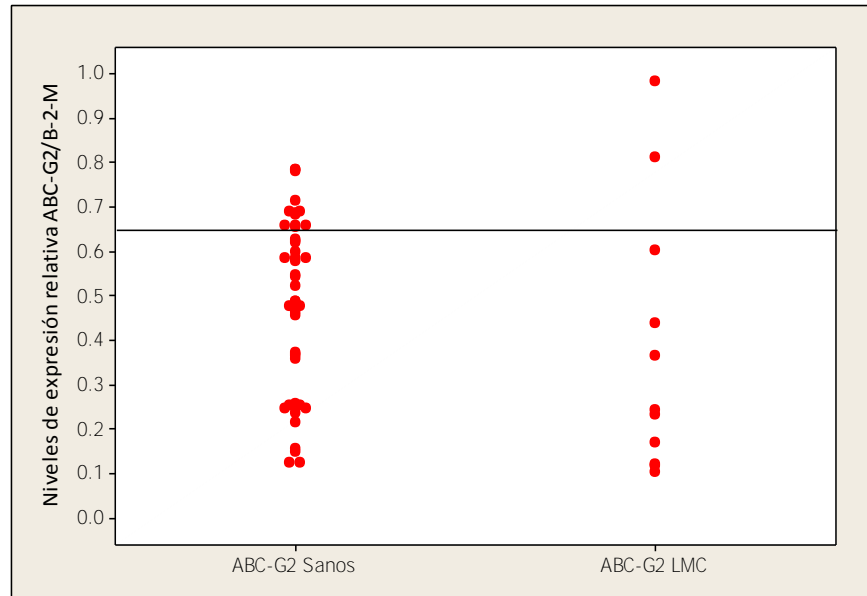
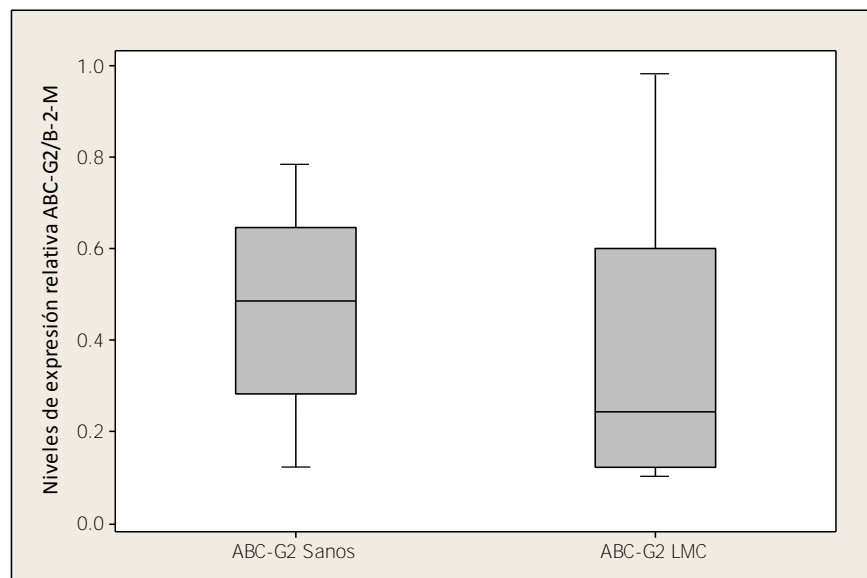


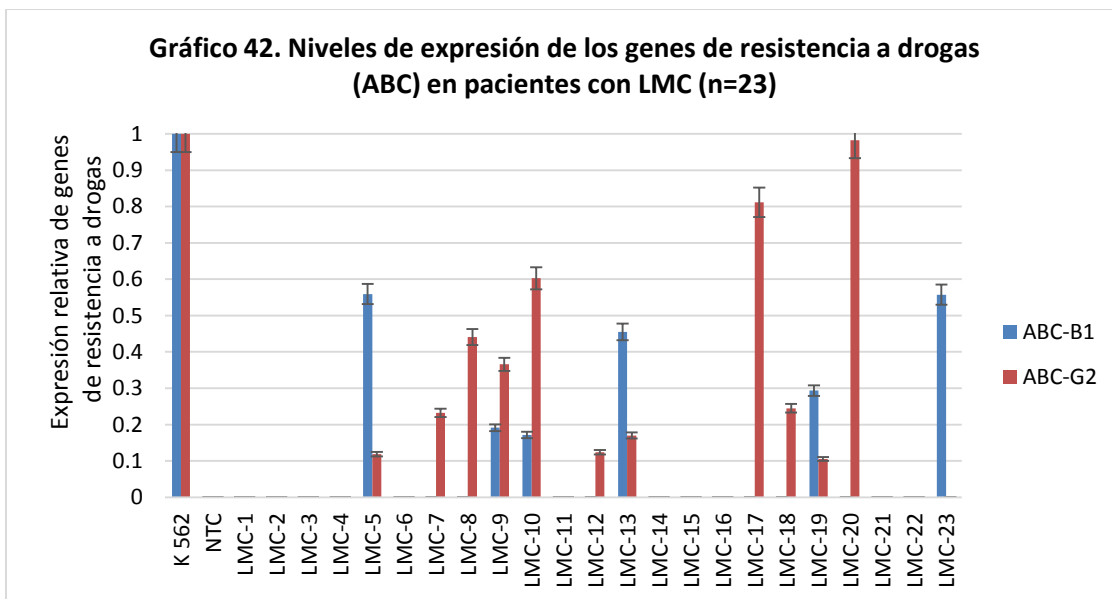
Gráfico 41. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC. (n=23)



El 21.7% (5/23) de los pacientes con LMC cuentan con al menos un gen de resistencia a drogas sobreexpresado; 8.7% (2/23) presentó ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 normal; 4.3% (1/23) ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 ausente; 13% (3/23) ABC-B1 y ABC-G2 normales; 8.7% (2/23) ABC-G2 sobreexpresado; y 17.4% (4/23) ABC-G2 normal (Tabla 29).

Tabla 29. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC (n=23)

Pacientes	Nivel de expresión relativa ABC-B1	Estratificación	Nivel de expresión relativa ABC-G2	Estratificación
LMC-1	0	Ausente	0	Ausente
LMC-2	0	Ausente	0	Ausente
LMC-3	0	Ausente	0	Ausente
LMC-4	0	Ausente	0	Ausente
LMC-5	0.559	Sobreexpresión	0.118	Normal
LMC-6	0	Ausente	0	Ausente
LMC-7	0	Ausente	0.232	Normal
LMC-8	0	Ausente	0.44	Normal
LMC-9	0.191	Normal	0.365	Normal
LMC-10	0.171	Normal	0.602	Normal
LMC-11	0	Ausente	0	Ausente
LMC-12	0	Ausente	0.123	Normal
LMC-13	0.455	Sobreexpresión	0.169	Normal
LMC-14	0	Ausente	0	Ausente
LMC-15	0	Ausente	0	Ausente
LMC-16	0	Ausente	0	Ausente
LMC-17	0	Ausente	0.811	Sobreexpresión
LMC-18	0	Ausente	0.244	Normal
LMC-19	0.293	Normal	0.104	Normal
LMC-20	0	Ausente	0.982	Sobreexpresión
LMC-21	0	Ausente	0	Ausente
LMC-22	0	Ausente	0	Ausente
LMC-23	0.557	Sobreexpresión	0	Ausente

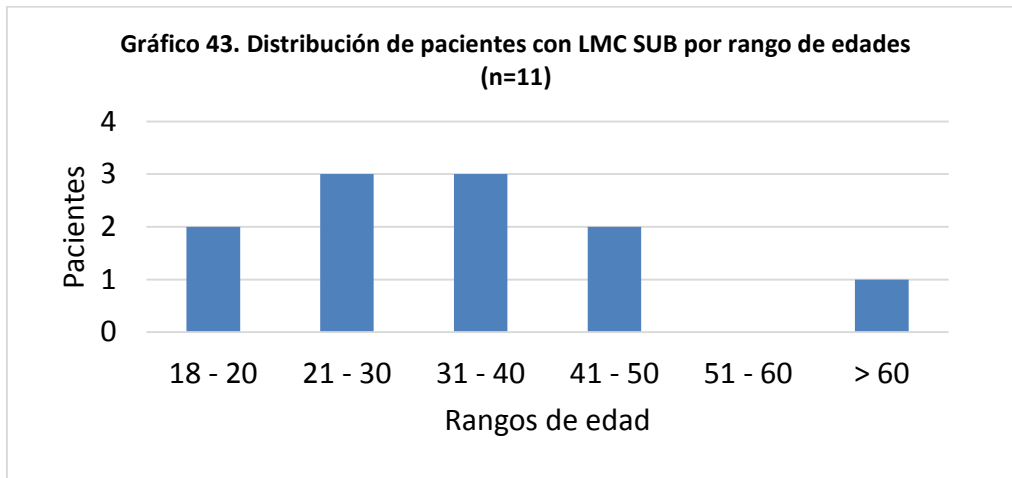


El 8.7% (2/23) de los pacientes presentó expresión de BCR-ABL M con ABC-B1 sobreexpresado y ABC-G2 normal; 4.3% (1/23) fue positivo para BCR-ABL M con ABC-B1 sobreexpresado y

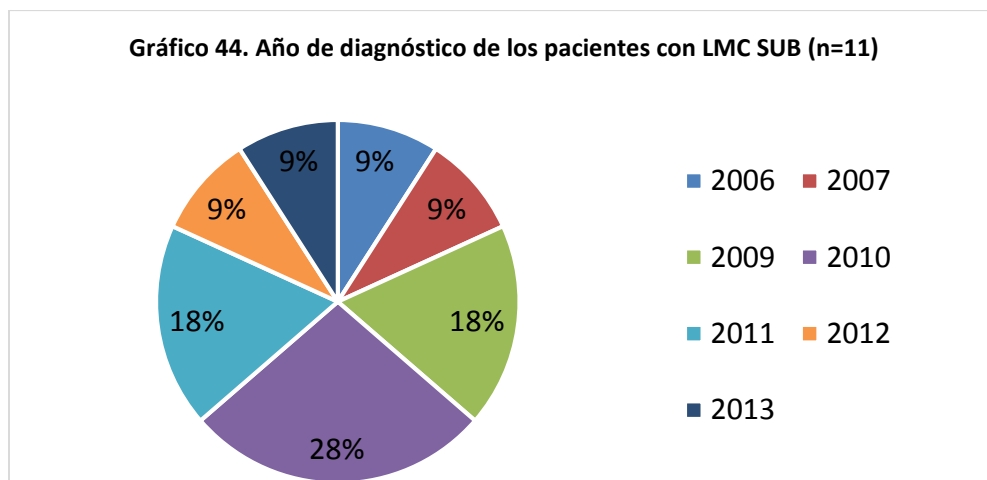
ABC-G2 ausente; 13% (3/23) expresó BCR-ABL M y ABC-B1 y ABC-G2 normales; 8.7% (2/23) fue positivo para BCR-ABL con ABC-G2 sobreexpresado y ABC-B1 ausente; y 17.4% (4/23) fue positivo para BCR-ABL M con ABC-G2 normal.

6.12 CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA Y CLÍNICO-PATOLÓGICA DE PACIENTES CON LMC SUBSECUENTE (SUB) AL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO

Con el fin de determinar el alcance y la eficacia del panel de biomarcadores, se determinó en pacientes diagnosticados con LMC en tratamiento. Para lo cual se incluyó una población de 11 individuos (6 hombres y 5 mujeres), con una edad media de 34.5 años (19 - 66 años) (Gráfico 43).

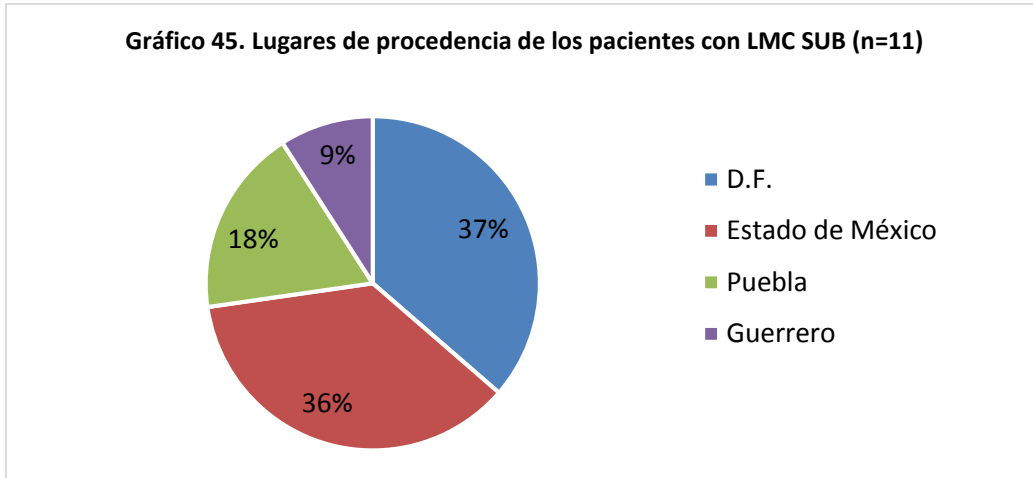


El año en que se llevó a cabo el ingreso del paciente para el diagnóstico de su padecimiento fue variable, tal como lo demuestra el Gráfico 44.



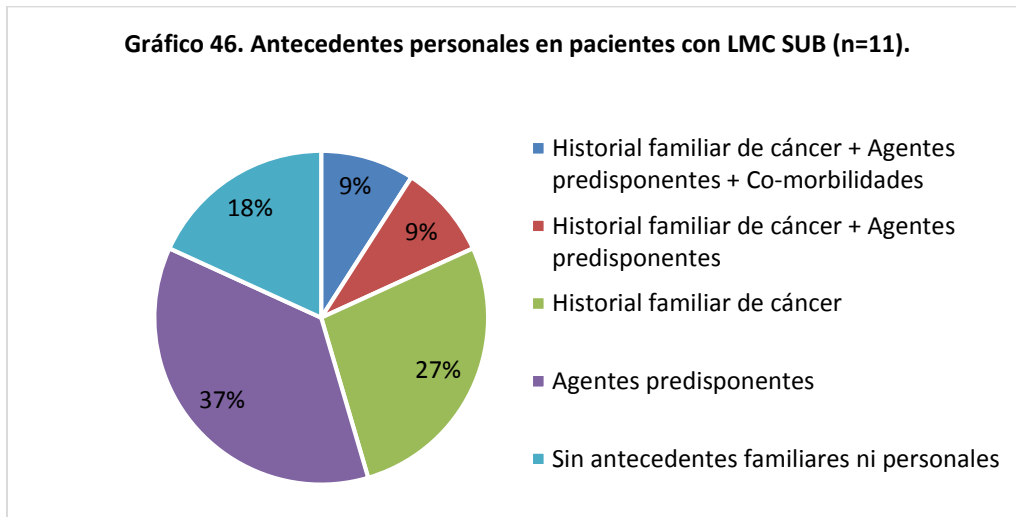
La población de estudio fue proveniente del D.F., Estado de México, Guerrero y Puebla, siendo 36.4% (4/11) procedentes del Estado de México, 36.4% (4/11) del D.F., 18.2% (2/11) de Puebla y el 9.1% (1/11) restante de Guerrero (Gráfico 45).

Gráfico 45. Lugares de procedencia de los pacientes con LMC SUB (n=11)



Un paciente (9.1%) refirió historial familiar de cáncer, en conjunto con epilepsia, así como la exposición a agentes predisponentes como consumo de alcohol, exposición a benceno, gasolina, pintura, tiner y otros solventes; la descripción del resto de los pacientes se observa en el Gráfico 46.

Gráfico 46. Antecedentes personales en pacientes con LMC SUB (n=11).



En las cuentas leucocitarias al diagnóstico se encontró un valor medio de 246.5×10^3 leucocitos/ μL ($8.6 - 447.6 \times 10^3$ leucocitos/ μL), mostrando a 9.1%(1/11) con valores normales; y 90.9% (10/11) con leucocitosis (Tabla 31).

Se halló una cuenta diferencial de blastos promedio fue de 2.5% (0 a 9%), aunque solo 72.7% (8/11) presentó blastos circulantes (Tabla 31).

El valor medio de hemoglobina fue de 12.6 g/dL (9.8 – 14.3 g/dL), observando 18.2% (2/11) de los pacientes con anemia; y 81.8% (9/11) con valores normales (Tabla 31).

Las plaquetas tuvieron una media de 504.5×10^3 plaquetas/ μL (114 - 1061×10^3 plaquetas/ μL), hallando a 9.1% (1/11) pacientes con trombocitopenia, 45.45% (5/11) con trombosis y 45.4% (5/11) con valores normales (Tabla 31).

El 100% (11/11) de los valores de DHL estuvieron por arriba de los niveles normales, con un valor medio de 703.1 U/L (261 a 1307) (Tabla 31).

Con el estudio citomorfológico se determinó la fase de la enfermedad en la que se encontraban los pacientes, siendo encontrados el 100% (11/11) en la fase crónica.

Solo el 54.5% (6/11) de los pacientes contaron con el estudio FISH al diagnóstico; teniendo resultado positivo para BCR-ABL M el 36.4% (4/11) de los pacientes, mientras que 18.2% (2/11) presento un resultado negativo para la t(9;22)(q34;q11).

En cuanto al estudio de citogenética, solo el 72.7% (8/11) de la población tuvo el estudio; de los cuales 54.5% (6/11) fueron hallados con cromosoma Philadelphia positivo (CrPh+); en tanto que 18.2% (2/11) resultó con cariotipo normal (46 X,Y y 46 X,Y)

Cabe resaltar que el transcrito del gen BCR-ABL M se halló en el 100% de los pacientes por la técnica de RT-PCR; incluido el 9.1% (1/11) de los sujetos en el que no se logró la detección por el método de FISH y/o citogenética.

Tabla 30. Métodos de detección de la translocación t(9;22)(q34;q11) en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) (n=11).

Pacientes	FISH	Citogenética	Detección de t(9;22) (Sin biología molecular)	Detección de t(9;22) (Con biología molecular)
SUB-1	NP	+	Si	Si
SUB-2	NP	+	Si	Si
SUB-3	-	-	No	Si
SUB-4	-	+	Si	Si
SUB-5	NP	+	Si	Si
SUB-6	NP	+	Si	Si
SUB-7	+	-	Si	Si
SUB-8	+	NP	Si	Si
SUB-9	+	NP	Si	Si
SUB-10	NP	+	Si	Si
SUB-11	+	NP	Si	Si

*NP= No Presenta

Posterior al hallazgo de la t(9;22) se incluyó a la totalidad de los pacientes en el protocolo de tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa (Imatinib).

Tabla 31. Características de clínico-patológicas de los pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) al diagnóstico (n=11).

		N (%)	Media	Mínimo	Máximo
Edad (años)			34.5	19	66
	18 – 20	2 (18.2)			
	31 – 40	3 (27.3)			
	41 – 50	2 (18.2)			
	51 – 60	0			
	>60	1 (9.1)			
Sexo	Masculino	6 (54.5)			
	Femenino	5 (45.5)			
Leucocitos (x 10³/μL)			246.5	8.6	447
	<30	1 (9.1)			
	≥30	10 (90.9)			
%Blastos			2.5	0	9
Hemoglobina (g/dL)			12.6	9.8	14.3
Plaquetas			504.5	114	1061
DHL (U/L)			703.1	261	1307
	No determinada	1 (9.1)			
	<500	1 (9.1)			
	≥500	9 (81.1)			
Esplenomegalia	Si	2 (18.2)			
	No	9 (81.1)			
Hepatomegalia	Si	1 (9.1)			
	No	10 (90.9)			
Adenomegalia	No	11 (100)			
FISH	Normal	2 (18.2)			
	t(9;22)	4 (36.4)			
	No realizado	5 (45.4)			
Citogenética	Normal	2 (18.2)			
	t(9;22)	6 (54.5)			
	No realizado	3 (27.3)			
RT-PCR	BCR-ABL M	11 (100)			

6.13 SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON LMC SUBSECENTES (SUB)

En el año 2014 se realizó el muestreo de los pacientes con LMC para evaluar la respuesta a su tratamiento. Para tal fin, se realizó el estudio de biometría hemática, aspirado de MO para análisis morfológico, y las pruebas de FISH, citogenética y biología molecular. Es de suma relevancia mencionar que en el laboratorio donde se realizó este estudio solo se lleva a cabo el seguimiento de los pacientes con LMC BCR-ABL M positivo al diagnóstico y de los pacientes con LAL BCR-ABL m igualmente al diagnóstico.

En la biometría hemática se halló un valor medio de leucocitos de 8.94×10^3 leucocitos/μL ($4.3 - 27.7 \times 10^3$ leucocitos/μL), observándose 81.8% (9/11) con leucocitos normales y 18.2% (2/11) con leucocitosis. En el conteo diferencial ningún paciente se encontró con presencia de blastos en SP. La hemoglobina tuvo un valor medio de 13.9 g/dL ($9.7 - 17.3$ g/dL), observando a 18.2% (2/11) con anemia. La cuenta plaquetaria tuvo una media de $192.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($120 -$

263 x 10³plaquetas/μL), resultando 27.3% (3/11) de los pacientes con trombocitopenia (Tabla 33).

A la exploración física no se hallaron organomegalias en ninguno de los 11 pacientes (Tabla 33).

El aspirado de MO determinó que el 100% (11/11) de los pacientes tenían un conteo diferencial normal compatible con MO en remisión del padecimiento de base.

Con la prueba de FISH se halló presencia de la t(9;22)(q34;q11) en 18.2% (2/11) de los pacientes, 72.7% (8/11) tuvo ausencia de dicha translocación y un paciente más (9.1%) no presentó el estudio.

En lo que respecta a la citogenética, el 81.8% (9/11) tuvo cariotipo normal (46 X,Y ó 46 X,X), la muestra de otro paciente no fue valorable y uno más no presentó el estudio.

La prueba citogenética y el FISH para el seguimiento de los pacientes con LMC se realizó en muestra de MO.

Tabla 32. Características clínico-patológicas de los pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) al seguimiento (n=11).

		N (%)	Media	Mínimo	Máximo
Leucocitos (x 10 ³ /μL)			8.9	4.3	27.7
	<30	11(100)			
	≥30				
%Blastos			0	0	0
Hemoglobina (g/dL)			13.9	9.7	17.3
Plaquetas			192.5	120	263
Esplenomegalia	No	11 (100)			
Hepatomegalia	No	11 (100)			
Adenomegalia	No	11 (100)			
FISH	Normal	8 (72.7)			
	t(9;22)	2 (18.2)			
	No realizado	1 (9.1)			
Citogenética	Normal	8 (72.7)			
	t(9;22)	0			
	No valorable	1 (9.1)			
	No realizado	2 (18.2)			
RT-PCR	BCR-ABL M	6 (54.5)			

Tabla 33. Evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con LMC Subsecuentes (SUB) (n=11).

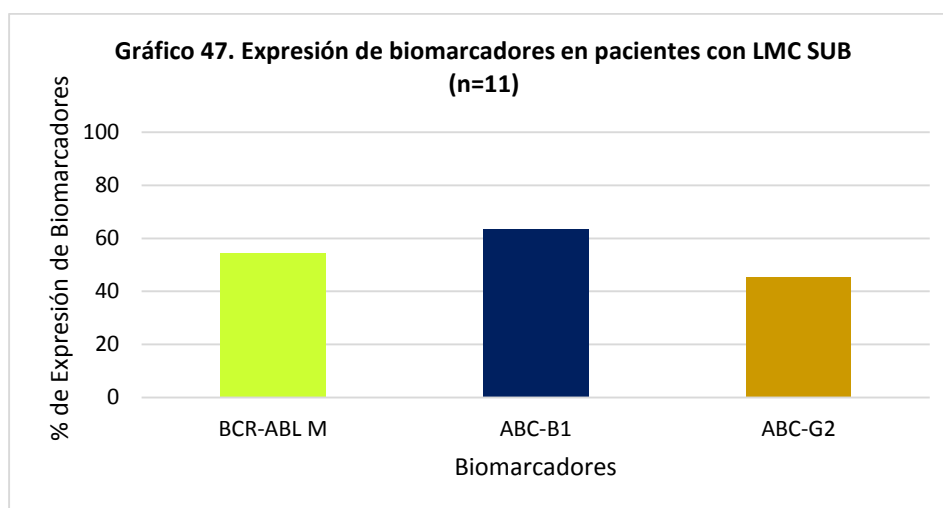
Pacientes	Análisis morfológico de MO	FISH	Citogenética	Detección de t(9;22) (Sin biología molecular)	Detección de t(9;22) (Con biología molecular)
SUB-1	Remisión	+	-	Si	Si
SUB-2	Remisión	-	-	No	Si
SUB-3	Remisión	-	-	No	No
SUB-4	Remisión	-	-	No	Si
SUB-5	Remisión	-	-	No	No
SUB-6	Remisión	-	-	No	No
SUB-7	Remisión	+	-	Si	Si
SUB-8	Remisión	-	-	No	Si
SUB-9	Remisión	-	NV	No	No
SUB-10	Remisión	-	NP	No	Si
SUB-11	Remisión	NP	NP	No	No

*NP= No Presenta

**NV= No Valorable

6.14 FRECUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LMC SUBSECUENTES (SUB)

La totalidad de estos pacientes contaron con material biológico para realizar la determinación del panel de biomarcadores, pudiendo encontrar que el 54.5% (6/11) de los pacientes expresaron el gen de fusión BCR-ABL M; no se encontró expresión de ningún otro gen de fusión, ni de los ATC; en cuanto a los genes de resistencia a drogas, 72.7% (8/11) de los pacientes expresaron al menos uno, 36.4% (4/11) co-expresaron ambos, 63.6% (6/23) expresaron ABC-B1 y 45.45% (11/23) ABC-G2.

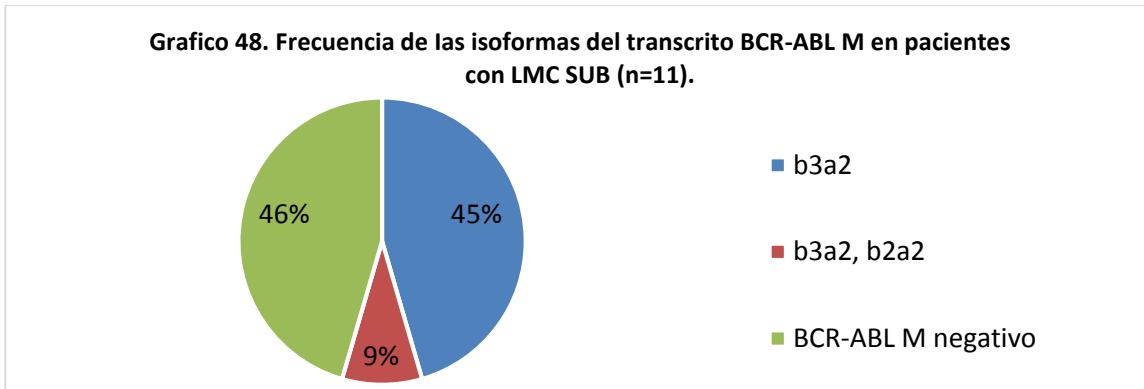


Es importante mencionar que 27.3% (3/11) de los pacientes presentaron la expresión de BCR-ABL M y de ABC-B1.

Tabla 34. Expresión de genes de fusión, ATCs y genes ABC en pacientes con LMC SUB (n=23)

	Biomarcadores										
	BCR ABL M	BCR ABL m	TEL AML1	E2A PBX1	AF4 MLL1	PML RARα	AML1 ETO	MAGE A3	NY ESO1	ABC B1	ABC G2
SUB - 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SUB - 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUB - 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUB - 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SUB - 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUB - 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUB - 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUB - 8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SUB - 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SUB - 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUB - 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Se determinó el tipo de transcrito de BCR-ABL M, hallando que 45.45% (5/11) presentaron la isoforma b3a2, y 9.1% (1/11) presentó ambas formas del transcrito (b3a2 y b2a2), el resto de los pacientes fueron negativos para BCR-ABL M (5/11).



Es de suma importancia mencionar que usando la técnica de RT-PCR se detectó el transcrito del gen quimérico BCR-ABL M 54.5% (6/11) de los pacientes; incluido el 36.41% (4/11) de los sujetos en los que no se logró la detección de dicho gen por el método de FISH y/o citogenética, y que contaban con una MO normocelular.

6.15 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A DROGAS (ABC) EN PACIENTES CON LMC SUBECUENTES (SUB) POR qRT-PCR

Se determinó que 27.3% (3/11) de los pacientes tuvieron ABC-B1 sobreexpresado, 36.4% (4/11) tuvieron niveles normales, y 36.4% (4/11) lo tuvieron ausente.

Gráfico 49. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-B1 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC SUB. (n=11)

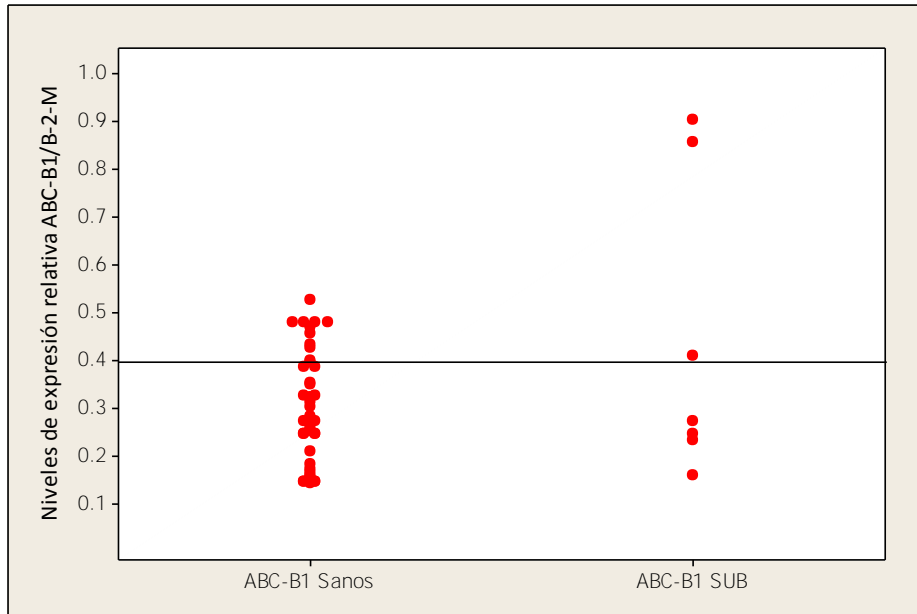
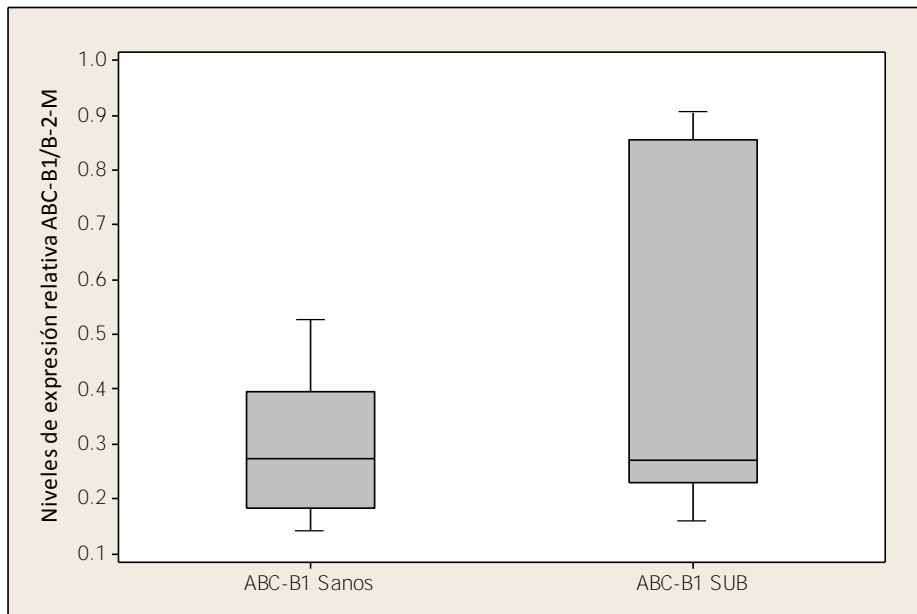


Gráfico 50. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-B1 en donadores sanos (n=68) y pacientes LMC SUB. (n=11)



En esta población no se halló sobreexpresión de ABC-G2, solo se encontró expresión normal en 36.4% (4/11) de los pacientes, y ausencia en 63.6% (7/11).

Gráfico 51. Comparación de los niveles de expresión del gen ABC-G2 en donadores sanos (n=68) vs pacientes LMC SUB. (n=11)

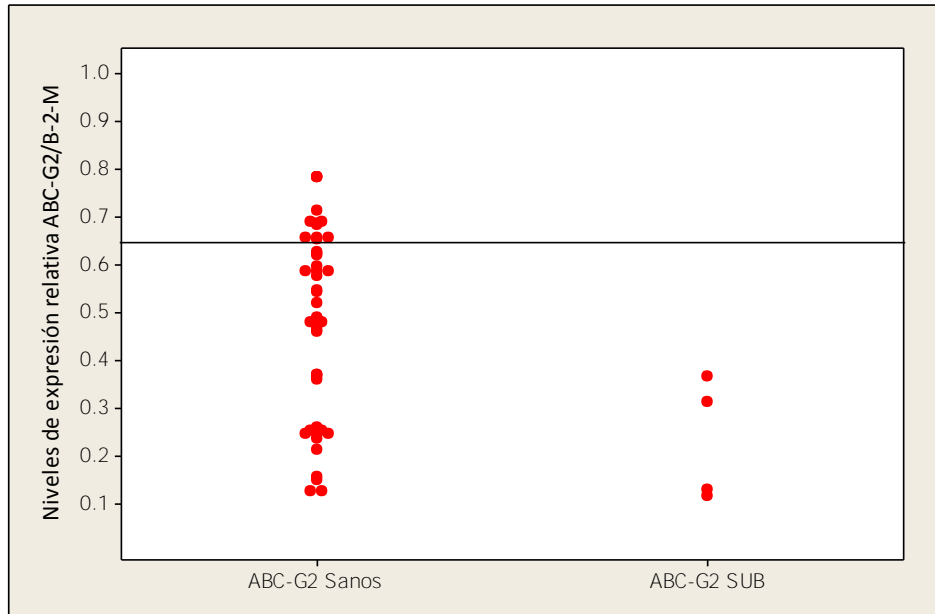
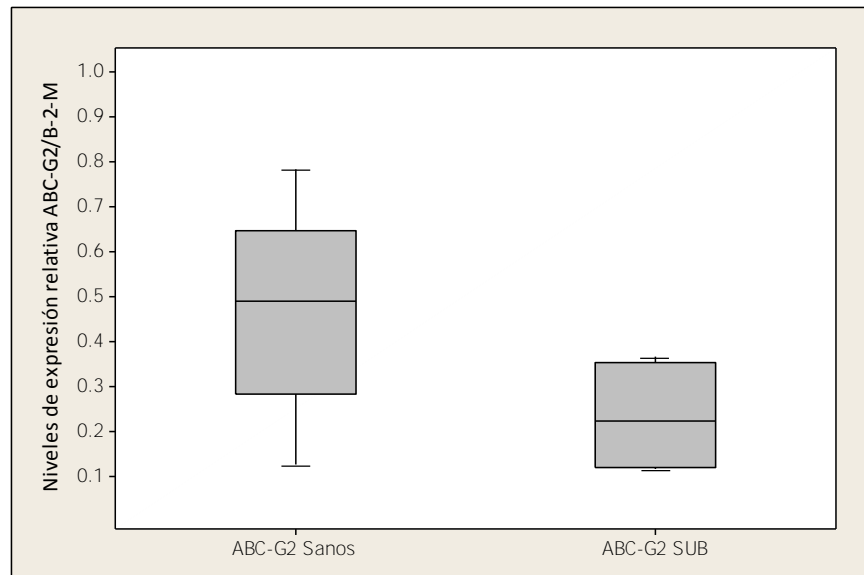


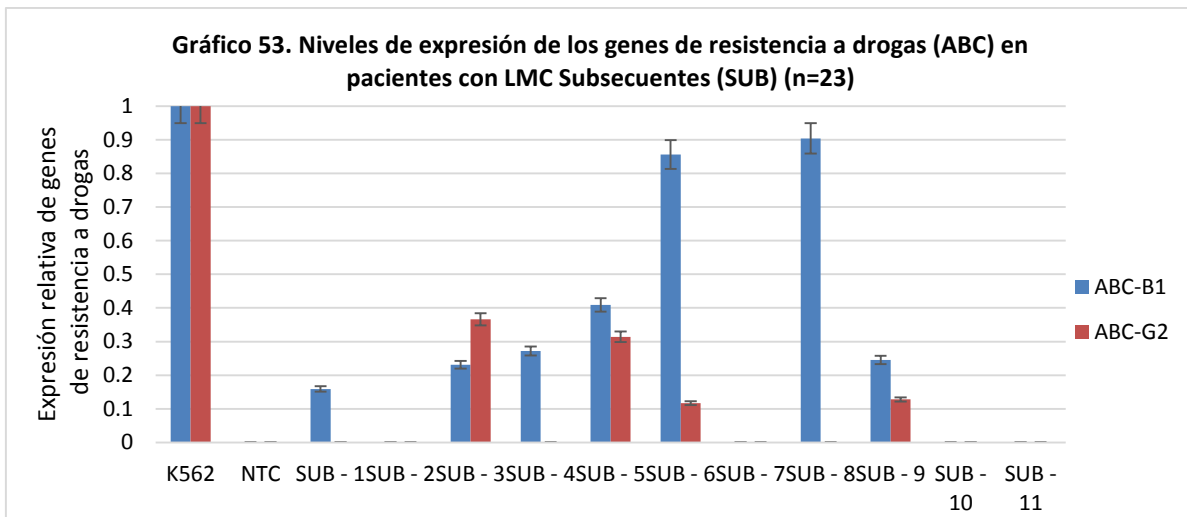
Gráfico 52. Determinación y comparación de cuartiles de los niveles de expresión de ABC-G2 en donadores sanos (n=68) y pacientes LMC SUB. (n=11)



El 18.2% (2/11) de los pacientes tuvieron ABC-B1 sobreexpresado con ABC-G2 normal; 9.1% (1/11) tuvo ABC-B1 sobreexpresado, 18.2% (2/11) presentó ABC-B1 y ABC-G2 normales; y 18.2% (2/11) de los pacientes tuvieron ABC-B1 normal.

Tabla 35. Niveles de expresión de los genes de resistencia a drogas (ABC) en pacientes con LMC SUB (n=11)

Pacientes	Nivel de expresión relativa	Estratificación	Nivel de expresión relativa	Estratificación
	ABC-B1/B-2-M		ABC-G2/B-2-M	
SUB - 1	0.159	Normal	0	Ausente
SUB - 2	0	Ausente	0	Ausente
SUB - 3	0.231	Normal	0.366	Normal
SUB - 4	0.272	Normal	0	Ausente
SUB - 5	0.409	Sobreexpresado	0.314	Normal
SUB - 6	0.856	Sobreexpresado	0.117	Normal
SUB - 7	0	Ausente	0	Ausente
SUB - 8	0.904	Sobreexpresado	0	Ausente
SUB - 9	0.245	Normal	0.128	Normal
SUB - 10	0	Ausente	0	Ausente
SUB - 11	0	Ausente	0	Ausente



El 18.2% (2/11) de los pacientes presentó ABC-B1 sobreexpresado con ABC-G2 normal; 9.1% (1/11) co-expresó BCR-ABL M con ABC-G1 sobreexpresado; 18.2% (2/11) co-expresaron BRC-ABL M con ABC-B1 normal; 18.2% (2/11) expresaron de manera normal ABC-B1 y ABC-G2; 9.1% (1/11) expresó ABC-G2 normal; y 27.3% (3/11) expresó BCR-ABL M sin ningún gen ABC.

7. DISCUSIÓN

Debido a que las neoplasias hematológicas son muy diversas y complejas, requieren de múltiples análisis para poder ser diagnosticadas correctamente; entre estas pruebas se encuentran la biometría hemática, el análisis citomorfológico de MO, inmunocitoquímica, citometría de flujo, pruebas citogenéticas (cariotipos y FISH) y análisis moleculares (PCR o qRT-PCR)²³.

En México, el diagnóstico de las leucemias, así como la determinación de factores pronósticos, se realizan mediante hallazgos clínico-patológicos; pues los estudios de biología molecular aplicados a la hematología aún se encuentran muy distantes de ser pruebas de rutina en los servicios de salud pública.

La importancia de contar con un panel de biomarcadores moleculares radica en la posibilidad de la determinación de factores pronósticos, conocer el comportamiento biológico de la clona leucémica, tener una guía sólida en la elección de tratamientos dirigidos contra blancos moleculares específicos, la determinación de marcadores causantes de la resistencia al tratamiento y que aparte permita realizar el seguimiento de los pacientes posterior a su tratamiento; es de suma importancia mencionar que en los servicios de salud pública y privada en México no se cuenta con un panel que permita obtener la información ya mencionada.

En este estudio se llevó a cabo la determinación de los transcritos de los genes de fusión más comunes según la OMS, en LAL (BCR-ABL m, TEL-AML1, E2A-PBX1 y AF4-MLL), LAM (PML-RAR α y AML1-ETO) y LMC (BCR-ABL M), los genes de resistencia a drogas (ABC-B1 y ABC-G2) y los antígenos testiculares de cáncer (MAGE-A3 y NY-ESO1), en 74 pacientes adultos de un hospital de referencia en México (Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga), con estas tres patologías.

Para el caso de los biomarcadores presentes en los pacientes adultos con LAL, nuestro equipo de trabajo halló la expresión de BCR-ABL m en 17.4%, TEL-AML1 en 4.3% al igual que E2A-PBX1, y AF4-MLL no se encontró en ningún paciente (Gráfico 10, Tabla 21). Cabe resaltar que son pocos los trabajos sobre la detección de estos genes en adultos, ya que la mayor parte de los estudios están enfocados a niños y para poder llevar a cabo el contraste de nuestros resultados, nos tenemos que referir a estudios realizados en una población diferente a la mexicana.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el porcentaje medio de expresión de BCR-ABL m en LAL en población adulta va de 25 a 30%^{27,30,108}; datos que son elevados en comparación con nuestros resultados; aunque estudios previos en población mexicana determinaron la frecuencia de este gen en un 10.5%¹⁰⁹ y 11 – 29%¹¹⁰, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, evidenciando que en población mexicana la frecuencia de este marcador de mal pronóstico es menor que en la población estadounidense e iraní^{27,30,108}.

En cuanto al marcador de buen pronóstico TEL-AML1 (ETV6-RUNX1), este se halló en un porcentaje de expresión de 4.3% (Gráfico 10), representando el 25% de las LAL con inmunofenotipo pre-B, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura²⁷. Cabe señalar que

otros estudios indican que la t(12;21)(p13;q22) es indetectable por métodos convencional de bandeado G en el estudio citogenético, debido al bandeo “enmascarado” que presenta esta translocación con el cariotipo normal³¹, técnica que es la utilizada en el HGM para realizar los cariotipos y efectivamente en la cual no se pudo hallar la presencia de esta translocación, ya que el resultado emitido por el laboratorio de citogenética reportó un cariotipo 46 X,Y para dicho paciente; por lo tanto, nuestros resultados demuestran la importancia de la detección de éste transcrito mediante RT-PCR, ya que el 4.3% que se detectó positivo para esta translocación no se hubiera encontrado solo con el cariotipo.

Según lo reportado por Ramakers, et al, en el año 2000³², las células TEL-AML1 positivas tienen mayor sensibilidad al uso de L-Asparaginasa, hecho que debería ser considerado por los médicos como guía para la optimización de los fármaco utilizados durante las fases de inducción y consolidación del tratamiento.

Nuestro equipo de trabajo encontró la expresión de un marcador de riesgo estándar como lo es E2A-PBX1, en una frecuencia similar a la reportada en la literatura^{30, 108}. En el caso de la frecuencia en población mexicana, Valdovinos, et al; en 2015 reportó la ausencia de este gen quimérico en un total de 19 pacientes del Hospital Juárez de México¹⁰⁹.

Con respecto al marcador AF4-MLL, este estuvo ausente en la totalidad de los pacientes analizados (Tabla 21), lo cual es muy diferente a lo reportado por Teitell y Zuckerman, quienes reportan dicha translocación como la segunda más frecuente en LAL después de BCR-ABL m, con una frecuencia de 10% y de 3-7%^{25,108}.

Es de suma importancia mencionar que en ningún paciente con LAL se detectaron translocaciones cromosómicas por medio de las pruebas citogenéticas; la frecuencia de las translocaciones reportadas en este estudio se determinaron únicamente por las pruebas de biología molecular (Tabla 20).

En cuanto a la expresión de biomarcadores en LAM se halló la presencia de PML-RAR α en 50% de los pacientes con LAM-M3, dicho marcador es patognomónico de la patología y cuenta con tres variedades del transcrito (bcr1, bcr2 y bcr3), las halladas por nuestro equipo de trabajo fue la bcr1; Gabert, et al; en 2003 reportó que esta variedad (bcr1) se encuentra en 55% de los pacientes con leucemia promielocítica aguda, bcr2 en el 5% y bcr3 en el 40%, lo cual es similar con la frecuencia encontrada en este estudio para la variante bcr1.

La detección de la t(15;17)(q22;q21) es fundamental en los pacientes con la variedad LAM-M3, pues es la causante del detenimiento de la maduración de la línea mieloide (paso de promielocito a mielocito), con la cual una vez detectada, el paciente se vuelve candidato al tratamiento con ácido *trans*-retinoico (ATRA), el cual promueve la diferenciación celular de la línea afectada. Es importante destacar que 3 de los 5 pacientes hallados positivos para PML-RAR α tuvieron resultados normales en su estudio citogenético (46 X,X y 46 X,Y según el género) (Tabla 26), similar a lo reportado por Cerón, et al, en 2015, quienes determinaron la presencia de PML-RAR α en pacientes con supuesto cariotipo normal²³.

En el caso de las LMC se corroboró la expresión de BCR-ABL M en el 100% de los individuos (Gráfico 36, Tabla 28), lo cual concuerda con la literatura universal, la cual indica que más del 95% de los pacientes con LMC van a evidenciar la presencia de la t(9;22); la identificación de este marcador es esencial, ya que en el HGM es requisito indispensable para los pacientes con

LMC que se demuestre la presencia de la t(9;22) para poder ser candidatos al tratamiento con inhibidores de tirosin cinasa (Imatinib), lo cual refleja nuevamente la importancia de este estudio, ya que como se detalla en la Tabla 26, en un 47.8% (11/23) de los pacientes, el hallazgo de la t(9;22)(q34;q11) se realizó únicamente por el estudio de biología molecular (Tabla 26).

En el caso de los pacientes con LMC subsecuentes, el marcador BCR-ABL M fue detectado en pacientes que contaban con respuestas tanto hematológica como citogenética completas, mostrando la alta sensibilidad de los estudios de biología molecular frente a los estudios citogenéticos y citomorfológicos (Tabla 30); de manera clínica esto demuestra que el tratamiento no está eliminando a la totalidad de las células leucémicas, las cuales darán origen a la expansión de la clona celular maligna que puedan resultar en una recaída del paciente; es entonces que el médico debe tomar en cuenta dichos resultados para poder tomar decisiones terapéuticas adecuadas en cuanto a el aumento de la dosis del tratamiento administrado o realizar un cambio en los fármacos empleados, debido a que se pueda estar creando una resistencia al tratamiento inicial.

Por otra parte, debido a que la mayoría de las neoplasias (incluidas las leucemias) muestran resistencia inicial a la quimioterapia, o la adquieren en el curso del tratamiento, lo que constituye un obstáculo para la curación de estos, se han estudiado algunos de los mecanismos que participan en la resistencia a drogas como es la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en el transporte de sustratos a través de la membrana celular, como lo son los genes ABC-B1 y ABC-G2; los cuales se han hallado presentes en diversas neoplasias como cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer mamario, cáncer de próstata, y neoplasias hematológicas como leucemia aguda mieloblástica, leucemia aguda linfoblástica y leucemia mieloide aguda. Así como también se ha descrito su actividad en casos de refractariedad al tratamiento en enfermedades neoplásicas como como el sarcoma indiferenciado⁵⁴, carcinoma hepatocelular⁵⁵, linfoma nasal de células NK/T⁵⁶, cáncer mamario⁵⁷, cáncer de células germinales⁵⁸; así como en las neoplasias onco-hematológicas (linfomas y leucemias)^{59,60}

En el HGM el tratamiento de las leucemias consiste aun en un régimen intensivo de quimioterapia, en donde se utilizan vincristina y daunorrubicina para el tratamiento de la LAL, citarabina y daunorrubicina para el tratamiento de LAM (ATRA en el caso de las LAM-M3), e Imatinib para el tratamiento de LMC. Sin embargo, aún con el uso de estos fármacos, las tasas de remisión completa (RC) aún son bajas (LAL=20% y LAM=15%, ambas en población adulta); siendo la resistencia celular a la quimioterapia la principal causa de falla en el tratamiento.

Nuestro equipo de trabajo estudió la expresión de dos de los genes que codifican para las proteínas más estudiadas especializadas en la expulsión de sustancias nocivas para la célula (ABC-B1 y ABC-G2), las cuales tienen como sustratos a los fármacos antes mencionados.

En la población de estudio el tipo de leucemia que más expresa ABC-B1 antes de la inducción a la remisión fue la LAL con una frecuencia de 60.9%, seguida de la LAM 47.5% y por último la LMC con un 26.1%. Mientras que para ABC-G2, la mayor frecuencia de expresión fue en los pacientes con LMC con un 47.8%, seguida de la LAL con 43.5% y LAM con 35.3%. En pacientes en seguimiento la frecuencia de expresión de ABC-B1 fue de 63.6% y 36.6% para ABC-G2.

Martínez, et al; en 2010 reportó una frecuencia de expresión para el gen ABC-B1 de 27.3% en 22 pacientes con LAM, 14 con LAM-M4, 4 con LAM-M2 y 1 con LAM-M1, encontrando correlación estadísticamente significativa ($p=0.009$) entre la expresión de ABC-B1 con la actividad del padecimiento de base posterior al tratamiento de inducción a la remisión, es decir, con un leucemia refractaria, pudiendo establecer que este marcador molecular tiene relevancia con la falla al tratamiento.

La frecuencia obtenida por nuestro grupo de trabajo en LAM fue de 47.1% (1.7 veces mayor que el estudio anterior) el aumento en la expresión podría deberse a que se incluyeron pacientes con LAM-M3.

En cuanto a los niveles de expresión, los pacientes con LMC Subsecuentes son el grupo que presenta mayor frecuencia de individuos con sobreexpresión de ABC-B1 con un 27.3%, seguido de los grupos de LAM con 23.5%, LAL con 21.7% y por último el grupo de LMC con 13%. La sobreexpresión de ABC-G2 solo se detectó en pacientes con LMC y con LAL, teniendo una mayor frecuencia de sobreexpresión en LMC con 8.7% que en LAL con un 4.3%.

Según lo reportado por Balderas, et al; en 2014 existe una correlación entre los niveles de expresión de ABC-B1 con el comportamiento clínico y la muerte de los pacientes. Los pacientes con niveles normales de ABC-B1 tuvieron mayor sobrevida que aquellos con sobreexpresión o ausencia de este. En el trabajo publicado por Cortez, et al; en 2009, quien sugiere que la ausencia de los genes de resistencia a drogas como ABC-B1, ABC-C1, ABC-C3 y ABC-G2, está asociada con un alto riesgo de muerte en niños con LAL, debido a la alta toxicidad causada por el tratamiento¹¹¹.

Por otra parte, los genes ATC han tenido gran relevancia clínica y en terapia en los últimos años, ya que se ha reportado su expresión en diversos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de faringe, cáncer de tiroides, carcinoma gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer mamario, cáncer pancreático, ovárico y cérvico uterino, entre otros; en cuanto a su expresión en neoplasias hematológicas, autores como Andrade, et al; en 2008, reportó en 39 muestras de mieloma múltiple avanzados, la presencia de MAGE-C1/CT7 en 77% de los pacientes, LAGE-1 en 49%, MAGE-A3/6 41%, MAGE-A2 36%, GAGE 33%, NY-ESO1 33%, BAGE-1 28%, MAGE-A1 26%, PRAME 23%, SSX-1 26% MAGE-A12 20.5%; Olarte, et al; en 2012; demostró que existe expresión de los ATC en 46 pacientes con linfoma de células B maduras, 10 con linfoma de células T maduras y 13 con linfoma de Hodgkin; encontrando una frecuencia de MAGE-A3 de 44.9%, NY-ESO1 33.3%, MAGE-A4, MAGE-B2 y LAGE con 27%, 21% y 20% respectivamente; los genes GAGE, BAGE y MAGE-C1 tuvieron frecuencia menores del 20% (15.9%, 13% y 7.2%). En el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) se encontraron frecuencias para MAGE-A3 de 39.28% y de NY-ESO1 de 46.42%; y en el caso de linfoma de Hodgkin se encontró presencia de MAGE-A3 en 30% de los casos de celularidad mixta y un 15.38% en el linfoma de variedad esclerosis nodular, en este estudio se demostró que los pacientes con LDCGB que tuvieron ausencia de expresión de ATC tenían una mayor sobrevida que los que presentaban expresión de estos; así también los pacientes que presentaban expresión de solo 1 ATC tenían mayor sobrevida que en los que se determinó co-expresión de diversos ATC, determinando la presencia de los ATC como un factor de mal pronóstico.

En el caso de leucemias, nuestro grupo de investigación cuenta con reportes previos; en donde Mendoza, et al; en 2011¹⁰⁶, determinó la presencia de MAGE-A3, MAGE-B2, MAGE-C1,

MAGE-4, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO1 en 65 pacientes con LMC *de novo*. En este estudio se hallaron correlaciones de la expresión de ATC con parámetros clínicos como sexo, número de leucocitos y número de plaquetas; y Martínez, et al; en 2007⁸⁶, reportó la expresión y frecuencias de expresión de MAGE-A1, MAGE-A3 y MAGE-B2 en 115 pacientes, en 41.17% (14/34) de los pacientes con LAM (MAGE-A1 1/32, MAGE-A3 10/32; MAGE-B2 3/32); en los pacientes LAL se detectaron en 30.26% (23/76) del total de la población, con MAGE-A1 en 2/76, MAGE-A3 en 20/76 y MAGE-B2 en 1/76; y MAGE-B2 se halló en 5% (1/5) de los pacientes que presentaban LMC.

En el presente trabajo, no se encontró la expresión del gen MAGE-A3, ni de NY-ESO1 en ninguna variedad de leucemia, lo cual es diferente a lo ya reportado por Mendoza¹⁰⁶ y Martínez⁸⁶ en una población similar; este fenómeno se puede atribuir a lo reportado por Ruíz; en 2009⁴, quien refiere que las leucemias son un grupo heterogéneo de patologías, las cuales difieren en etiología, patogénesis, biología de la célula neoplásica, historia de progresión de la enfermedad y pronóstico. Otro posible factor es lo reportado por Heidebrecht, et al; en 2006⁸⁷ quien asegura que las neoplasias hematopoyéticas tienen una muy baja frecuencia de expresión de ATC. Considerando aspectos metodológicos se descarta la probabilidad de haber tenido pacientes falsos-negativos, ya que la amplificación del control positivo de la línea celular K562 (Figura 25) demuestra que las condiciones de amplificación del transcrito del gen eran las ideales, dejando como posible causa de la ausencia de expresión en la totalidad de los pacientes, que dichos genes hayan tenido niveles de expresión muy bajos y que fueran imperceptibles mediante RT-PCR punto final, proponiendo que la determinación de la expresión de estos genes se tenga que llevar a cabo mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) que es de mucho mayor sensibilidad.

Por otra parte, asegurando la totalidad de pacientes negativos para los ATC, se puede decir que lo hallado en nuestro estudio, es igual a lo reportado por Chambost, et al; en 2001¹⁰⁵, quien reportó la ausencia de la expresión de genes de la familia MAGE-A (incluido MAGE-A3) en 154 pacientes con LMC, LAM, LAL, leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia bifenotípica aguda; de igual manera nuestros resultados concuerdan con lo publicado por Lim, et al; en 1999¹¹², en donde reporta la ausencia de la expresión de NY-ESO1 en 87 muestras de pacientes con leucemia *de novo* (5 de LAL, 52 de LAM (10 LAM-M1, 26 LAM-M2, 4 LAM-M3, 9 LAM-M4 y 3 LAM-M5) y 30 de LMC).

La expresión de este grupo de genes es de mal pronóstico para pacientes con neoplasias; como el atribuido a MAGE-A3 que es asociado a los factores reportados por Yang, et al; en 2007, quien señala que en líneas celulares las proteínas de la familia MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C forman complejos con KAP-1, que tiene actividad co-represora sobre p53, lo cual causa la interferencia de la respuesta apoptótica debida al daño a DNA, dependiente de p53, lo cual confiere a la célula tumoral una ventaja de supervivencia. Yang, et al; en 2007, demostraron que la expresión de las proteínas de la familia MAGE contribuyen al desarrollo de las células tumorales, permitiendo la proliferación de las células malignas, así como prolongando la supervivencia de éstas⁹¹.

El impacto de este panel al determinar factores pronósticos radica en proporcionar información valiosa para el equipo de la salud para que se puedan determinar estrategias terapéuticas para el manejo correcto de los pacientes; es decir, los pacientes con determinación de genes de fusión de mal pronóstico deben ser considerados para llevar a

cabo un trasplante de progenitores hematopoyéticos, de lo contrario se corre el riesgo de una recaída temprana, en comparación con los que presenten un marcadores de buen pronóstico. En cuanto a la detección de los ABC también se pueden tener estrategias terapéuticas que impliquen la inhibición de estos, como lo reportado por Fernández, et al; en 1998⁶⁶ quienes refieren la inhibición de estos mediante la administración de bloqueadores de canales de calcio, antipalúdicos, fenotiazidas, ciclosporina y dipiridamol. En cuanto a los pacientes con expresión de ATC, estos podrían ser considerados como marcadores pronósticos y por lo tanto también se les podría dar seguimiento como parte de la detección de enfermedad mínima residual.

La detección de la expresión co-expresión de estos tres tipos de biomarcadores sería una excelente herramienta para el equipo de la salud en cuanto al diagnóstico, determinación de factores pronósticos y la detección de factores que pueden influir en sus decisiones terapéuticas, por lo tanto, la inclusión de un panel como este en los sistemas de salud pública ampliaría el panorama del estudio y tratamiento de las leucemias, que se espera se pueda ver reflejado en mayores tasas de curación de dichas neoplasias.

8. CONCLUSIONES

- Se determinaron la presencia/ausencia y frecuencia de factores pronósticos (genes de fusión, genes de resistencia a drogas y genes ATC) en pacientes con LAL, LAM y LMC *de novo*, así como pacientes con LMC subsecuentes del Hospital General de México.
- Se determinó la presencia de sobreexpresión de los genes de resistencia a drogas ABC-B1 y ABC-G2 como marcador de mal pronóstico para la respuesta al tratamiento de los pacientes con leucemia.
- Se determinó la presencia de diversos blancos moleculares específicos para la elección del tratamiento ideal de las respectivas clases de leucemia.
- Se demostró la elevada sensibilidad de la RT-PCR mediante la detección de las translocaciones cromosómicas t(9;22) (rompimiento menor y mayor), t(12;21), t(1;19) y t(15;17), en comparación con las técnicas de FISH y citogenética, por las cuales no fueron perceptibles.
- Se determinó, de acuerdo a su sensibilidad y especificidad en la detección de células neoplásicas, a la RT-PCR como la prueba diagnóstica ideal para realizar el seguimiento de los pacientes con LMC subsecuentes.

9. PERSPECTIVAS

- Incluir los biomarcadores del panel utilizado en este estudio en el catálogo de pruebas de biología molecular de rutina del Hospital General de México para su determinación en la totalidad de los pacientes con LAM, LAM y LMC.
- Llevar a cabo el seguimiento de los pacientes analizados en este estudio, realizando la correlación de su condición actual con los marcadores moleculares expresados al diagnóstico.
- Realizar el monitoreo de los pacientes analizados en este estudio para comparar la expresión de genes al diagnóstico y posterior a su tratamiento.
- Realizar la determinación de la presencia/ausencia y de los niveles de expresión de ABC-B1 y ABC-G2 en la totalidad de pacientes con LAL, LAM y LMC, para utilizarlo como marcador pronóstico de respuesta al tratamiento.
- Determinar los niveles de expresión de los genes de multidrogo resistencia en la fase de inducción a la remisión, para poder realizar ajustes en el esquema de quimioterapia utilizado.
- Analizar los niveles de expresión de los genes de fusión utilizando qRT-PCR y utilizar dichos datos como parte de la determinación de enfermedad mínima residual.

10. REFERENCIAS

1. Mayani H., Flores E., Pelayo R., et al. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*. 2:95-107.
2. Bhullar J. (2011) Identification of genes involved in hematopoietic stem cell differentiation and leukemia differentiation and leukemia. *Theses, Dissertations and Capstones*. 23.
3. Arribas J, Vallina E. (2005). Hematología clínica. Temas de patología médica. Universidad de Oviedo. 279-281
4. Ruíz G. (2009). Fundamentos de hematología. Médica Panamericana. 4ed. 143-160.
5. Croce CM. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 358 (5):502-11
6. Oki Y, Issa JP. (2010). Epigenetic mechanisms in AML - a target for therapy. *Cancer Treat Res*. 145:19-40.
7. Irons RD, Stillman WS. (1996). The process of leukemogenesis. *Environmental Health Perspectives*. 104 (6):1239-1246.
8. Cronkite EP, Drew RT, Inoue T, et al. (1985). Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. *Am J Ind Med*. 7 (5-6):447-56.
9. Diamandidou E, Buzdar AU, Smith TL, et al. (1996). Treatment-related leukemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol*. 14 (10):2722-30.
10. Piao CQ, Ge SQ, Yang Y. (1987). Relationships between ionizing radiation, bone marrow transplantation and leukemogenesis. *Sci Sin B*. 30 (2):161-8.
11. Nordström M, Hardell L, Magnusson A, et al. (1997). Occupation and occupational exposure to UV light as risk factors for hairy cell leukaemia evaluated in a case-control study. *Eur J Cancer Prev*. 6 (5):467-72.
12. Dolcetti R, Carbone A. (2010). Epstein-Barr virus infection and chronic lymphocytic leukemia: a possible progression factor? *Infectious Agents and Cancer*. 5:22
13. Zane L, Jeang KT. (2014). HTLV-1 and leukemogenesis: virus-cell interactions in the development of adult T-cell leukemia. *Recent Results Cancer Res*. 193:191-210
14. Ross JA, Spector LG, Robison LL, et al. (2005). Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 44 (1):8-12.
15. Shi J, Shao ZH, Liu H, et al. (2004). Transformation of myelodysplastic syndromes into acute myeloid leukemias. *Chin Med J (Engl)*. 117 (7):963-7.
16. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. (2011). Perfil epidemiológico de los Tumores Malignos en México. 23,64, 83.
17. Globocan (2012): Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
18. Berrios R. (2006). *Frecuencia de enfermedades onco-hematológicas en el servicio de hematología del Hospital General de México. Revisión de 6 años*. Tesis de especialista en medicina (hematología). Universidad Nacional Autónoma de México. 32-55.
19. Secretaría de salud. (2009). GPC de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. 8-10.

20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 33 (4):451-8.
21. Jaime JC, Gómez D. (2012). Hematología. La sangre y sus enfermedades. Mc. Graw Hill. 80-101
22. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 114 (5):937-51.
23. Cerón R, Martínez A, Ramos CO, et al. (2015). Detection and analysis of tumour biomarkers to strengthen the diagnosis of acute and chronic leukaemias. *Rev Med Hosp Gen Méx.* 78 (2):78-84.
24. Foon KA, Billings RJ, Terasaki PI, et al. (1980). Immunologic classification of acute lymphoblastic leukemia. Implications for normal lymphoid differentiation. *Blood.* 56 (6):1120-6.
25. Teitell MA, Pandolfi PP. (2009). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu Rev Pathol.* 4:175-98.
26. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America.* 23 (5):991
27. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 17 (12):2318-57
28. Verfaillie CM, Hurley R, Lundell BI, et al. (1997). Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol.* 97 (1-2):40-52.
29. Pui CH, Raimondi SC, Hancock ML, et al. (1994). Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative. *J Clin Oncol.* 12 (12):2601-6.
30. Zuo Z, Jones D, Yao H, et al. (2010). A pathway-based gene signature correlates with therapeutic response in adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol.* 23 (11):1524-34.
31. Zelent A, Greaves M, Enver T. (2004). Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene.* 23 (24):4275-83.
32. Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, et al. (2000). TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 96 (3):1094-9.
33. Aspland SE, Bendall HH, Murre C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene.* 20 (40):5708-17.
34. Gole B, Wiesmüller L. (2015). Leukemogenic rearrangements at the mixed lineage leukemia gene (MLL)-multiple rather than a single mechanism. *Front Cell Dev Biol* 3:41.
35. Faber J, Krivtsov AV, Stubbs MC, et al. (2009). HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood.* 113 (11):2375-85.

36. Ramos C, Rozen E, León M, et al. (2011). Tratamiento de la leucemia linfocítica aguda del adulto: Experiencia de un hospital en la Ciudad de México. *Revista médica de Chile.* 139 (9), 1135-1142.
37. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, et al. (2012). Acute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw.* 10 (8):984-1021.
38. Melnick A, Licht JD. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 93 (10):3167-215.
39. Licht JD. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene.* 20 (40):5660-79.
40. Yates J, Glidewell O, Wiernik P, et al. (1982). Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study. *Blood.* 60 (2):454-62.
41. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, et al. (2013). Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 369 (2):111-21.
42. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. (2007). Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *The Ulster Medical Journal.* 76 (1):8-17.
- 43.
44. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 341 (3):164-72.
45. Vardiman J, Hyjek E. (2011). World health organization classification, evaluation, and genetics of the myeloproliferative neoplasm variants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 250-6
46. Zámečníkova A. (2011). Acquisition of mixed lineage leukemia rearrangement in a chronic myeloid leukemia patient while on imatinib. *Hematology Reports.* 3 (2):13
47. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 18 (2):189-218.
48. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. (1984). Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 63 (4):789-99.
49. Deininger MW. (2005). Management of early stage disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 174-82.
50. Wei G, Rafiyath S, Liu D. (2010). First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol.* 3:47.
51. Pavay T, Hoyle M, Ciani O, et al. (2012). Dasatinib, nilotinib and standard-dose imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukaemia: systematic reviews and economic analyses. *Health Technol Assess.* 16 (42):iii-iv, 1-277.
52. Soverini S, Martinelli G, Iacobucci I, et al. (2008). Imatinib mesylate for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther.* 8 (6):853-64.
53. Rogers G, Hoyle M, Thompson Coon J, et al. (2012). Dasatinib and nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukaemia: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 16 (22):1-410.
54. Gillet JP, Gottesman MM. (2010). Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol.* 596:47-76.
55. Tawa A, Inoue M, Ishihara S, et al. (1990). Increased expression of the multidrug-resistance gene in undifferentiated sarcoma. *Cancer.* 66 (9):1980-3.

56. Li G, Chen X, Wang Q, et al. (2007). The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* 27 (2):173-5.
57. Huang WT, Huang CC, Weng SW, et al. (2009). Expression of the multidrug resistance protein MRP and the lung-resistance protein LRP in nasal NK/T cell lymphoma: further exploring the role of P53 and WT1 gene. *Pathology.* 41 (2):127-32.
58. Kuo MT. (2007). Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol.* 608:23-30.
59. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, et al. (2003). Molecular determinants of treatment response in human germ celltumors. *Clin Cancer Res.* 9 (2):767-73.
60. Hirose M, Hosoi E, Hamano S, et al. (2003). Multidrug resistance in hematological malignancy. *J Med Invest.* 50 (3-4):126-35.
61. Olarte I, Miranda E, Lopez A, et al. (2010). Expresión del gen de resistencia a multidrogas (MDR-1) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. *Rev Med Hosp Gen Mex;* 73 (4):219-224
62. Gottesman MM. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 53:615-27.
63. Marin JJ, Monte MJ, Blazquez AG, et al. (2014). The role of reduced intracellular concentrations of active drugs in the lack of response to anticancer chemotherapy. *Acta Pharmacol Sin.* 35 (1):1-10.
64. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 3 (3):281-90.
65. Sun Y-L, Patel A, Kumar P, et al. (2012). Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. *Chinese Journal of Cancer.* 31 (2):51-57.
66. Ross DD. (2000). Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia.* 14 (3):467-73.
67. Fernández J, Crombet O, Vilares I, et al. (1998). Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P. *Revista cubana de oncología.* 111-113.
68. He M, Wei MJ. (2012). Reversing multidrug resistance by tyrosine kinase inhibitors. *Chin J Cancer.* 31 (3):126-33.
69. Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenka TF, et al. (2009). ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology.* 14 (4):204-12.
70. Balderas C. (2013). *Impacto clínico de los niveles de expresión de los genes de resistencia a multidrogas (ABC-B1 Y ABC-G2) en pacientes con leucemia linfoblástica aguda del Hospital General de México.* Tesis de especialista en medicina (hematología). Universidad Nacional Autónoma de México.
71. Abd El, Ghaffar HA, Aladle DA, et al. (2006). P-glycoprotein (P-170) expression in acute leukemias. *Hematology.* 11:35-41.
72. Damiani D, Tiribelli M, Geromin A, et al. (2015). ABCG2 overexpression in patients with acute myeloid leukemia: Impact on stem cell transplantation outcome. *Am J Hematol.* 90 (9):784-9.
73. Ueda K, Claek PD, Chen CJ, et al. (1987). The human multidrugresistance (MDR-1) gene: DNAC cloning and transcription initiation. *Journal of Biological Chemistry,* 262: 505-508

74. Loo T, Clarke D. (1999). The transmembrane domains of the human multidrug resistance p-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *J Biol Chem.* 274 (35):24759-65.
75. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, et al. (2010). Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab.* 11 (7):603-17.
76. Groeper C, Gambazzi F, Zajac P, et al. (2007). Cancer/testis antigen expression and specific cytotoxic T lymphocyte responses in non small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 120 (2):337-43.
77. Jungbluth A, Busam K, Kolb D, et al. (2000). Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer.* 85: 460-5.
78. Caballero OL, Chen YT (2009). Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 100 (11):2014-21.
79. Jäger E., Nagata Y, Gnjjatic S, et al. (2000). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: Correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 4760-4765.
80. Parham P. (2006) *Inmunología. Médica Panamericana.* 460-463.
81. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (5):1914-8.
82. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 254 (5038):1643-7.
83. Lee SY, Williamson B, Caballero OL, et al. (2004). Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer Immun.* 4:13.
84. Türeci O, Sahin U, Schobert I, et al. (1996). The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of sinovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* 56 (20):4766-72.
85. Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, et al. (2005). The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood.* 106 (1):167-74.
86. Olarte I, Martinez A, Ramos-Peñafiel C, et al. (2011). MAGE-A3 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology.* 16 (6):368-72.
87. Martínez A, Olarte I, Mergold MA, et al. (2007). mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells. *Leuk Res.* 31 (1):33-7.
88. Heidebrecht HJ, Claviez A, Kruse ML, et al. (2006). Characterization and expression of CT45 in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 12 (16):4804-11.
89. Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ. (2015). Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget.* 6 (18):15772-87.
90. Ghafouri-Fard S, Modarressi MH. (2009). Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. *Arch Iran Med.* 12 (4):395-404.
91. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. (2005). Cancer / testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer;* 5: 615–25.
92. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, et al. (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer research.* 67:9954-9962.

93. Monte M, Simonatto M, Peche LY, et al. (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103:11160-11165.
94. Doyle JM, Gao J, Wang J, et al. (2010). MAGE RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular cell*. 39:963-974.
95. Luetkens T, Schafhausen P, Uhlich F, et al. (2010). Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 34 (12):1647-55.
96. Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, et al. (2007). MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod*. 22 (4):953-60.
97. Iacobuzio-Donahue CA. (2009). Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol*. 4:229-49.
98. Baylin SB. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2. 4-11.
99. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. (2000). Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer*. 85(4):460-5.
100. Fratta E, Sigalotti L, Colizzi F, et al. (2010). Epigenetically regulated clonal heritability of CTA expression profiles in human melanoma. *J Cell Physiol*. 223 (2):352-8.
101. Sigalotti L, Covre A, Zabierowski S, et al. (2008). Cancer testis antigens in human melanoma stem cells: expression, distribution, and methylation status. *J Cell Physiol*. 215 (2):287-91.
102. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, et al. (2001). Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*. 61 (12) : 4671-4.
103. Brasseur F, Rimoldi D, Liénard D, et al. (1995). Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 63 (3) : 375-80.
104. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, et al. (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol*. 8:2.
105. Olarte I. (2012). *Detección de antígenos testiculares de cáncer MAGE-A3/A6, MAGEA4, MAGE-B2, MAGE-C1/CT7, NY-ESO1, LAGE-1 y GAGE en linfoma y su correlación clínico-pronóstico en la evolución de la enfermedad*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
106. Chambost H, Brasseur F, Coulie P, et al. (1993). A tumor associated antigen expression in human haematological malignancies. *J Haematology*. 84, 424.
107. Mendoza I. (2011). *Análisis de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en leucemia mieloide crónica*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
108. Chomczynski P, Sacchi N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 1 (2):581-5
109. Zuckerman T, Rowe JM. (2014). Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Reports*, 6, 59.
110. Valdovinos LR. (2015). *Diseño de una prueba diagnóstica molecular para la detección de transcritos quiméricos BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, TEL-AML1 en líneas celulares*

para el diagnóstico en leucemia linfoblástica aguda. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma México.

111. Mrózek K, Harper D, Aplan P. (2009). Cytogenetics and molecular genetic of acute lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin Noeth Am*; 23 (5): 991 - 1010.
112. Cortez MA, Scrideli CA, Yunes JA, et al. (2009). mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer*. 53 (6):996-1004.
113. Lim SH, Austin S, Owen-Jones E, et al. (1999). Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer*. 81 (7):1162-4.

11. ANEXOS

- Puntaje del Test Sokal

Escala de riesgo= $0.116 * (\text{Edad} - 43.4) + 0.0345 * (\text{Tamaño de bazo} - 7.51) + 0.188 * [(\text{Plaquetas}/700)^2] - 0.563 + 0.0887 * (\% \text{Blastos en SP} - 2.1)$

Riesgo bajo: <0.8

Riesgo intermedio: 0.8 – 1.2

Riesgo alto: >1.2

- MDR

El significado de “multidrogresistencia” deriva de las siglas en inglés MDR: mutidrug resistance, en donde se utiliza el término DRUG haciendo referencia a fármacos. Por otra parte, los transportadores ABC (causantes de la multidrogresistencia) tienen como sustratos no solo a fármacos, si no a diversos agentes xenobioticos.

- Soluciones utilizadas

PBS 1X: Solución de NaCl [0.14 M] + KCl [3 mM] + Na₂HPO₄ [15 mM] + KHPO₄ [2 mM].
Ajustar pH=7.4

Solución lítica (hipertónica): NH₄Cl [0.15 M] + NaHCO₃ [0.02 M] + EDTA [0.4 mM].
Ajustar pH=7.4

Solución D: Tiocianato de guanidina [4 M] + Citrato de sodio [25 mM] + Sarcosyl [0.5%] + 2-mercaptoetanol [0.1 M]

- Valores de referencia normales del Hospital General de México.

Leucocitos: 4.1 – 11.2 leucocitos/ μ L

Hemoglobina: 11.7 -15.5 g/dL

Plaquetas: 159 – 388 plaquetas/ μ L

DHL: 98 – 192 U/L

% Blastos: 0%

- % Blastos en MO para estratificar fases de LMC

0 – 9% Blastos en SP = Fase crónica

10 – 19% Blastos en SP = Fase acelerada

\geq 20% Blastos en SP = Crisis blástica



ORIGINAL ARTICLE

Detection and analysis of tumour biomarkers to strengthen the diagnosis of acute and chronic leukaemias



R. Cerón-Maldonado^a, A. Martínez-Tovar^a, C.O. Ramos-Peñañiel^b, E. Miranda-Peralta^a, I. Mendoza-Salas^a, E. Mendoza-García^c, E. Rozen-Fuller^b, J.J. Kassack-Ipiña^b, J. Collazo-Jaloma^b, A. Martínez-Herrera^d, I. Olarte-Carrillo^{a,*}

^a *Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Servicio de Hematología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", México*

^b *Servicio de Hematología y Hospitalización, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", México*

^c *Laboratorio de Estudios Especiales Hematología, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", México*

^d *Servicio de Genética, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", México*

Received 4 March 2015; accepted 6 April 2015

Available online 26 July 2015

KEYWORDS

Leukaemia;
Molecular markers;
RT-PCR

Abstract Molecular markers in leukaemia are essential to diagnose, establish prognosis factors and determine the correct treatment of patients; therefore, it is imperative to include molecular biology studies, so that, combined with cytomorphology and immunophenotyping studies, they constitute the differential diagnosis of these neoplasias. It is extremely important to implement a panel of molecular markers that allows us to detect oncogenes derived from chromosomal translocations, genes derived from epigenetic alterations and drug-resistant genes.

A panel of molecular markers that included 11 genes derived from chromosomal translocations BCR-ABL major and minor breakpoints, E2A-PBX1, MLL-AF4, TEL-AML1, PML-RAR α , AML1-ETO was standardised; cancer testis antigens (CTA) derived from NY-ESO1 and MAGE-A3 epigenetic alterations and multi-drug-resistant genes ABCB1 and ABCG2. 30 patients diagnosed with leukaemia from Mexico's General Hospital (Hospital General de México) were included. They suffered from acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and acute myeloblastic leukaemia (AML); bone marrow mononuclear cells were used, from which RNA was extracted for the synthesis of cDNA and RT-PCR for each of the markers. In acute lymphoblastic leukaemia (ALL), BCR-ABL biomarkers expressed under 30% (3/10), E2A-PBX1 10% (1/10), ABC-B1 80% (8/10), and ABC-G2 60% (6/10). Patients with acute myeloblastic leukaemia (AML) expressed 30% PML-RAR α (3/10),

* Corresponding author at: Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06726, México, D.F., Mexico.
E-mail address: irmaolartec@yahoo.com (I. Olarte-Carrillo).

Table 1 Sequence of the primers used and their thermal profiles.

Marker	Forward oligonucleotide	Reverse oligonucleotide	Product length (bp)	Amplification conditions
GAPDH	CGGGAAGCTTGTCATCAATGG	CATGGTTCACCCCATGACG	221	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
Beta	CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC	ATGTCTCGTCCGTGGCCTTAGCT	397	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
BCR/ABL M	TGGAGCTGCAGATGCTGACCAACTCG	TGATTATAGCCTAAGACCCGAA	304	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
BCR/ABL m	ATCTCCACTGGCCACAAAATCATACA	AGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGC	196	92 °C, 45", 56 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
E2A/PBX1	CCAGCCTCATGCACAACCA	GGGCTCCTCGGATACTCAAAA	130	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
AF4/MLL	GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT	GAAAGGAACTTGGATGGCTCA	156	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
TEL/AML	CTCTGTCTCCCCGCCTGAA	CGGCTCGTGTGGCAT	140	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
PML/RARA	TCTTCTGCCCAACAGCAA	GCTTGATAGTGCGGGGTAGAG	177	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
AML/ETO	CACCTACCACAGAGCCATCAAA	ATCCACAGGTGAGTCTGGCATT	95	92 °C, 45", 61.7 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
NY-ESO1	AAAAACACGGGCAGAAAGC	GCTTCAGGGCTGAATGGAT	308	92 °C, 1', 60 °C, 45", 72 °C, 1' (30 cycles)
MAGE A3	TGGAGGACCAGAGGCCCCC	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC	725	92 °C, 1', 67 °C, 45", 72 °C, 1' (30 cycles)
ABC-B1	GCTCCTGACTATGCCAAAGC	CTTACCTCCAGGCTCAGT	201	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)
ABC-G2	CACCTTATTGGCCTCAGGAA	CCTGCTTGAAGGCTCTATG	206	92 °C, 45", 60 °C, 45", 72 °C, 45" (35 cycles)

events and resistance mechanisms to drugs. Among the genes derived from translocations are: *BCR-ABL* major breakpoint, t(9;22), *E2A-PBX1*, t(1;19), *TEL-AML1* t(12;21), *AF4-MLL* t(4;11), *AML1-ETO*, t(8;21),¹⁴⁻¹⁶ alterations that take place due to changes in the methylation pattern, such as the testicular cancer genes that are only present in tumour cells and absent in normal tissue; *MAGE-A3*, *NY-ESO*, *MAGE-4*,^{17,18} and genes that express as resistance mechanisms to multiple drugs, such as *ABC-B1* (*MDR-1*) and *ABC-G2* (*BCR-P*) genes.^{19,20}

The results showed expression of the tumour markers in leukaemia and their potential use for the diagnosis and prognosis of these oncohaematologic diseases.

Methodology

An experimental, prospective study was carried out between February and December, 2014, at the Molecular and Cell Biology Department of the Haematology Service. The study was authorised by the Institution's Research and Ethics Committees. 30 patients of both genders with ALL, AML and de novo CML were included in the study. Bone marrow aspiration was performed after informed consent was signed.

Mononuclear cell extraction

Mononuclear cells were extracted using Lymphoprep (NycomedPharma AS, Oslo, Norway) according to the

supplier's instructions and stored at -80°C until they were used.

RT-PCR

Total cell RNA extraction was performed through Trizol reactive (Life Technologies, UK); 5 μg of RNA was used to synthesise cDNA through MMLV (Life Technologies, Paisley, UK). CRP amplification was performed using specific primers (Table 1).

Each cDNA was tested by CRP using specific primers for two genes constitutive expression β_2 microglobulin and *GADPH*. CRP reaction was carried out according to the alignment temperature previously shown in Table 1. CRP products were visualised in 2% agarose gel dyed with Midori Green Advanced (Nippon Genetics, Germany).

The amplified segments were sequenced using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit. The alignment was performed using the Gene-Bank BLASTN program, generating a 99% similarity with all the biomarkers used.

Results

Characteristics of the patients

In total, 30 patients were under study; 10 of each type (ALL, AML, CML), the median age for each group was of 32 for ALL

Table 2 Characteristics of the patients with ALL.

	N (%)	Median	Minimum
Age		32	20–55
<35	5 (50)		
≥35	5 (50)		
Gender			
Male	9 (90)		
Female	1 (10)		
Leukocytes ($\times 10^3/mm$)		56.87	0.40–372.20
<30	4 (40)		
≥30	6 (60)		
HDL (U/L)		586	149–3871
<500	3 (30)		
≥500	7 (70)		
Blast cells		30.50	0–96
Hgb (g/dL)		8.25	3.40–14.10
Platelets ($\times 10^3/mm$)		21	10–163
Splenomegaly			
Yes	3 (30)		
No	7 (70)		
Hepatomegaly			
Yes	3 (30)		
No	7 (70)		
Adenomegaly			
Yes	5 (50)		
No	5 (50)		
Immunophenotype			
Not performed	5 (50)		
B lineage	5 (50)		
Cytogenetics			
Not performed	10 (100)		

Table 3 Characteristics of the patients with AML.

	N (%)	Median	Range
Age (years)		34	21–68
<35	4 (40)		
≥35	6 (60)		
Gender			
Male	4 (40)		
Female	6 (60)		
Leukocytes ($\times 10^3/mm$)		4.20	.90–166.30
<30	9 (90)		
≥30	1 (10)		
HDL (U/L)		322	137–785
<500	7 (70)		
≥500	3 (30)		
Blast cells		–	0–58
Hgb (g/dL)		7.45	3.90–12.60
Platelets ($\times 10^3/mm$)		19.50	9–114
Splenomegaly			
Yes	1 (10)		
No	9 (90)		
Hepatomegaly			
Yes	0		
No	10 (100)		
Adenomegaly			
Yes	3 (30)		
No	7 (70)		
Immunophenotype			
Not performed	6 (60)		
Immature myeloid	2 (20)		
Mature myeloid	2		
Cytogenetics			
Not performed	7 (70)		
Normal	2 (20)		
Hyperdiploidy	1 (10)		

and 34 for AML and CML. Ages ranged between 20–55 years, 21–68 years and 18–50 years, respectively.

Regarding ALL, the morphologic classification corresponded to type L2, 70% had a B-cell immunophenotype. Only three patients had hepatomegaly and one of them had high levels of HDL, hyperleukocytosis, low levels of platelets (Table 2).

In the group of patients with AML; five patients were AML-M3 (acute promyelocytic leukaemia), four were AML-M4 (acute myelomonocytic leukaemia) and one was AML-M2 (acute myeloid leukaemia with maturation). 60% of the patients were over the age of 60 and only one reported having hyperleukocytosis. One patient had splenomegaly and three patients had adenomegaly. As for the cytogenetic alterations, only one patient with hyperdiploidy (Table 3). Lastly, out of the patients with CML, 60% was above the age of 35, 100% had hyperleukocytosis, and eight patients had high levels of HDL. 80% had splenomegaly, 10% had hepatomegaly and only 10% had adenomegaly. The cytogenetic alterations reported had t(9;22) only among 10% of the population and the study was not performed in 90% of the population (Table 4).

Expression of tumour biomarkers in leukaemia

The expression of 11 cancer biomarkers was analysed (BCR-ABL major, minor, ABC-B1, ABC-G2, E2A-PBX1, AF4-MLL, TEL-AML1, PML-RAR alpha, AML1-ETO, NY-ESO, MAGE-A3) via RT-PCR on end-point in patients with ALL, AML and CML. The quality of the RNA was evaluated by means of the amplification of the genes of constitutive expression $\beta 2$ microglobulin that amplifies an expected fragment of 397 bp and GADPH by amplifying a 221 bp fragment. The markers expressed in ALL were: BCR-ABL minor breakpoint with an amplification product of 196 bp, detected in 30% (3/10), ABC-B1 by amplifying a 201 bp fragment in 80% (8/10) and ABC-G2 with a 206 bp fragment in 60% (6/10). In addition, the expression of oncogene E2A-PBX1 with a product of 130 bp was detected in 10% (1/10) (Fig. 1).

In the case of patients with AML, the biomarkers identified were: ABC-B1 in 40% (4/10), ABC-G2 in 10% (1/10) and PML-RAR alpha with an amplified product of 177 bp in 30% (3/10). Lastly, the expression of biomarkers detected in CML

Table 4 Characteristics of the patients with CML.

	N (%)	Median	Range
Age (years)		34	18–50
<35	4 (40)		
≥35	6 (60)		
Gender			
Male	9 (90)		
Female	1 (10)		
Leukocytes ($\times 10^3/mm^3$)		273.40	102.09–524.30
≥30	10 (100)		
HDL (U/L)		664.50	190.00–1125
<500	2		
≥500	8		
Blast cells		2.00	.00–46
Hgb (g/dL)		10.80	6.40–13
Platelets ($\times 10^3/mm^3$)		362.00	78.00–2013
Splenomegaly			
Yes	8 (80)		
No	2 (20)		
Hepatomegaly			
Yes	3 (30)		
No	7 (70)		
Adenomegaly			
Yes	1 (10)		
No	9 (90)		
Cytogenetics			
Normal	1 (10)		
t(9;22)	1 (10)		
Not performed	8 (80)		

was BCR-ABL major breakpoint with an amplification fragment of 304bp in 100% (10/10), ABC-B1 in 20% (2/10) and ABC-G2 in 50% (5/10) (Table 5).

Discussion

In the last 20 years, several molecular methods have been used to detect genetic abnormalities that are important for the diagnosis and prognosis of leukaemias.^{21,22} Early



Figure 1 Representative image of a patient with LAL. Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: β -2-microglobulin (394 pb) and GAPDH (221 pb); Lane 3: BCR-ABL M (–); Lane 4: BCR-ABL m (150 pb); Lane 5: E2A-PBX1 (–); Lane 6: TEL-AML1 (–); Lane 7: AF4-MLL1 (–); Lane 8: PML-RAR α (–); Lane 9: AML1-ETO (–); Lane 10: MAGE-A3 (–); Lane 11: NY-ESO1 (–); Lane 12: ABC-B1 (201 pb); Lane 13: ABC-G2 (206 pb).

Table 5 Frequency of the panel of biomarkers in leukaemia.

Biomarker	ALL N (%)	AML N (%)	CML N (%)
Major BCR-ABL	a	a	10 (100)
Minor BCR-ABL	3 (30)	a	a
E2A-PBX1	1 (10)	a	a
AF4-MLL	a	a	a
TEL-AML1	a	a	a
PML-RAR α	a	3 (30)	a
AML1-ETO	a	a	a
NY-ESO1	a	a	a
MAGE-A3	a	a	a
ABC-B1	8 (80)	4 (40)	2 (20)
ABC-G2	6 (60)	1 (10)	5 (50)

^a Negative.

detection is essential to make decisions about specific treatments, such as with tyrosine kinase inhibitors (Imatinib, Nilotinib or Dasatinib), used in patients with CML and ALL who express BCR-ABL oncogenic protein, as well as the use of trans-retinoic acid used in patients with AML-M3 who express PML-RAR alpha protein. These treatments have shown a survival increment of up to 80% in five years.^{23,24} We searched for seven tumour markers derived from translocations, BCR-ABL major and minor, E2A-PBX1, AF4-MLL, TEL-AML1, PML-RAR alpha and AML1-ETO. The results showed the expression of BCR-ABL minor breakpoint in 30% of ALL and E2A-PBX1 expression in 10%; these results correspond to what was reported previously.^{25,26} The detection of BCR-ABL in patients with ALL enables us to detect the use of inhibitors that revert the development of the disease.²⁷ Regarding AMLs, the expression of oncogene PML-RAR alpha was detected in 30% of the AML-M3, which coincides with the international series. Its detection is essential to begin treatment with trans-retinoic acid.²⁸ It is important to point out that only one AML-M3 case had the t(15;17) by cytogenetics, from which the PML-RAR alpha transcript is derived. In the case of CMLs, only the BCR-ABL major breakpoint expression was observed in 100%, which coincides with what was reported previously. This marker is fundamental to begin treatment with Imatinib or Nilotinib, and it increases survival in up to 80% in five years.^{29,30} Our panel confirms the clinical diagnosis was performed in all cases. Cell resistance to chemotherapy drugs can represent the main cause of failure of current treatments.^{31,32} As for the expression of drug-resistant genes, ALLs express ABC-B1 more frequently, followed by AMLs and CMLs. In the case of ABC-G2, the expression is higher in ALLs, followed by CMLs and AMLs. It has been reported that the percentage of healing cases in ALLs in five years is of 30% and in AML it is between 15 and 25%.³³ Olarte Carrillo et al. reported an ABC-B1 frequency of expression of 27.3% in patients with AML. As for ALL, the frequency varies between 22 and 47% by prognosis of use.^{34,35} The expression in 22 of diagnosis could be of use during the follow-up treatment and prognosis of the disease. There is controversy over its predictive association. Our research group previously reported an association with treatment failure in 22 patients with

AML.^{36,37} In the case of the expression of genes ABC-G2, only an increment in malignant progenitor cells derived from CML has been reported.³⁸ In this study, an increment in the frequency of CML and ALL was found, so this could be associated with the mechanisms of resistance to inhibitors. In the case of the biomarkers involved in epigenetic changes like MAGE A3 and NY-ESO-1, there was no sign of expression in any of the analysed samples. Previously, in a series of 115 patients, MAGE-A3 expression was found in 41% of AML and 30% of ALL,³⁹ involved in the progression of the disease; in the case of MAGE A3, we have detected its expression in 46% of diffuse large B-cell lymphomas and an involvement with a lower survival rate.^{17,40}

In conclusion, the panel used by means of RT-PCR enables to back routine methods for decision-making in treatments, not only in the beginning but also in the detection of the minimal residual disease, which enables assessment of the tumour load in a precise and specific manner. Having a panel of 11 standardised markers reduces the time it takes to arrive at a diagnosis of oncohaematologic diseases. Knowing the frequency of expression within our population enables us to have timely detection and control, which improves the performance of current available treatments.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, CONACYT, registered under project number 162269 and 80085, as well as by the Research Department from Mexico's General Hospital under registry numbers DIC/09/04/03/131, DIC/08/204/04/017, DIC/12/204/05/01 and Novartis Oncology: CSTI571AMX10T

References

- Mancini M, Scappaticci D, Cimino G, et al. A comprehensive genetic classification of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of the GIMEMA 0496 protocol. *Blood*. 2005;105:3434–41.
- Ceppi F, Brown A, Betts DR, et al. Cytogenetic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia in Nicaragua. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53:1238–41.
- Debski R, Skonieczka K, Duszenko E, et al. The application of conventional cytogenetics, FISH, and RT-PCR to detect genetic changes in 70 children with ALL. *Ann Hematol*. 2008;87:991–1002.
- Kim Y, Jekarl DW, Kim J, et al. Genetic and epigenetic alterations of bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients. *Stem Cell Res*. 2015;24:177–84.
- Li B, Ernst P. Two decades of leukemia oncoprotein epistasis: the MLL1 paradigm for epigenetic deregulation in leukemia. *Exp Hematol*. 2014;42:995–1012.
- Van Riel B, Rosenbauer F. Epigenetic control of hematopoiesis: the PU.1 chromatin connection. *Biol Chem*. 2014;395:1265–74.
- Esposito M, So CW. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. *Chromosoma*. 2014;123:545–61.
- Jeong M, Goodell MA. New answers to old questions from genome-wide maps of DNA methylation in hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2014;42:609–17.
- Prange KH, Singh AA, Martens JH. The genome-wide molecular signature of transcription factors in leukemia. *Exp Hematol*. 2014;42:637–50.
- Greenblatt SM, Nimer SD. Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*. 2014;28:1396–406.
- Chung SS. Genetic mutations in acute myeloid leukemia that influence clinical decisions. *Curr Opin Hematol*. 2014;21:87–94.
- San Jose-Eneriz E, Agirre X, Rodríguez-Otero P, et al. Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*. 2013;5:525–38.
- Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. *Blood*. 2013;5:3899–907.
- Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-Alvarez Y, et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res*. 2008;32:1518–22.
- OldeNordkamp L, Mellink C, van der Schoot E, van den Berg H. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009;31:930–5.
- Pérez-Vera P, Salas C, Montero-Ruiz O, et al. Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;15:94–8.
- Olarte I, Martinez A, Ramos-Peñafiel C, et al. MAGE-A3 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*. 2011;16:368–72.
- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, et al. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2012;119:3097–104.
- Nasilowska-Adamska B, Solarska I, Paluszewska M, et al. FLT3-ITD and MLL-PTD influence the expression of MDR-1, MRP-1, and BCRP mRNA but not LRP mRNA assessed with RQ-PCR method in adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2014;93:577–93.
- Nasilowska B, Solarska I, Paluszewska M, et al. FLT3-ITD and MLL-PTD influence the expression of MDR-1, MRP-1, and BCRP mRNA but not LRP mRNA assessed with RQ-PCR method in adult acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2014;93:577–93.
- Oriana C, Martin H, Toby P, et al. Complete cytogenetic response and major molecular response as surrogate outcomes for overall survival in first-line treatment of chronic myelogenous leukemia: a case study for technology appraisal on the basis of surrogate outcomes evidence. *Value Health*. 2013;16:1081–90.
- Buga V, Glück A, Arion C, et al. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. *J Med Life*. 2014;15:291–5.
- Abreu RS, Baruffi MR, Lima AS, et al. The co-expression of PML/RAR alpha and AML1/ETO fusion genes is associated with ATRA resistance. *Br J Haematol*. 2005;128:407–9.
- Hu Y, Duan Q, Chen Y, et al. A novel multiplex rt-PCR assay for the detection of four chromosomal translocations of leukemia. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18:810–9.
- Yuan N, Song L, Lin W, et al. Autophagy collaborates with ubiquitination to downregulate oncoprotein E2A/Pbx1 in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2015;5:274–9.
- Schrapppe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;1:244–9.
- De França I, Da Silva RM, Vasconcelos A, et al. Frequency of p190 and p210 BCR-ABL rearrangements and survival in Brazilian adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36:351–5.

28. Masetti R, Vendemini F, Zama D, et al. All-trans retinoic acid in the treatment of pediatric acute promyelocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12:1191–204.
29. Weisberg E, Nonami A, Griffin JD, et al. Combination therapy with nilotinib for drug-sensitive and drug-resistant BCR-ABL-positive leukemia and other malignancies. *Arch Toxicol.* 2014;88:2233–42.
30. Cerny S, Rabenhorst A, Stefanzi G, et al. Long-term treatment with imatinib results in profound mast cell deficiency in Ph+ chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2014;5:3071–84.
31. Stenehjem D, Albright F, Kuo KL, et al. Response monitoring, tolerability, and effectiveness of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia in a retrospective research database. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2014;12:1113–21.
32. Mahadevan D. Will MDR-1/P-gp modulators provide clinical benefit in hematologic malignancies. *Leuk Res.* 2006;30:1077–8.
33. Xu WL, Shen HL, Ao ZF, et al. Combination of tetrandrine as a potential-reversing agent with daunorubicin, etoposide and cytarabine for the treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Leuk Res.* 2006;30:407–13.
34. Olarte I, Miranda EI, López A, et al. Expresión del gen de resistencia a multidrogas (MDR-1) en pacientes con leucemia aguda mieloblástica. *Revista Médica del Hospital General de México.* 2010;4:219–24.
35. Kim H, Park Y, Sohn K, et al. Multidrug resistance-1 gene polymorphisms associated with treatment outcomes in de novo acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006;118:2195–201.
36. Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, et al. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J.* 2004;122:166–71.
37. Galimberti S, Guerrini F, Palumbo GA, et al. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. *Leuk Res.* 2004;28:367–72.
38. Kim YK, Lee SS, Jeong SH, et al. OCT-1, ABCB1, and ABCG2. Expression in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia treated with Dasatinib or Nilotinib. *Chonnam Med J.* 2014;50:102–11.
39. Martínez A, Olarte I, Mergold MA, et al. MAGE-A3 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2007;31:33–7.
40. Hudolin T, Kastelan Z, Illic I, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in diffuse large B-cell testicular lymphoma. *J Transl Med.* 2013;11:123–8.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA



OTORGA EL PRESENTE

Reconocimiento

A
CERÓN MALDONADO RAFAEL, MARTÍNEZ TOVAR ADOLFO, RAMOS PEÑAFIEL CHRISTIAN OMAR, MIRANDA
PERALTA ENRIQUE, MENDOZA SALAS IVETH, GARCÍA LAGUNA ANEL IRAIS, DE LA CRUZ ROSAS ADRIÁN, ROZEN
FULLER ETTA, COLLAZO JALOMA JUAN, KASSACK IPIÑA JUAN JULIO, MONTAÑO FIGUEROA EFRÉN HORACIO,
LÓPEZ GONZÁLEZ GUADALUPE, MARTÍNEZ HERRERA ALEJANDRO, OLARTE CARRILLO IRMA.

AUTORES DEL TRABAJO LIBRE

Determinación de la frecuencia y niveles de expresión de los genes
de resistencia a multidrogas (ABC-B1 y ABC-G2) en pacientes
con leucemias agudas y crónicas.

POR HABER OBTENIDO EL **SEGUNDO LUGAR** EN EL CONCURSO
DE CARTELES EN EL TEMA **HEMATOLOGÍA Y ONCOGENÉTICA**

PRESENTADO EN EL



REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE

"SURSUM VERSUS"

CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

DR. JUAN EULOGIO GUERRA LIERA
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Sylvia Paz Díaz Camacho
DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR





AGRUPACIÓN MEXICANA
PARA EL ESTUDIO
DE LA HEMATOLOGÍA

Tiene el honor de entregar la presente

CONSTANCIA

a:

Cerón-Maldonado R, Martínez-Tovar A, Mendoza-Salas I, García-Laguna AI, De la Cruz-Rosas A, Miranda-Peralta EI, Rozen-Fuller E, Collazo-Jaloma J, Kassack-Ipiña JJ, Ramos-Peñañiel CO, Martínez-Herrera A, Olarte-Carrillo I. Hospital General de México, México DF

Por su participación

del trabajo en presentación en Cartel

**DETECCIÓN DE MARCADORES TUMORALES COMO FORTALECIMIENTO
EN EL DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIAS AGUDAS Y CRÓNICAS.**

Presentado en el “**56**” Congreso Anual de la **Agrupación**, evento realizado del 29 de abril al 3 de mayo de 2015, en la Ciudad de Acapulco, Gro.

Dr. Xavier López Karpovitch
Presidente de AMEH A.C.
Mesa directiva 2013-2015

Dr. Erick Crespo Solís
Vocal de Actividades Académicas
Mesa directiva 2013-2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA



OTORGA LA PRESENTE

Constancia

A

CERÓN MALDONADO RAFAEL, MARTÍNEZ TOVAR ADOLFO, RAMOS PEÑAFIEL
CHRISTIAN OMAR, MIRANDA PERALTA ENRIQUE, MENDOZA SALAS IVETH, GARCÍA
LAGUNA A. IRAIS, DE LA CRUZ ROSAS ADRIÁN, ROZEN FULLER ETTA, COLLAZO JALOMA
JUAN, KASSACK IPIÑA JUAN JULIO, MONTAÑO FIGUEROA EFRÉN HORACIO, LÓPEZ
GONZÁLEZ GUADALUPE, MARTÍNEZ HERRERA ALEJANDRO, OLARTE CARRILLO IRMA.

POR SU PARTICIPACIÓN COMO **PONENTES** EN EL **TRABAJO LIBRE**

**Determinación de la frecuencia y niveles de expresión de los genes de
resistencia a multidrogas (ABC-B1 y ABC-G2) en pacientes
con leucemias agudas y crónicas.**

PRESENTADO EN EL



REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE

"SURSUM VERSUS"

CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

DR. JUAN EULIBIO GUERRA LIERA

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Sylvia Paz Díaz Camacho

DR.A. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO

PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA



OTORGA LA PRESENTE

Constancia

A

**CERÓN MALDONADO RAFAEL, OLARTE CARRILLO IRMA, DE LA CRUZ ROSAS ADRIÁN,
RAMOS PEÑAFIEL CHRISTIAN OMAR, MIRANDA PERALTA ENRIQUE,
GARCÍA LAGUNA ANEL IRAIS, MENDOZA SALAS IVETH, ROZEN FULLER ETTA,
COLLAZO JALOMA JUAN, KASSACK IPIÑA JUAN JULIO, LÓPEZ GONZÁLEZ GUADALUPE,
GALLARDO TRILLANES EMMA, MARTÍNEZ TOVAR ADOLFO.**

POR SU PARTICIPACIÓN COMO **PONENTES** EN EL **TRABAJO LIBRE**

**Uso de pruebas moleculares como optimización en la detección de la
t(9;22) en pacientes con leucemia mieloide crónica de novo y subsecuentes.**

PRESENTADO EN EL



REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE

"SURSUM VERSUS"

CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

DR. JUAN FULGENCIO GUERRA LIERA

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

Sylvia Paz Díaz Camacho
DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR

