



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Frecuencia de mutaciones en el Gen del receptor FLT3 en pacientes pediátricos
con diagnóstico de leucemia mieloide aguda y linfocítica aguda

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

IVAN ARCOS KOHLMANN

ASESOR: M. EN C. BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ

COASESOR: DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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

Frecuencia de mutaciones en el Gen del receptor FLT3 en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda y linfoide aguda.

Que presenta el pasante: Ivan Arcos Kohlmann

Con número de cuenta: 307049483 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 20 de Septiembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. René Damián Santos	
2do. SUPLENTE	M. en C. Mariteré Domínguez Rojas	

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

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Briceida López Martínez, directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas del Q.C. Israel Parra-Ortega, con el que me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

También me gustaría agradecer la ayuda recibida de la profesora Betsabé Rodríguez Pérez, por su colaboración en esta investigación. Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a la institución sin la cual no hubiera sido posible realizar este trabajo Hospital Infantil de México Federico Gómez y, especialmente al equipo de Biología Molecular del mismo por su amistad y colaboración.

"Este proyecto fue financiado por el Hospital Infantil de México Federico Gómez con el protocolo número HIM/2014/002"

Índice

1. Resumen
2. Marco teórico
3. Generalidades de leucemias
 - 3.1 Etiología de las leucemias
 - 3.2 Incidencia
 - 3.3 Clasificación de las leucemias
 - 3.3.1 Leucemias agudas
 - 3.3.1.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)
 - 3.3.1.2 Mutaciones en LMA
 - 3.3.1.3 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)
 - 3.3.2 Leucemias crónicas
 - 3.3.2.1 Leucemia Mieloide Crónica (LMC)
 - 3.3.2.2 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)
 - 3.4 Pruebas de laboratorio para la detección de leucemias
 - 3.4.1 Citometría hemática
 - 3.4.2 Aspirado de medula ósea
 - 3.4.3 Citometría de flujo
 - 3.4.4 Cariotipo con metodología de banda G
 - 3.4.5 PCR
4. Gen FLT3
 - 4.1 Generalidades del receptor FLT3
 - 4.1.1 Función y estructura del Receptor FLT3
 - 4.1.2 Expresión del Receptor FLT3 en la hematopoyesis
 - 4.2 Ligando FLT3
 - 4.3 Mutaciones en el Gen FLT3
 - 4.3.1 Vía de FLT3 oncogénico
 - 4.3.2 FLT3 duplicación en tándem interno (FLT3/ITD)
 - 4.3.3 Ubicación estructural de Y597
 - 4.3.4 Significado pronóstico de la presencia de múltiples ITD
 - 4.4 FLT3 mutación en dominio tirosin quinasa (FLT3/TKD)

5. Justificación
6. Objetivos
 - 6.1 Objetivo general
 - 6.2 Objetivos particulares
7. Metodología
 - 7.1 Criterios de selección
 - 7.1.1 Criterios de inclusión
 - 7.1.2 Criterios de exclusión
 - 7.2 Extracción de RNA por medio del Kit QIAamp® RNA Blood Mini kit
 - 7.3 Síntesis de cDNA por medio del kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis
 - 7.4 PCR
 - 7.5 Digestión con la enzima Eco RV
8. Análisis de resultados
9. Conclusiones
10. Referencias
11. Anexos

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB).

Cuadro 2. Sistemas de Clasificación de Francesa-Americana-Británica (FAB) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Cuadro 3. Clasificación inmunológica de Leucemias Linfoblásticas Agudas.

Cuadro 4. Citometría hemática en Leucemia Aguda.

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la síntesis de DNA.

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR 1x.

Cuadro 7. Mezcla de reacción para digestión con Eco RV.

Índice de figuras

- Figura 1. Frecuencia de las diferentes variantes de leucemias agudas en los periodos de estudio de acuerdo con la clasificación FAB.
- Figura 2. Modelo de interacción de las mutaciones asociadas con la aparición de LMA.
- Figura 3. Esquema general de un cromosoma.
- Figura 4. Mutaciones en el gen FLT3 relevantes en la LMA.
- Figura 5. Representaciones esquemáticas de la estructura del receptor FLT3.
- Figura 6. Representación de la estructura cristalina del dominio cinasa FLT3.
- Figura 7. Señalización del receptor FLT3.
- Figura 8. Interacción de las alteraciones genéticas en la LMA mutaciones solapadas que se identifican frecuentemente.
- Figura 9. FLT3 señalización oncogénica.
- Figura 10. Región de la duplicación en FLT3 / ITD.
- Figura 11. Productos de PCR multiplex de dos pacientes con LMA y un control negativo
- Figura 12. Digestion de los amplificados del dominio Tirosin Kinasa (TKD).
- Figura 13. Digestion de los amplificados del dominio yuxtamembrana para identificación de la mutacion FLT-ITD.
- Figura 14. Representación esquemática del gen FLT3 (13q12) y de la localización de los primers utilizados en la reacción de amplificación.
- Figura 15. Representación esquemática del sitio de corte de EcoRV en la secuencia del Dominio Tirosin Kinasa.
- Figura 16. Frecuencia de mutaciones en FLT3.
- Figura 17. Relación de mutación en FLT3 con el diagnóstico citogenético.
- Figura 18. Procedimiento de extracción de RNA por medio del kit Kit QIAamp® RNA Blood Mini.

Glosario

Apoptosis: Tipo de muerte celular que usan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias de una forma perfectamente controlada.

Cariotipo: Conjunto de los cromosomas de una célula, de un individuo o de una especie, después del proceso en que se unen por pares de cromosomas idénticos y se clasifican según determinados criterios.

Cebador: Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

Clona: Producción de una célula idéntica.

Endógeno: Que se origina por causas internas.

Epigenética: Cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo.

Epistaxis: Hemorragia nasal.

Fenotipo: Conjunto de caracteres observables en un ser vivo en que se expresa un genotipo.

Gingivorragia: Hemorragia espontánea que se produce en las encías.

Hematopoyesis: Formación de los glóbulos rojos de la sangre que tiene lugar principalmente en la médula roja de los huesos.

Hematoquesia: Salida de sangre a través del recto como resultado de una hemorragia en el recto, en el colon o en los tramos superiores del tracto digestivo.

Hematuria: Presencia de sangre en la orina.

Inmunodeficiencia: Estado del organismo consecuente a una deficiencia funcional del sistema inmunitario de defensa.

Inmunofenotipificación: Técnica utilizada para estudiar la proteína expresada por las células.

Inmunoglobulina: Proteína presente en el suero sanguíneo y otras secreciones con capacidad para combinarse específicamente con el antígeno que se encuentra en el origen de su producción.

Linfotrópico: Asociado con, o atraídos hacia los ganglios linfáticos

Melena: Expulsión de heces negras, viscosas y malolientes debido a la presencia de sangre degradada proveniente del tubo digestivo superior.

Monosomía: Una célula que no tiene un número normal de cromosomas como resultado de una mutación (aneuploidía).

Mutación: Cambio en la secuencia de un nucleótido o en la organización del ADN de un ser vivo, que produce una variación en las características de éste y que no necesariamente se transmite a la descendencia. Se presenta de manera espontánea y súbita o por la acción de mutágenos.

Neoplasia: Formación anormal en alguna parte del cuerpo de un tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno.

Patogénesis: Origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella.

Prevalencia: Herramienta de medición que se utiliza en las estadísticas médicas. Proporciona información sobre el número de personas afectadas por una enfermedad o cualquier otro evento.

Proliferación: Incremento de la cantidad o el número de algo de forma rápida.

Protooncogen: Genes que codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de otros genes, moléculas de transducción de señales que estimulan la división celular y reguladores del ciclo celular que hacen que la célula progrese a través de este ciclo.

Translocación: Desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma.

Abreviaturas

ATP	Adenosin Trifosfato
ADN	Acido Desoxirribonucleico
GECIL	Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias
FAB	Clasificación Franco Americana Británica
FLT3	FMS-like tyrosine kinasa 3
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés High-Performance Liquid Chromatography)
HSC	Hematopoyetic Stem Cell (Células Madre Hematopoyéticas)
Ig	Inmunoglobulina
ITD	Duplicación en Tándem Interno (internal tandem duplicación)
JM	Yuxtamembrana
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-TA	Leucemia Linfoblástica Aguda T en adultos
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LLC-B	Leucemia Linfoblástica Crónica B
LLC-T	Leucemia Linfoblástica Crónica T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloblástica Crónica
M-CSF	Receptor de Macrófagos Factor Estimulante de Colonias
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGFR	Receptores del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)
RTK	Receptores Tirocin Kinasa
RT-PCR	Retrotranscriptasa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SMP	Síndrome Mieloproliferativo
TKD	Dominio Tirocin Kinasa (Tyrosine kinase domain)
TM	Transmembrana
VEB	Virus de Epstein Barr
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

La leucemia es la neoplasia que con más frecuencia se asocia a las radiaciones ionizantes y a agentes químicos. Asimismo, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar una leucemia secundaria en pacientes tratados con quimioterapia (Benett, *et al.*, 1976).

A nivel molecular, la caracterización de alteraciones genéticas en pacientes diagnosticados de LMA con cariotipo normal permite identificar distintos subgrupos pronósticos. Estas alteraciones se pueden englobar en: aquellas que se producen en proteínas que interfieren con factores de transcripción relacionados con la regulación de la diferenciación hematopoyética normal (AML1-ETO Y NPM1) y aquellas relacionadas con las cascadas de transducción de señal asociadas con la supervivencia celular o vías de muerte celular programada o apoptosis (FLT3).

Se ha utilizado con éxito marcadores moleculares de enfermedad mínima residual en pacientes con LMA portadores de alguna translocación, por lo tanto además del factor pronóstico es de alta utilidad en el seguimiento posterior de la enfermedad por técnicas de PCR cuantitativa (Martínez, *et al.*, 2010).

El gen FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) codifica para un receptor tipo tirosina cinasa (RTK) de clase III, que está relacionado estructuralmente con FMS, KIT, PDGFR α y PDGFR β (Lagunas, 2015).

Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que FLT3 es un protooncogen con capacidad de prolongar la supervivencia y aumentar la capacidad proliferativa de blastos leucémicos (Lyman, 1993 & Meshinchi, 2009).

Se ha demostrado que el receptor FLT3 juega un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación. Este receptor tiene un papel importante en la patogénesis de la leucemia, se expresa en diferentes niveles en las células debido al tipo de leucemias agudas.

La expresión de FLT3 se demostró en 30% de los pacientes con LLA y en el 70-100% de los pacientes con LMA (Karabacak, 2010).

La duplicación en tándem interna (ITD) y el dominio tirosin quinasa (TKD) son mutaciones de FLT3, mutaciones que conducen a la autofosforilación del receptor FLT3 ligando independiente y por consiguiente activación de la tirosin quinasa. Como resultado de esto, las vías relacionadas con la proliferación, la diferenciación y resistencia a la apoptosis se activan. En los últimos años, ha sido objeto de varios estudios como marcador pronóstico (Karabacak, 2010).

Las alteraciones genómicas del gen FLT3 conducen a la activación del receptor autónomo, desregulación de las vías de señales de transducción de FLT3, contribuye a la patogénesis mieloide, y se han relacionado con la respuesta al tratamiento y el resultado clínico (Juan, 1997).

Desde el descubrimiento de las mutaciones del gen FLT3 en 1996, ha habido un interés significativo en el examen de la biología molecular y la importancia clínica

2. MARCO TEÓRICO

Una leucemia implica que una célula temprana sufre un cambio genético que hará que se produzca sin control una clona anormal de sí misma porque las células anormales se multiplican en imagen y semejanza de ellas mismas, por lo que ocupan paulatinamente el espacio de la médula ósea normal.

Diversos autores han informado acerca de esta patología:

- 1827: El primer informe de leucemia se atribuye a Velpeau.
- 1847: Virchow acuñó el término leucemia y lo definió como dos afecciones: una esplénica y otra linfática, considerando como antecedente la afección de dichos órganos.
- 1891: Ehrlich introdujo métodos para su distinción.
- 1913: Se da la primera clasificación en agudas y crónicas, además en mieloides y linfoides.
- 1917: Se reconoció el aumento de su prevalencia entre niños de uno a cinco años de edad y se inició el intento de los médicos por tratarla de forma paliativa con químicos.
- 1962: Se sugirió el “tratamiento total”, que consiste en cuatro fases: 1. Inducción de la remisión; 2. Consolidación o intensificación; 3. Tratamiento intratecal o meníngeo preventivo y 4. Mantenimiento o tratamiento prolongado.

En el Cuadro 1 se enlista la clasificación morfológica vigente y actual de los padecimientos malignos de la sangre donde se reconocen 11 tipos (Hurtado, *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB).

<i>Leucemias agudas mieloblásticas</i>		
M0	LMA no diferenciada	Pobre pronóstico
M1	LMA con diferenciación mínima	Bastones de Auer en blastos
M2	LMA con maduración	Pronóstico favorable
M3	Leucemia promielocítica	Blastos granulados
M4	Leucemia mielomonocítica	Diferenciación mieloide
M4Eo	Leucemia aguda mielomonocítica con eosinofilia	Buen pronóstico
M5	Leucemia aguda monoblástica pura	Enfermedad extramedular
M6	Leucemia eritroide	Igual que M5a
M7	Leucemia megacariocítica	Pronóstico pobre
<i>Leucemias agudas linfoblásticas</i>		
L1	LLA infantil	Blastos pequeños con citoplasma pequeño
L2	LLA adulto	Blastos grandes con citoplasma medio
L3	B-células maduras	Blastos redondos y citoplasma basófilo

Las leucemias conforman un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de células endógenas de la médula ósea (Rodak, 2005).

Ortega, *et al.*,(2007) definen a la leucemia como enfermedades neoplásicas que se deben a una mutación somática de la célula progenitora, de la línea mieloide o la linfoide, su evolución varía desde las que conducen rápidamente a la muerte hasta las que evolucionan con lentitud, y se les conoce como agudas o crónicas, respectivamente.

El subtipo más común de leucemia infantil, es la Leucemia Aguda Linfoblástica (LLA), representa el 75-80% de todos los casos, mientras la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) compone aproximadamente el 20% (Hurtado, *et al.*, 2012).

Para un correcto diagnóstico es necesario realizar un aspirado de médula ósea y se requiere de un 20% de blastos para establecer el criterio de leucemia aguda en cualquiera de sus variedades.

En el mismo procedimiento se deben obtener muestras para la clasificación final del padecimiento y solicitar cariotipo e inmunofenotipo, ya que actualmente el criterio citomorfológico es de vital importancia pero ya no es suficiente debido a la existencia de rearrreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas que se han descrito.

3. GENERALIDADES DE LEUCEMIAS

3.1 Etiología

La leucemia es la neoplasia que con más frecuencia se asocia a las radiaciones ionizantes y a agentes químicos. Asimismo, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar una leucemia secundaria en pacientes tratados con quimioterapia (Benett, *et al.*, 1976).

Las leucemias linfoblásticas (LL) afectan a las estirpes celulares tipo B y T. Hay varios factores de riesgo para padecer este tipo de enfermedad:

- Ambientales: exposición a rayos X en útero o reacciones nucleares.
- Ocupacionales: tareas agrícolas, soldadura, industria maderera, uso de pesticidas, plaguicidas, tintes de cabello y solventes.
- Quimioterapia y radioterapia previas.
- Fármacos: como la Fenitoína.
- Tabaquismo antes y durante el embarazo, consumo materno de alcohol en el embarazo.
- Dieta rica en nitratos que se emplean como aditivos en la fabricación de productos cárnicos curados y, en menor medida, en la conservación del pescado y en la producción de queso.
- Agentes infecciosos, sobre todo virales, como causas de enfermedades neoplásicas.

Un ejemplo de este último punto son los linfomas no Hodgkin que se relacionan con aparición de infección viral. Las células tumorales de Burkitt africano contienen el genoma del virus Epstein-Barr (VEB), que expresa el receptor CD21 del mismo virus; sin embargo, no hay pruebas directas de células B o T en la LLA. El VEB se vincula con linfoma de Burkitt o LLA-L3, y también se han demostrado linfomas relacionados con VIH. Otro agente infeccioso es el virus linfotrópico humano tipo 1, agente causal de leucemia (linfoma de células T) (Ortega, 2007).

En 5% se relaciona con aparición de síndromes genéticos, como el Síndrome de Down, con mayor riesgo de manifestar leucemia linfoblástica aguda (LLA); inmunodeficiencia hereditaria o adquirida, como deficiencia de inmunoglobulina A; agammaglobulinemia y síndrome de Wiskott-Aldrich, otra enfermedad con alto riesgo de padecer LLA (Ortega, *et al.*, 2007).

Los hallazgos citogenéticos en células de Leucemia Mielode Aguda (LMA) han permitido identificar genes importantes en la patogénesis. Mutaciones somáticas en el 80% de éstos pacientes resultan de traslocaciones cromosómicas que afectan una región crítica de proto-oncogenes; el producto aberrante de ésta alteración interrumpe vías que regulan la diferenciación, el crecimiento o supervivencia de progenitores de células sanguíneas.

Las traslocaciones más prevalentes en LMA incluyen la t(8;21)(q22;q22) afectando los genes *AML1/ETO*, la t(15;17)(q31;q22) afectando los genes *PML/RAR α* , la t(9;11)(p22;q23) afectando los genes *MLL/AF9* y la t(9;22)(q34;q22) afectando los genes *BCR/ABL1* (Cuadro 2).

En ciertos casos, monosomías parciales o completas de algunos cromosomas (i.e. cromosoma 5 ó 7) o ganancias de cromosomas como el 4, 8 o 13 son las principales anormalidades citogenéticas observadas, aunque en las últimas no se ha definido completamente su participación. Asimismo, es interesante mencionar que pacientes con las traslocaciones 8;21 y 15;17 tienen un pronóstico más favorable; en contraste, portadores de monosomías afectando los cromosomas 5 ó 7 tienen los pronósticos menos favorables (Calvo, 2013).

3.2 Incidencia

De los mayores problemas en las naciones en desarrollo, es la alta incidencia de cáncer infantil y los limitados recursos financieros para desarrollar un programa nacional sólido para el diagnóstico precoz y el tratamiento de estos pacientes. En la actualidad el cáncer pediátrico debe considerarse como una prioridad de salud infantil en el mundo (Rivera, *et al.*, 2014).

En México conforme el registro Global de Cáncer (Globocan, 2008), la incidencia de leucemias es de aproximadamente 5.2 casos/100 habitantes. En cuanto a la estirpe, en el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas se consigna que la variedad linfoide es la más frecuente (60 % de los casos).

Uno de los principales factores que influyen en la aparición y pronóstico de la LMA y LLA es la edad. En una serie pediátrica, Pérez, *et al.* estimaron que la LLA es la variedad más frecuente en la Ciudad de México (81 % de los casos) y que el principal pico de presentación sucede entre los dos y seis años de edad. Esto es semejante a lo señalado en otras series internacionales (Eurocare, The Automated Cancer Information System). En adolescentes y adultos jóvenes, la edad también es la variedad más frecuente, a diferencia de la LMA que es más común en los adultos mayores.

La clasificación de la FAB es aún de utilidad para estratificar los diferentes subtipos de leucemia, incluso, en la mieloblástica aguda su valor es mayor, ya que permite diferenciar subtipos con implicaciones pronósticas.

En México, Buitrón Santiago *et al.* encontraron que la LMA subtipo M2 es la más frecuente (30.1 %), seguido de M4 (28.3 %), si bien la diferencia no tuvo relevancia pronóstica (Santoyo, *et al.* 2014).

Entre el año 2007 al año 2012 se registraron 14,178 pacientes con cáncer: leucemia (49.8%), el linfoma (9.9%) y los tumores del sistema nervioso central (9.4%).

El predominio de la LLA fue documentado en todos los grupos de edad en comparación con LLA y no crónica. Los linfomas se documentaron en 1417 pacientes de los cuales 52.2% tenían linfoma no Hodgkin y el 47.8% de los niños que se presentan con el linfoma de Hodgkin; esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta tendencia indica claramente que la participación del Seguro Médico ha tenido un efecto beneficioso sobre el cumplimiento del tratamiento. La tasa de mortalidad nacional / estado de residencia era de 5.8 en 2007 - 5.3 en 2012 / 100000 / año (Rivera, *et al.*, 2014).

Desde 2010, en México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad en niños entre 4 y 15 años de edad. Esto podría estar relacionado con una remisión tardía a las instituciones de expertos para el diagnóstico y tratamiento multidisciplinario temprano cáncer.

La incidencia de la LLA se ha incrementado a 30.9 % en un lapso de 40 años. El Registro Epidemiológico de Neoplasias Malignas informa por cada 100 000 habitantes de la población general una incidencia anual de leucemias agudas es de 2; de LLA es de 1.3 y de LMA es de 0.7. Existen diversas limitantes en nuestro país para la realización de un registro adecuado como la falta de reporte de casos en zonas rurales o unidades de tercer nivel o las limitaciones del seguimiento por cambios a otras instituciones. El último de estos registros fue el del Grupo Hematológico del Sur, el cual reportó en un periodo de cinco años de un total de 1879 pacientes, 675 casos de leucemias (392 leucemias agudas y 283 leucemias crónicas) (González, 2012).

En el Hospital General de México se realizó un estudio donde se presentaron las frecuencias de las diversas leucemias agudas acorde con la clasificación del grupo FAB en el Departamento de Hematología.

Con base en los registros médicos y de laboratorio, se realizó un estudio retrospectivo, comparativo y observacional en dos periodos. El primer periodo abarcó de enero de 2008 a diciembre de 2009, y el segundo de enero de 1990 a noviembre de 1992. Para el análisis estadístico se consideraron como variables de estudio la edad de presentación y el subtipo morfológico acorde con la clasificación del grupo FAB. Se incluyeron todos los pacientes que contaran con el criterio diagnóstico acorde con lo establecido por la FAB como se muestra en la Figura 1 (González, 2012).

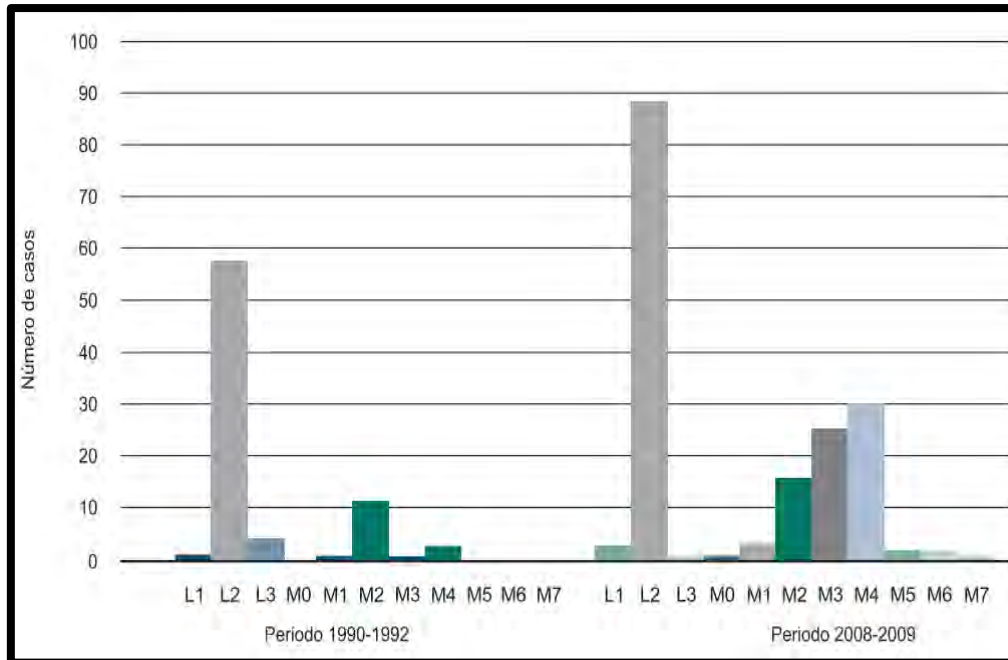


Figura 1. Frecuencia de las diferentes variantes de leucemias agudas en los periodos de estudio de acuerdo con la clasificación FAB (González, 2012).

La leucemia aguda es la principal causa de ingresos en los departamentos de hematología y conlleva alta morbilidad y mortalidad. Acorde con la edad, la LLA es la principal neoplasia en la edad pediátrica y durante la adolescencia el subtipo de leucemia linfoide aguda LLA-L1 es el más frecuente. Diversos informes en Estados Unidos y Europa mencionan que durante la edad adulta, la LMA es la leucemia aguda más frecuente, con un pico máximo de presentación por encima de los 60 años.

A diferencia de éstos, en el estudio fue la segunda más frecuente, y los subtipos LMA-M4 y LMA-M3 los más comunes. Otro objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de subtipos específicos de leucemia aguda. Uno de los principales subtipos es la leucemia promielocítica aguda (LPA/LMA-M3). Diversos autores han referido una mayor frecuencia de este subtipo de leucemia mieloide en población de origen latino americano (González, 2012).

En el Instituto Mexicano de Seguridad Social (IMSS) la incidencia global de la leucemia se encontró entre el 55.4 y 58.4 millones (Pérez, 2011).

3.3 Clasificación de las leucemias

Las leucemias se clasifican de acuerdo a distintos criterios principalmente por la rapidez de la evolución de su cuadro clínico y del tronco celular del que proceden las células.

Estos criterios nos permiten diferenciar cuatro tipos principales de leucemias: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Linfoide Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia Linfoide Crónica (LLC) (García, *et al*, 2015).

3.3.1 Leucemias agudas

Las leucemias agudas son proliferaciones neoplásicas de células hematopoyéticas inmaduras, en las que disminuyen tanto la producción de células maduras como la apoptosis y en consecuencia se acumulan las células blásticas.

Según la revisión de la OMS de 2008, se considera leucemia aguda cuando hay un porcentaje de blastos superior al 20% del total de células en la médula ósea. Hasta ese año se consideraba leucemia cuando el porcentaje de blastos en médula ósea superaba el 30%.

El diagnóstico se realiza mediante el estudio de la médula ósea y sangre periférica, numerosos blastos en sangre periférica (hiato leucémico), junto a escasos granulocitos maduros, sumados a la total ausencia de células intermedias como consecuencia de la interrupción de los procesos de proliferación y diferenciación en una etapa muy temprana. Las leucemias agudas pueden aparecer de novo o secundarias, derivadas de otras hemopatías o por alquilantes.

El grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL) creó, en 1995, un sistema basado en puntuar el número y el grado de especificidad de los marcadores expresados en las células leucémicas.

De acuerdo a estos criterios, las leucemias agudas pueden ser: Leucemia Mieloide Aguda (LMA); Leucemia Linfóide Aguda (LLA); y en menos del 5% de los casos, Leucemia bifenotípica, que expresa características mieloides y linfoides (LML) (García, *et al* , 2015).

En el siguiente Cuadro 2 se muestra el sistema de clasificación de las leucemias agudas según FAB y OMS.

Cuadro 2. Sistemas de Clasificación de Francesa-Americana-Británica (FAB) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

A. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda (FAB)
M0. Leucemia mieloide aguda sin diferenciación
M1. Leucemia mieloide aguda con diferenciación mínima
M2. Leucemia mieloide aguda con diferenciación
M3. Leucemia promielocítica aguda hipergranular o típica
M3v. Leucemia promielocítica aguda hipogranular
M4. Leucemia mielomonocítica aguda
M4v. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea
M5. Leucemia monocítica aguda
M6. Eritroleucemia
M7. Leucemia megacariocítica aguda

B. Clasificación de la Leucemia Mieloide Aguda (OMS)

Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes
Leucemia mieloide aguda con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
Leucemia mieloide aguda con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
Leucemia mieloide aguda con t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
Leucemia mieloide aguda con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
Leucemia mieloide aguda con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1
Leucemia mieloide aguda (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones en NPM1
Leucemia mieloide aguda con mutaciones en CEBPA
Leucemia mieloide aguda relacionada con cambios mielodisplásicos
Relacionada al tratamiento de neoplasias mieloides
Leucemia mieloide aguda, sin ninguna otra especificación

3.3.1.1 Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

La leucemia mieloide aguda (LMA) se refiere a un grupo de trastornos hematológicos malignos de progresión rápida, fenotípica y genéticamente heterogéneos, los cuales se caracterizan por la proliferación clonal desregulada de células inmaduras que han perdido la capacidad de diferenciarse normalmente en médula ósea, sangre periférica y otros órganos, a los que infiltra interfiriendo con sus funciones.

Clínicamente, los pacientes con LMA presentan cansancio, debilidad, palidez, disnea de esfuerzo, petequias, epistaxis y hemorragia gingival y/o conjuntival. Un 25% presenta dolores óseos y articulares como síntomas iniciales, aproximadamente la mitad presenta esplenomegalia, siendo las adenomegalias infrecuentes al igual que la afectación del sistema nervioso central.

Esto se traduce en una disminución de la producción de células sanguíneas normales con los consecuentes síntomas asociados, como anemia severa, infecciones frecuentes y hemorragias, llegando a ser fatal dentro del primer año si no se trata adecuadamente.

El laboratorio muestra anemia moderada a severa, trombocitopenia marcada, leucocitosis a expensas de células blásticas con disminución absoluta y/o relativa de los demás componentes normales. Pueden encontrarse además, recuentos normales, disminuidos o inclusive ausencia de blastos. Morfológicamente la médula ósea, se caracteriza por presencia de grandes células blásticas, de linaje granulocítico que presentan freno madurativo o hiatus leucémico. Estos blastos poseen abundante citoplasma claro a basofílico, presencia de bastones de Auer y en algunas ocasiones con gránulos muy grandes de tipo Chediak-Higashi (Cano, 2011).

El rango de incidencia es aproximadamente 1.5 por 100,000 en infantes menores de un año de edad, decrece a 0.4 por 100,000 en niños de edades entre 5 y 9 años, posteriormente se

incrementa gradualmente a aproximadamente 1 por cada 100,000 personas hacia los 25 años de edad, y finalmente comienza a incrementarse exponencialmente hasta aproximadamente a 25 por 100,000 personas en octogenarios.

La LMA puede desarrollarse como progresión de otro trastorno clonal de las células germinativas hematopoyéticas, resultado de la inestabilidad genómica y la adquisición de mutaciones adicionales.

Los principales ejemplos subyacen en las neoplasias mieloproliferativas (NMP), en las cuales aumenta la producción de uno o más tipos de células sanguíneas, y los síndromes mielodisplásicos (SMD), que se destacan por presentar defectos en la maduración que se asocian a una hematopoyesis ineficaz.

En el primer caso, las NMP se caracterizan por la presencia de proteínas tirosina cinasa mutadas cuantitativamente activadas, o bien afectaciones en la señalización por los efectores río abajo, lo cual ejemplifica perfectamente mutaciones de clase I. Por su parte, los SMD muestran defectos en factores de transcripción claves para la diferenciación hematopoyética normal y en moduladores de la apoptosis, que asemejan mutaciones de clase II (Figura 2). De esta manera, ambas patologías presentan un primer hit, lo que las hace susceptibles de desarrollar LMA si son sometidas a una segunda mutación (Lagunas, 2016).

La clasificación de la LMA fue por mucho tiempo basada en la morfología de la clasificación FAB (Cuadro 2A) y el inmunofenotipo.

Las primeras pruebas de la base genética de la LMA provienen del análisis citogenético, en el cual se detectaron cambios a nivel cromosómico como translocaciones, deleciones, inserciones, inversiones, monosomías, trisomías, poliploidías y otras aberraciones. Generalmente una o más anomalías citogenéticas son encontradas en aproximadamente el 55% de los pacientes con LMA, y debido a esto configuran un fuerte factor pronóstico dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Cuadro 2B).

Actualmente, los resultados citogenéticos permiten estratificar a los pacientes con LMA en 3 clases; favorable, intermedio y desfavorable, de acuerdo con el pronóstico clínico que se reporta en la bibliografía.

De esta manera, los pacientes con t(8;21)(q22;q22) [RUNX1/RUNX1T1], inv(16)(p13q22) [CBFB/MYH11] y t(15;17)(q24;q21) [PML/RARA] tienen un pronóstico favorable con buena respuesta al tratamiento y remisiones completas.

Por otra parte, los pacientes con t(9;11)(p22;q23) [MLLT3/MLL] se consideran con pronóstico intermedio, y en los pacientes con t(6;9)(p23;q34) [DEK/NUP214], inv(3)(q21q26) [RPN1/EVI1] y t(1;22)(p13;q13) [RBM15/MKL1] el pronóstico clínico es adverso debido a la agresividad del padecimiento y la baja respuesta al tratamiento. Estas alteraciones

citogenéticas producen genes de fusión que codifican proteínas aberrantes con propiedades funcionales alteradas (Lagunas, 2016).

La caracterización genético-molecular de estas anomalías citogenéticas recurrentes reveló que de manera directa o indirecta interferían con el desarrollo y la homeostasis de las células sanguíneas normales. Así mismo, al identificarse los puntos de corte en estos rearrreglos se logró identificar los genes afectados, la creación de genes de fusión y los productos anormales generados (proteínas quiméricas).

En la mayor parte de estas modificaciones, al menos uno de los genes involucrados codifica un factor de transcripción; así, la proteína quimérica posee cualidades reguladoras de la transcripción, pudiendo activar o silenciar genes interactuando con diversos promotores, enhancers o silencers, o bien regulando la interacción entre las histonas y el ADN (Lagunas 2016).

3.3.1.2 Mutaciones en LMA

El estudio citogenético de las células leucémicas de la sangre periférica y/o de la médula ósea de los enfermos con LMA detecta alteraciones en alrededor del 60% de los casos. Es imprescindible el análisis citogenético convencional, en el diagnóstico y es recomendable al valorar la remisión en los casos con cariotipo anómalo.

Un número creciente de anomalías genéticas de la LMA se identifican mediante RT-PCR o por FISH. Esta última técnica permite estudiar las células en interfase, lo que supone una ventaja con respecto a la citogenética convencional.

Las Tablas 1 y 2 reflejan el significado pronóstico de los hallazgos citogenéticos en la LMA. Un 30% de los pacientes con LMA tiene alteraciones citogenéticas recurrentes de la clasificación OMS. En los casos de LMA con t(15; 17), e inv(16) o t(16; 16) existe una relación tan estrecha entre los hallazgos genéticos y la morfología que la anomalía genética se puede anticipar cuando se observa con el microscopio la medula ósea y la sangre periférica.

Estas leucemias se asocian a pronóstico favorable, por lo que constituyen entidades clínico-patológicas específicas. La LMA con alteraciones propias de mielodisplasia suelen tener cariotipo complejo que incluye monosomía o delección de los brazos largos de los cromosomas 5 y 7 y lesiones de 3q.

Las anomalías que se observan más frecuentemente en pacientes tratados con agentes alquilantes o radioterapia afectan también a los cromosomas 5 o 7, mientras que en los enfermos que recibieron inhibidores de la topoisomerasa II los hallazgos habituales son reordenamientos del gen MLL (11q23) o 21q22. Aunque no es frecuente, también en pacientes con LMA secundaria pueden detectarse alteraciones citogenéticas consideradas favorables, como inv(16), t(16;16), t(8; 21) y t(15; 17).

Se ha postulado que para que ocurra la evolución de la LMA deben darse dos clases de mutaciones: las que le confieren una ventaja proliferativa (clase I), es decir, activan las vías de transducción de señales y con ello aumenta la proliferación o supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas y las que afectan los factores de transcripción o componentes de la maquinaria del ciclo celular bloqueando el proceso de diferenciación celular (clase II) Figura 2.

Este modelo propuesto por Gilliland en 2001, conocido como teoría de los dos “hits”, supone que la mayor parte de las leucemias agudas son la consecuencia de al menos dos mutaciones. La identificación de estas modificaciones genéticas requiere tecnología y metodologías que no son convencionales en los laboratorios de diagnóstico y para muchas de ellas aún no se conoce su asociación con alguna característica clínica de valor diagnóstico o pronóstico (Lagunas, 2015).

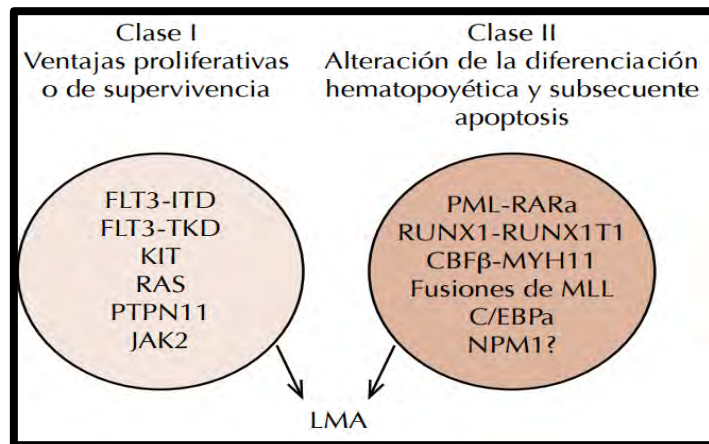


Figura 2. Modelo de interacción de las mutaciones asociadas con la aparición de LMA (Lagunas, 2015).

3.3.1.3 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Las neoplasias linfoides se originan de las células que normalmente se desarrollan en linfocitos T (LT citotóxicos, colaboradores o reguladores) o linfocitos B (linfocitos o células plasmáticas).

La clasificación FAB se muestra previamente en el Cuadro 1. En general, las neoplasias linfoides se dividen inmunológicamente en aquellas que derivan de precursores linfoides y aquellas provenientes de linfocitos maduros y células plasmáticas y posteriormente se agrupan de acuerdo a su estirpe (B o T) (Hurtado, 2012).

En el Cuadro 3 se muestra la clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) tomando en cuenta la expresión de los antígenos u otros marcadores de células leucémicas. Se trata de una clasificación simplificada elaborada por un grupo de hematólogos latinoamericanos empleando pocos anticuerpos monoclonales (Ruiz-Argüelles, 1994).

Cuadro 3. Clasificación inmunología de Leucemias Linfoblásticas Agudas

Leucemia	Variantes	Anticuerpos obligados
Leucemia Linfoblástica Aguda T	Ninguna	CD7, CD3c, CD2, CD34, CD45, I dI
Leucemia Linfoblástica Aguda B	Pro – B B común B	CD79a, CD19, 1 ILA-DR, CD34, CD45.

La LLA abarca una serie de entidades distintas que se caracterizan por reordenamientos cromosómicos, variaciones estructurales, y las mutaciones de secuencia que perturban la maduración linfoide, la proliferación celular, la supresión del crecimiento celular, y la regulación epigenética. La comprensión de la base genética de la LLA ha sido transformada por los estudios de perfiles genómicos que han identificado varios objetivos de recurrentes alteraciones genéticas y han definido nuevos subtipos de LLA.

En LLA infantil es más común observar un linaje de células B que de células T e incluye casos asociados con hiperdiploidia, hipodiploidia, y reordenamientos cromosómicos resultantes en los genes de fusión quimérica, incluyendo ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1 y BCR-ABL1, así como reordenamientos de MLL y CRLF2.

Un subtipo de precursores de células B es BCR-ABL1-like, o cromosoma Filadelfia (Ph-like), LLA. Los pacientes con Ph-like no tienen BCR-ABL1, proteína de fusión expresada a partir de (9;22) (q34; q11.2), sin embargo, el cromosoma Filadelfia tiene un perfil de expresión genética similar a la de los pacientes con BCR-ABL1 LLA. Deleciones o mutaciones del factor de transcripción de genes IKZF1 linfoide son un sello distintivo de ambos BCR-ABL1-positivo y Ph-like LLA.

Secuenciación del transcriptoma y secuenciación de todo el genoma de 15 niños con cromosoma Ph, identificó reordenamientos cromosómicos o mutaciones de secuencia de desregulación de los receptores de citoquinas y genes de tirosina quinasa en los 15 niños. Además, se ha reportado pacientes con cromosoma Ph, LLA y la fusión de los genes EBF1 - PDGFRB han tenido respuesta a la terapia con inhibidores de tirosina quinasa (Roberts, 2014).

Mutaciones en el gen FLT3 también se encuentran en adultos y pediátricos con diagnóstico de LLA pero son mucho menos frecuentes que en la LMA. El FLT3 se sobre expresa en el nivel de ARN y proteína en la mayoría de linaje B y en LMA. También se sobre expresa en un subconjunto más pequeño de LLA-T y LMC (Elyamany, 2014).

3.3.2 Leucemias crónicas

Se dividen en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y en Leucemia Linfoide Crónica (LLC).

3.3.2.1 Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

La LMC también denominada Leucemia Granulocítica o Leucemia Mielocítica Crónica, es uno de los desórdenes mieloproliferativos que puede ocurrir a cualquier edad, pero es más común en la tercera edad.

Resulta de la mutación en una célula madre pluripotencial, cuya proliferación anormal limita la hematopoyesis normal. La célula madre leucémica produce grupos celulares con tendencia leucémica, los precursores de la línea eritroide, granulocítica y megacariocítica.

Esta leucemia es caracterizada por dos fases:

- *Fase crónica, lenta, estable o benigna* que se prolonga en ocasiones por más de tres años y se caracteriza por la acumulación de precursores de la línea granulocítica y de sus derivados celulares en diferentes etapas de maduración, en la médula ósea y en la sangre periférica, que clínicamente se manifiesta por mayor o menor grado de anemia, esplenomegalia y hepatomegalia.
- *Fase aguda o crisis blástica:* caracterizada por la predominancia de un clon en el cual las células fallan en su diferenciación y en su capacidad de responder a los factores reguladores de la mielopoyesis y desencadena una infiltración celular sistémica con empeoramiento de la anemia, tendencia al sangrado por trombocitopenia e infección por leucopenia. En esta situación un 60% de las células son fenotípicamente mieloblastos y un 30% linfoblastos y con presencia de otras traslocaciones cromosómicas, además del cromosoma Ph en más del 95% de los pacientes en fase crónica.

3.3.2.2 Leucemia Linfoide Crónica (LLC)

Es una proliferación monoclonal maligna de linfocitos B, en su mayoría, menos del 5% están caracterizadas por linfocitos T.

Factores genéticos e inmunológicos, acentuados por agentes leucemogénicos, son importantes en la etiopatogenia.

Dentro de la clasificación de estas leucemias figuran siete grupos, de células B (LLC-B), de células T (LLC-T), de células T en adultos (LLA-TA), leucemia prolinfocítica, tricoleucemia, Síndrome de Sezary, linfoma y la macroglobulinemia de Waldenstrom (Camacho, 1988).

3.4 Pruebas de laboratorio para detección de leucemias

En la actualidad se utilizan nuevas técnicas para el diagnóstico de las neoplasias leucocitarias que ayudan en la clasificación de las patologías y orientan sobre el tratamiento diana más adecuado. Las pruebas que se utilizan en el laboratorio son:

- Citometría hemática y frotis de sangre periférica
- Estudio de la morfología celular en medula ósea:
 - aspirado de médula ósea con tinciones habituales y tinciones específicas
 - biopsias de la medula ósea.
- Inmunofenotipo por citometría de flujo.
- Cariotipo con metodología de bandas G.
- PCR.

3.4.1 Citometría hemática (CH)

La CH es el examen de laboratorio de mayor utilidad y más frecuentemente solicitado por el clínico. Esto es debido a que en un solo estudio se analizan tres líneas celulares completamente diferentes: eritroide, leucocitaria y plaquetaria, que no sólo orientan a patologías hematológicas; sino también a enfermedades de diferentes órganos y sistemas (López, 2016).

Los leucocitos son las células nucleadas de la sangre; incluyen a los neutrófilos segmentados y en banda, monocitos, eosinófilos y basófilos que forman parte de la inmunidad innata de cada individuo. Los linfocitos corresponden a las células que participan en la inmunidad adaptativa.

En el niño la distribución de los leucocitos varía con la edad, pero es importante recordar que más que el porcentaje en la CH, deben tomarse en cuenta los valores absolutos de cada uno de ellos;

- los neutrófilos absolutos en los primeros seis meses de vida deben ser superiores a $1,000/\text{mm}^3$, mientras que posterior a esta edad los deberemos encontrar por arriba de $1,500/\text{mm}^3$.
- En cuanto a los linfocitos en la circulación encontraremos un mínimo de $1,000/\text{mm}^3$, que corresponden a linfocitos B y T, aunque morfológicamente es imposible distinguirlos.

Las enfermedades hematológicas malignas son una causa frecuente de *leucocitosis/leucopenia*. En estos casos es necesaria una revisión cuidadosa del frotis de sangre periférica en donde se demostrará neutropenia y con frecuencia podemos encontrar células inmaduras, blastos, asociado a disminución de la hemoglobina y de las plaquetas (López, 2016).

El diagnóstico y la clasificación específica del tipo de leucemia aguda se basan en la presencia de leucocitos normales, bajos o altos, pero en la mayor parte de los casos acompañados de

blastos (mieloblastos, monoblastos, linfoblastos), según se observa en el frotis de sangre periférica o en el aspirado de medula ósea. Como los blastos desplazan a los elementos normales de la medula ósea, se presenta neutropenia absoluta.

En el cuadro siguiente se muestran resultados de la CH que guían al diagnóstico de LA (Pérez, 2011).

Cuadro 4. Alteraciones en la Citometría hemática en leucemia aguda		
Glóbulos rojos	Elevado	Otros estudios: Aspirado de medula ósea
Hemoglobina	Elevados	
Hematocrito	Elevado	
VCM	Normal	
HCM	Normal	
CHCM	Normal	
Reticulocitos	Normal o elevado ligeramente	Diagnóstico: Leucemia aguda
Leucocitos	Bajo, normal o elevado	
Diferencial	Blastos	
Frotis	Neutropenia absoluta	
Plaquetas	Bajo	

3.4.2 Aspirado de medula ósea

Se utiliza para diagnosticar, confirmar o en el seguimiento de enfermedades hematológicas, así como una herramienta de diagnóstico en los trastornos no hematológicos y neoplasias malignas.

En los adultos, la aspiración de medula ósea puede realizarse desde el esternón a nivel del espacio intercostal, la cresta iliaca anterior, o la cresta iliaca posterior. Debido a la mayor profundidad de penetración requerida, las biopsias de medula ósea se realizan normalmente de la cresta iliaca posterior, en la región de la espina iliaca, un lugar que normalmente tiene una alta concentración muy hematopoyética de medula ósea activa.

El diagnóstico de la Leucemia Aguda se efectúa con el estudio de extendidos de sangre periférica o aspirados de medula ósea, empleando tinciones pancrómicas del tipo May Grunwald-Giemsa, Wright o Romanowsky. Cuando la invasión blástica de la sangre periférica es muy grave, no hay dificultad para establecer el diagnóstico.

Este estudio debe hacerse siempre acompañado de una biopsia de hueso, para lo que se emplean agujas especiales que permiten hacer ambos procedimientos en una sola punción. La presencia de cuerpos o bastones de Auer en las células leucémicas de sangre periférica o de medula ósea es suficiente para establecer un diagnóstico o inequívoco de LMA (Ruiz-Argüelles, 1994).

3.4.3 Citometría de flujo

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión.

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Barrera, 2004).

En 2005 se estableció la utilidad clínica del inmunofenotipo para la clasificación, pronóstico y seguimiento de los pacientes con leucemia aguda (LA), y para el diagnóstico, clasificación, pronóstico y seguimiento de los pacientes con padecimientos linfoproliferativos crónicos (PLPC).

Mediante el inmunofenotipo se pueden clasificar cuatro tipos de leucemias: a) leucemia aguda linfoblástica de estirpe T (LAL-T), b) leucemia aguda linfoblástica de precursores de células B (LAL-B), c) leucemia aguda mieloblástica (LAM) y d) leucemia aguda bifenotípica (LAB).

La combinación de los marcadores CD2, CD7 y CD3 citoplásmico se consideró la más apropiada para definir a la LALT, requiriendo la co-expresión de CD3 citoplásmico con cuando menos uno de los otros dos antígenos. Para establecer el grado de madurez se recomendó investigar la expresión de CD34, TdT y la intensidad de expresión del CD45. No se consideró de relevancia clínica una subclasificación de la LAL-T.

Para la clasificación de la LAL-B, además de la combinación de anticuerpos CD19 y 1D79a se decidió, por utilidad terapéutica y clínica, adoptar la subclasificación del EGIL en: Pro-B (B-I), Común (B-II), Pre-B (B-III) y LAL de células B maduras (B-IV) empleando los anticuerpos CD10, CD34 y CD45.

Al igual que para la LAL-B, para la identificación de la LMA se consideró el uso de tres diferentes categorías de anticuerpos esenciales CD13, CD33, CD117, HLA-DR, CD34, CD45 (Piedras, 2006)

3.4.4 Cariotipo con metodología de bandas G

El cariotipo es el conjunto de cromosomas de una célula en metafase, ordenados de acuerdo a su morfología y tamaño, que caracterizan una especie. Las células somáticas del humano poseen en el núcleo 46 cromosomas (23 pares): una dotación de 22 autosomas procedentes de cada progenitor y un par de cromosomas sexuales, un cromosoma X de la madre y un X o un Y del padre. Los gametos (óvulos y espermatozoides) poseen una dotación haploide de 23 cromosomas.

El cromosoma está formado por dos cromátides unidas por un centrómero (Figura 3). Este se divide en dos brazos, el brazo corto denominado con la letra p y el brazo largo denominado con la letra q.

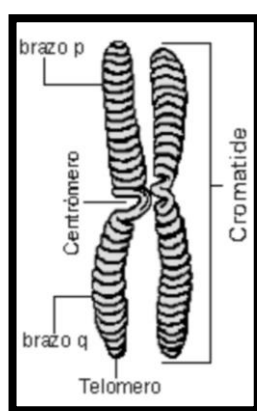


Figura 3. Esquema general de un cromosoma (Benasayag, 2010).

En la actualidad se ha establecido el componente genético de numerosas neoplasias y en varias de ellas las alteraciones cromosómicas se reconocen como un elemento crítico en su patogénesis, modificando el funcionamiento de algunos oncogenes.

En relación con las leucemias, las alteraciones citogenéticas que sirven como marcadores de las mismas, pueden presentarse tanto en el número como en la estructura cromosómica. Para detectar los cambios cromosómicos asociados con cáncer, las células afectadas deben ser analizadas por cariotipo, mediante técnicas convencionales de bandedo las cuales permiten, en la mayoría de los casos, identificar las alteraciones presentes.

El análisis cromosómico usualmente se lleva a cabo en células en mitosis (división celular), cuando los cromosomas se hacen visibles como entidades independientes, al microscopio óptico. Luego de identificar cada cromosoma por su forma, tamaño y propiedades de tinción características, se puede confeccionar el cariotipo.

Muchas de las alteraciones citogenéticas son características de una enfermedad en particular o de un subtipo de la enfermedad. Por ello, alteraciones cromosómicas específicas, especialmente en hematología, proveen información para el diagnóstico, pronóstico y

tratamiento. Las alteraciones citogenéticas pueden ser verdaderos biomarcadores para el cáncer humano.

Se puede identificar cada cromosoma utilizando diferentes técnicas de tinción. Las *bandas G* es una técnica de rutina utilizada en los laboratorios de citogenética. Los cromosomas se tratan con tripsina para desnaturalizar las proteínas cromosómicas y luego se tiñen con Giemsa. Cada par de cromosomas se tiñe con un patrón característico de bandas claras y oscuras.

Muchas de las alteraciones citogenéticas son características de una enfermedad en particular o de un subtipo de la enfermedad. Por ello, alteraciones cromosómicas específicas, especialmente en hematología, proveen información para diagnóstico, pronóstico y/o para el tratamiento, ya que son verdaderos biomarcadores para cáncer humano.

Gracias a los avances en biología molecular fue factible identificar genes relacionados con las distintas neoplasias hematológicas. Existen varias técnicas disponibles para la localización de los mismos en los cromosomas. El descubrimiento de los genes hoy permite realizar tratamientos más específicos y focalizados en cada paciente (Benasayag, 2010).

3.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN.

Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40 y 60 °C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera

exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado.

A nivel molecular, la caracterización de alteraciones genéticas en pacientes diagnosticados de LMA con cariotipo normal permite identificar distintos subgrupos pronósticos. Estas alteraciones se pueden englobar en: aquellas que se producen en proteínas que interfieren con factores de transcripción relacionados con la regulación de la diferenciación hematopoyética normal (AML1-ETO Y NPM1) y aquellas relacionadas con las cascadas de transducción de señal asociadas con la supervivencia celular o vías de muerte celular programada o apoptosis (FLT3).

Se ha utilizado con éxito marcadores moleculares de enfermedad mínima residual en pacientes con LMA portadores de alguna translocación, por lo tanto además del factor pronóstico es de alta utilidad en el seguimiento posterior de la enfermedad por técnicas de PCR cuantitativa (Martínez, *et al*, 2010).

4. GEN FLT3

El gen FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) codifica para un receptor tipo tirosina cinasa (RTK) de clase III, que está relacionado estructuralmente con FMS, KIT, PDGFR α y PDGFR β .

La identificación del gen en murinos fue realizada independientemente por dos grupos utilizando diferentes estrategias de clonación en células madre hematopoyéticas de hígado fetal y placenta. El gen humano FLT3 se clonó poco después a partir de células CD34+. Este gen se localiza en el cromosoma 13q12 y originalmente se pensó que contenía 21 exones similar a la relación intrón-exón de KIT, pero en realidad posee 24 exones, donde los tres primeros dominios inmunoglobulina extracelulares están codificados por ocho exones comparado con cinco exones para el caso de KIT (Lagunas, 2015).

El gen humano tiene más de 1,000 kilobases de longitud, codifica una proteína de 993 aminoácidos. Existen 2 isoformas del receptor una asociada a membrana (158-160 KDa) y otra forma citoplasmática (130-143 KDa) (Wang, 1996 & Parcels, 2006).

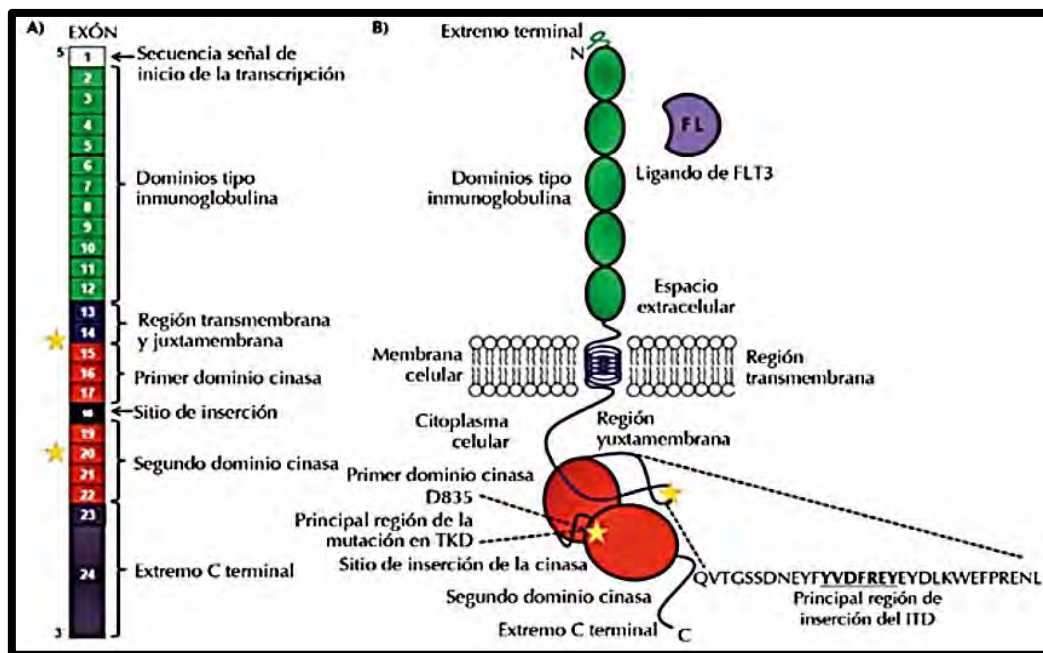


Figura 4. Mutaciones en el gen FLT3 relevantes en la leucemia mieloide aguda. A. El gen FLT3 posee 24 exones, en el exón 1 se localiza la secuencia señal de inicio de la transcripción (blanco); los exones 2 al 12 codifican los dominios tipo inmunoglobulina (verde); los exones 13 y 14 codifican principalmente la región transmembrana y yuxtamembrana (azul), respectivamente. Los dos dominios cinasa (rojo) están codificados por los exones 15 a 17 y 19 a 22, separados por el sitio de inserción codificado por el exón 18. Finalmente, el extremo C terminal (morado) es codificado por los últimos dos exones. B. La proteína FLT3 es un receptor tirosina cinasa de clase III. La mutación FLT3-ITD ocurre en la región yuxtamembrana, eliminando el impedimento estérico que normalmente bloquea la dimerización, mientras que FLT3-TKD estabiliza la forma activa de la proteína. Los sitios donde ocurren las mutaciones FLT3-ITD y TKD se detallan con estrellas (Lagunas, 2015).

Existen evidencias clínicas y experimentales que indican que FLT3 es un protooncogen con capacidad de prolongar la supervivencia y aumentar la capacidad proliferativa de blastos leucémicos (Lyman, 1993 & Meshinchi, 2009).

4.1. Generalidades del receptor FLT3

El receptor FLT3, también conocido como FLK2 (quinasa de hígado fetal-2), (FMS-like tyrosine kinase 3) es un receptor de transmembrana perteneciente a la familia de receptores tirosina-quinasa clase 3; también pertenece a esta familia el Receptor del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (FMS), el Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR-alfa/beta) y c-KIT (CD117, o Receptor Kit) (Rosnet *et. al.* 1991 & Kottaridis, 2001).

Dos grupos clonaron independientemente FLT3 en 1991 a partir de tejidos de ratón. Poco después de este período se informó de la clonación del gen FLT3 humano en 1993. Desde su identificación FLT3 se ha encontrado expresado en progenitores mieloides y linfoides, pero también en el cerebro, la placenta, el bazo, el timo, las gónadas, y el hígado (Nordigården, 2013).

La familia del receptor tirosina quinasa se divide en 20 subfamilias basadas en homología de proteínas y la estructura. La familia más importante implicada en la función de células madre hematopoyéticas (HSC-hematopoietic stem cell) y la hematopoyesis es la familia de receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Aparte del prototipo PDGFR-A y B, esta familia subclase III consta de tres miembros adicionales: c-kit, FLT3, y el receptor de macrófagos factor estimulante de colonias (M-CSF, también conocido como CSF-1).

Estos RTK son proteínas de membrana de la superficie celular que consisten de un solo dominio transmembrana, que separa el dominio citoplasmático intracelular con un motivo de tirosina quinasa de un dominio de unión a ligando extracelular que consta de cinco dominios de tipo inmunoglobulina (Nordigården, 2013).

Estas proteínas son una clase importante de enzimas que catalizan la transferencia de fosfatos a los residuos de tirosina en sustratos de proteína, la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) a difosfato de adenosina en el proceso. La fosforilación de la tirosina es un mecanismo importante para la regulación de la función de las proteínas, controlando así las funciones celulares clave tales como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación (Mead, 2009).

4.1.1 Función y estructura del receptor FLT3

El receptor FLT3 se caracteriza por poseer un extremo N-terminal extracelular compuesto por cinco dominios inmunoglobulina-like que se unen a un ligando, un dominio transmembranal (TM), un dominio intracelular de juxtamembrana (JM), una región intracelular con dos dominios tirosin-quinasa (TKD) interrumpidos por un inserto cinasa y una cola intracelular en el extremo C-terminal como se muestra en la Figura 5 (Rosnte, 1993 & Small, 1994).

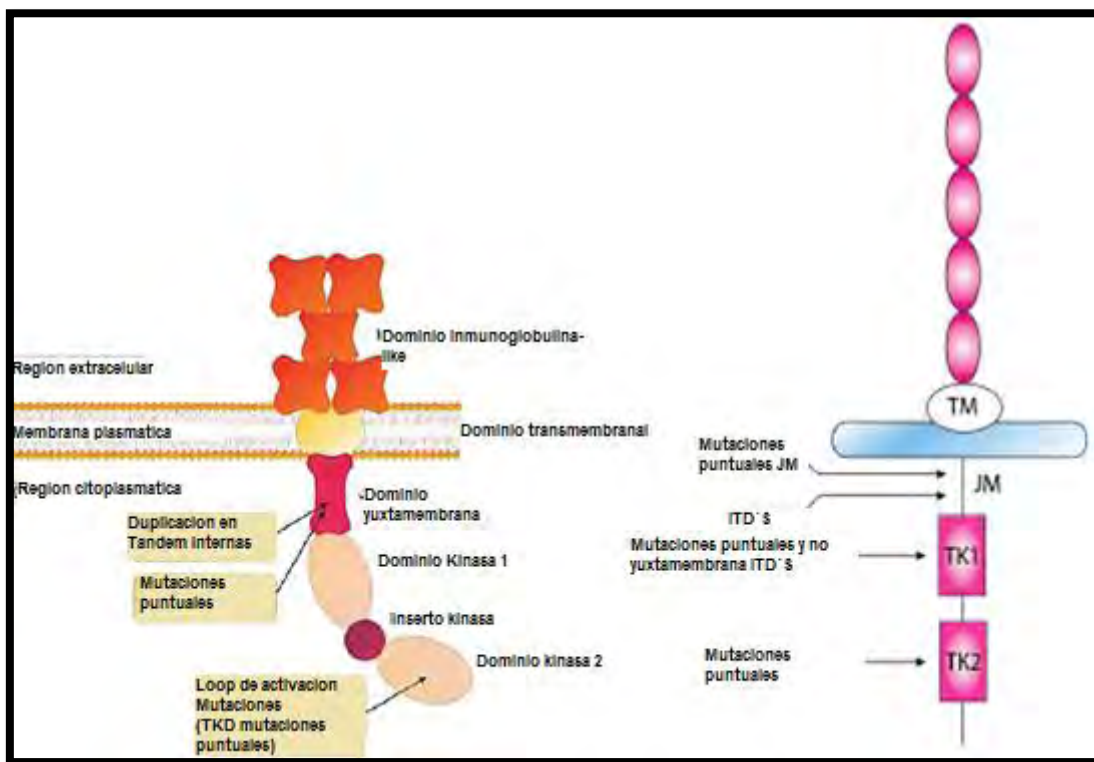


Figura 5. Representaciones esquemáticas de la estructura del receptor FLT3.

Consta de cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana (TM), un dominio juxtamembrana (JM), y dos dominios de tirosina quinasa intracelulares (TKD) unidos por un inserto de quinasa. Tras la activación de la conformación se cambia y se forman sitios activos fosforilo, de los cuales se muestran importantes residuos de tirosina (Y). Mutaciones comunes se encuentran en LMA, es decir, duplicaciones internas en tándem (ITD) y mutaciones puntuales (TKD). Figura tomada y modificada de Amanda, N. (2013), The FLT3 tyrosine kinase in leukemia. Tesis no publicada. Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University. Sweden.

Los residuos de aminoácidos 572-603 codifican el dominio JM, mientras que 604 a 946 incluyen el bucle de activación, TK dominio e inserto. La N-lóbulo o primer dominio quinasa (formado por los aminoácidos 604 a 690) consiste en 5 hojas- β plegadas y una α -hélice adyacente. Dentro de esto, el bolsillo de unión a ATP está formado por los residuos 610-631.

El C-lóbulo o segundo dominio quinasa (formado por los residuos 698 a 946) se compone de 7 α -hélice y 3 β -hojas plegadas. El bucle catalítico de la quinasa está dentro de este segundo dominio quinasa (residuos 805-820).

Los 2 lóbulos están unidos por un dominio de inserción de quinasa flexible que permite un movimiento considerable de los 2 dominios quinasa respecto a la otra. Cuando los 2 lóbulos se giran lejos unos de otros, la quinasa se lleva a cabo en un estado inactivo. Esta conformación inactiva se estabiliza mediante un bucle de activación (residuos 829 a 856 dentro del segundo dominio de quinasa) que se encuentra entre los 2 lóbulos, una conformación que es típico de la clase 3 RTK, como se observa en la Figura 6.

Además, el dominio JM también actúa para estabilizar esta conformación al hacer contacto con prácticamente todos los componentes estructurales implicados en el ciclo de activación / inactivación de FLT3, y por lo tanto es crítico para la unión de la quinasa intracelular FLT3 en un estado inactivo (Mead, 2009).

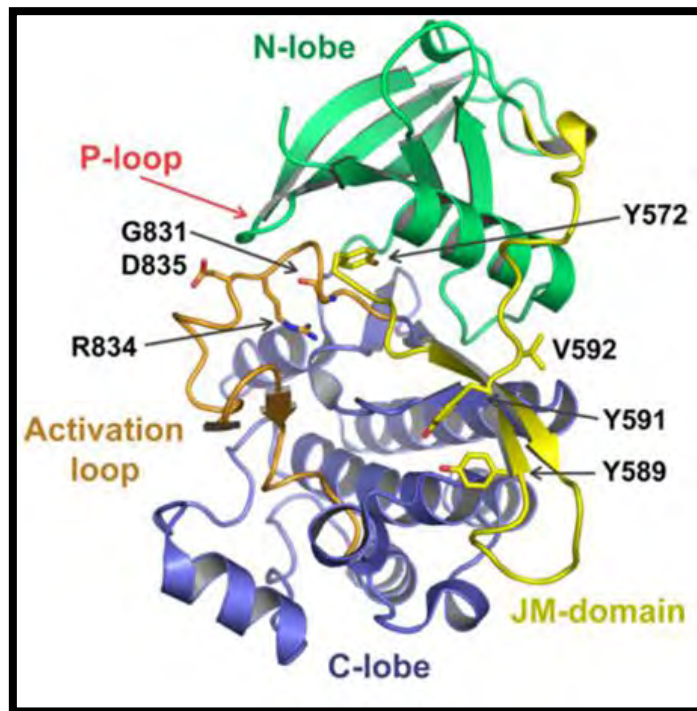


Figura 6. Representación de la estructura cristalina del dominio cinasa FLT3 (Protein Data Bank código 1RJB).

La estructura es un pliegue de cinasa típico cristalizado en la conformación autoinhibida con el dominio JM que oculta al dominio cinasa y cerrando la proteína en esta conformación. Figura obtenida y modificada de Stefan, F. Claudia, S. Ross, L. Marc, L. (2007), Identification of Driver and Passenger Mutations of FLT3 by High-Throughput DNA Sequence Analysis and Functional Assessment of Candidate Alleles, *Cáncer cell*, 12, 501–513.

Se ha demostrado que el receptor FLT3 juega un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación. Este receptor tiene un papel importante en la patogénesis de la leucemia, se expresa en diferentes niveles en las células debido al tipo de leucemias agudas.

La expresión de FLT3 se demostró en 30% de los pacientes con LLA y en el 70-100% de los pacientes con LMA (Karabacak, 2010).

Tras la interacción del receptor con el ligando FL, el receptor experimenta un cambio conformacional, que resulta en el desarrollo del receptor y la exposición del dominio de dimerización, lo que permite al receptor tomar lugar con el receptor de dimerización. Esta dimerización del receptor es el prelude de la activación de la enzima tirosina cinasa, que conduce a la fosforilación de diferentes sitios en el dominio intracelular.

El receptor activado recluta a un número de proteínas en el citoplasma para formar un complejo de interacciones proteína-proteína en el dominio intracelular. Las proteínas Shc, GRB2, GRB2 asociada a aglutinante 2 (Gab2), SHIP, CBL, y CBLB (proteína relacionada CBLB) son algunas de las proteínas adaptadoras que interaccionan con el receptor FLT3 (Brasel, 1993).

Por unión al complejo, estas proteínas se activan e inducen una cascada de fosforilaciones a que promueve la transducción de señales en vías descendentes que implican la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Las principales vías intracelulares activadas por el tipo salvaje y mutante FLT3 señalización son los RAS/quinasa y PI3-quinasa/AKT (Figura 7), mientras que la vía Jak/STAT aparece exclusivamente activada por las mutaciones FLT3-ITD (Nordigården, 2013).

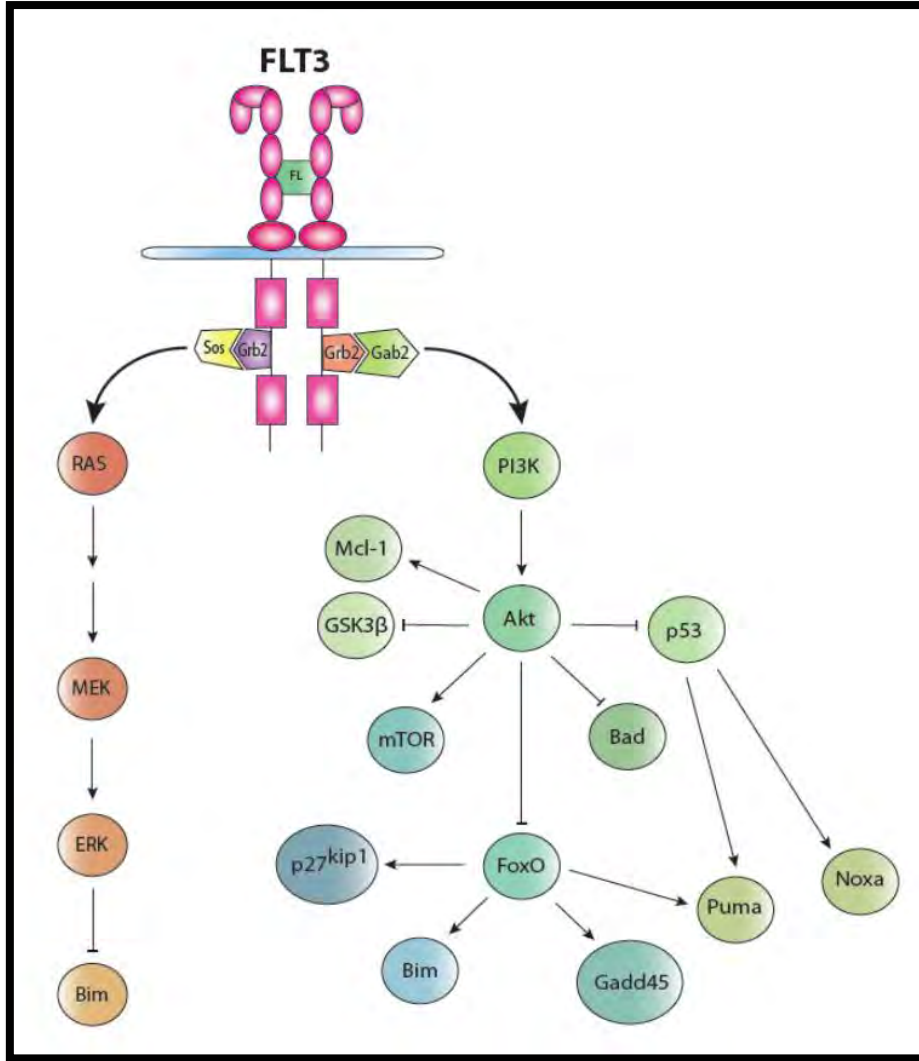


Figura 7. Señalización del receptor FLT3. Unión del ligando FLT3 (FL) al receptor, dos principales vías de señalización se activan, es decir, RAS/MAP-quinasa y PI3-quinasa/AKT, que conduce a una serie de fosforilaciones que promueven la proliferación, crecimiento, metabolismo y supervivencia celular. Figura extraída y modificada de Amanda, N. (2013). *The FLT3 tyrosine kinase in leukemia*. Tesis no publicada. Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University. Sweden

4.1.2 Función y expresión del receptor FLT3 en la hematopoyesis

FLT3 se expresa en una variedad de líneas celulares humanas y murinas tanto de linaje mieloide como de beta-linfoide. En la médula ósea normal, la expresión parece estar restringida a los primeros progenitores, incluyendo células CD4(+) con altos niveles de expresión de CD117 (c-KIT) (Ozeki, 2004 & Meshinchi, 2009).

La función óptima de FLT3 requiere el esfuerzo coordinado de otros factores de crecimiento tales como SCF e IL3 (Rasko, 1995 & (Rosnet, 1996).

En la hematopoyesis normal la expresión de FLT3 está restringida a la inmadurez de progenitores hematopoyéticos, incluyendo células madre CD34 (+) hematopoyéticas (HSCs) (Drexler, 1996).

La estimulación de FL de progenitores hematopoyéticos sin otros factores de crecimiento solicitará diferenciación monocítica, mientras que las combinaciones de factor de célula madre, interleucina 3 y FL inducirán la proliferación y el mantenimiento de células progenitoras CD4 (+) /CD38 (-) (Dasil, 1993 & Mackarechtschain, 1995).

4.1.3 Receptor FLT3 en leucemias humanas

EL FLT3 se expresa en un 70-100% de los casos de LMA y en un alto porcentaje de los casos de LLA (Brasel, 1995 & Lisovsky, 1996).

Se ha reportado la expresión del gen FLT3 en blastos leucémicos en 18 casos de 22 de LMA y 3 de cada 5 casos de LLA. Se encontró RNA expresado en niveles más altos que en médula ósea normal en 33 casos de 33 del linaje B en LLA, 11 casos de 12 de LMA y 3 de 11 en células T en casos de LLA. Por medio de Western Blot, no se detectó la expresión de FLT3 en medula ósea normal, pero se identificó la expresión de la proteína FLT3 en 14 de 14 pacientes con LLA de células B, en 36 de 41 pacientes con LMA y en 1 de 4 pacientes con LLA de células T (Drexler, 1996).

FLT3 se expresa también en niveles elevados en leucemia y líneas celulares de linfoma (Braun, 1997), incluyendo pre-B, mieloide y líneas celulares monocíticas, y la expresión de FL puede ser detectada en la mayoría de las líneas celulares. En una serie, 40 de 110 líneas celulares examinadas expresaron ambas FL y FLT3, lo que sugiere que la estimulación autocrina puede jugar un papel en la proliferación de los blastos leucémicos (Drexler, 1997).

4.2 Ligando FLT3

El ligando FLT3 (FL) es una proteína transmembranal tipo I de 235 aminoácidos que se expresa ampliamente como una forma unida a membrana y soluble. El nivel de expresión más alto de FL se encuentra en células mononucleares de sangre periférica.

La unión a la proteína ligando de FLT3 conduce a homodimerización del receptor y resulta en un cambio en la configuración normal del dominio autoinhibitorio y la activación del bucle JM. Esto conduce a la exposición de los sitios aceptores de fosforilo en los dominios de quinasa y la consiguiente autofosforilación de un número de residuos de tirosina intracelulares reguladoras clave en FLT3 (Mead, 2009).

FL se expresa en la mayoría de los tejidos, órganos hematopoyéticos (bazo, timo, sangre periférica y médula ósea) y próstata, ovario, riñón, pulmón, colon, intestino delgado, testículos, corazón, y la placenta, con el mayor nivel de expresión en células mononucleares en sangre periférica incluyendo células leucémicas (Thiade, 2005).

Esta proteína es expresada en células estromales de médula y otras células y junto con otros factores de crecimiento estimula la proliferación de las células madre, células progenitoras, células dendríticas y células NK. Así la activación de mutaciones en los receptores de tirosina cinasa para los factores de crecimiento puede conferir una ventaja de crecimiento a las células leucémicas (Sato, 2011).

Tanto la forma unida a la membrana como la soluble puede activar la actividad tirosina cinasa del receptor y estimular el crecimiento de las células progenitoras de la médula ósea y sangre. Sin embargo, FL no induce de manera eficiente la proliferación de los progenitores normales mieloides y linfoides por sí solo, pero sinergiza con otros factores de crecimiento hematopoyéticos e interleucinas (Shin, 2002 & Fernandez, 2009).

La estimulación del ligando FLT3 da la proliferación de células dendríticas y NK, por lo tanto se ha sugerido que FL podría ser potencialmente útil como un agente antitumoral de amplio espectro (Kayser, 2010 & Gupta, 2011).

En la leucemia aguda, sin embargo, la administración de FL puede ser una desventaja, algunos datos indican que la estimulación de FL-FLT3 aumenta la proliferación y la supervivencia de los blastos leucémicos (Hubbard, 2001).

4.3 Mutaciones en el gen FLT3

La duplicación en tándem interna (ITD) y el dominio tirosin quinasa (TKD) son mutaciones de FLT3, mutaciones que conducen a la autofosforilación del receptor FLT3 ligando independiente y por consiguiente activación de la tirosin quinasa. Como resultado de esto, las vías relacionadas con la proliferación, la diferenciación y resistencia a la apoptosis se activan. En los últimos años, ha sido objeto de varios estudios como marcador pronóstico (Karabacak, 2010).

Las alteraciones genómicas del gen FLT3 conducen a la activación del receptor autónomo, desregulación de las vías de señales de transducción de FLT3, contribuye a la patogénesis mieloides, y se han relacionado con la respuesta al tratamiento y el resultado clínico. La exploración de los mecanismos por los cuales estas alteraciones del gen FLT3 conducen a la proliferación desregulada proporcionaría una mejor comprensión de la patogénesis molecular de las leucemias agudas tanto mieloides como linfoides, y puede proporcionar conocimientos sobre las posibles intervenciones terapéuticas (Juan, 1997).

Desde el descubrimiento de las mutaciones del gen FLT3 en 1996, ha habido un interés significativo en el examen de la biología molecular y la importancia clínica. Los datos actuales

sugieren que las mutaciones de FLT3 no son suficientes para la transformación leucémica y requieren la cooperación de otras alteraciones genómicas para la evolución del fenotipo leucémico (Lin , *et al.* 2006).

Existe una hipótesis que implica que dos mutaciones separadas con diferentes consecuencias tienen que estar presentes para el desarrollo de LMA. FLT3-ITD y FLT3 (Asp835) son mutaciones de clase I (Naoe, 2013). En la LMA, se ha demostrado mediante análisis clínicos y experimentales en modelos donde existen dos tipos de mutaciones de conductor (clase I y clase II) que son necesarias para la expansión clonal de células leucémicas.

Por lo tanto, es importante evaluar si cada mutación es mutación de conductor o pasajera y que combinaciones están asociadas con el leucemogenesis y la significación clínica en LMA (Figura 8). El primer grupo (clase I) comprende las mutaciones que activan las vías de transducción de señales y con ello aumenta la proliferación o supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas. El otro grupo (clase II) comprende mutaciones que afectan los factores de transcripción o componentes de la maquinaria del ciclo celular y causa deterioro en la diferenciación (Calvo, 2013).

Hasta la fecha, varias combinaciones mutaciones de clase I y de clase II han sido evidentes. Aunque con frecuencia se identifican FLT3-ITD y PML-RARA mutación KIT y RUNX1 RUNX1T1 o CFBF-MYH11 y mutación de FLT3-ITD y NPM1, las otras combinaciones son relativamente infrecuentes. Recientemente, se ha sugerido que una parte de las mutaciones, como modificaciones epigenéticas, genera una nueva clase (clase III), debido a sus mutaciones de superposición con clase I y clase mutaciones II (Naoe, 2013).

Previamente se mencionaron dos tipos principales de mutación en el gen del receptor FLT3 las mutaciones de duplicación en tándem interna (ITD) y mutaciones puntuales en el dominio tirosin cinasa (TKD) (Zhang, 2000 & Lyman, 2000).

Las mutaciones ITD varían en longitud, pero siempre mantienen una orientación de cabeza a cola y preservan el marco de lectura. Se ha sugerido que un cambio conformacional en el dominio JM es responsable de la dimerización y activación del receptor (Lyman, 1994 & Meshinchi, 2003).

Las mutaciones en el bucle de activación del dominio tirosin cinasa (TKD) en su mayoría implican una sustitución de aspartato a tirosina en el codón 835, aunque otras sustituciones también se han identificado (Small, 1994 & Stirewalt, 2003). Estas mutaciones causan un cambio conformacional de la molécula y perturban su función autoinhibitoria, haciendo así el receptor constitutivamente activo (Mackarehtschian 1995 & Sitnicka, 2003).

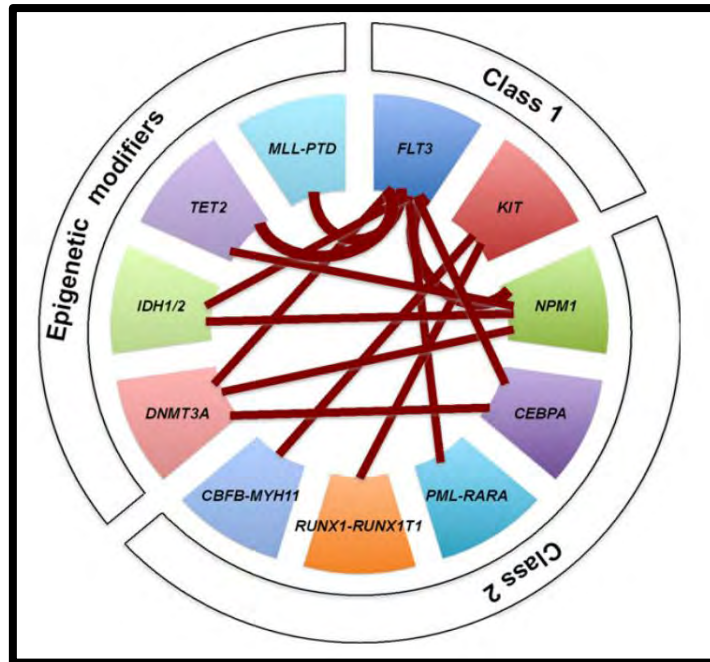


Figura 8. Interacción de las alteraciones genéticas en la LMA mutaciones solapadas que se identifican frecuentemente. Las mutaciones en modificaciones epigenéticas se solapan tanto con mutaciones clase I y clase II. Figura obtenida y modificada de Tomoki, N. Hitoshi, K. (2013), Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *International Journal Hematology*, 97, 165–174.

4.3.1 Vía de FLT3 oncogénico

Hay una serie de estudios que muestran que las mutaciones FLT3 constitutivamente fosforilan y activan el dominio tirosin cinasa, y que se requiere esta señalización aberrante para la supervivencia celular independiente de ligando y la proliferación. Si bien esto no es diferente de la señalización el FLT3 nativo, la vía JAK / STAT aparece activada exclusivamente por mutaciones FLT3-ITD donde STAT5 parece ser el objetivo principal. En contraste, los estudios de FLT3-TKD demuestran ninguna o débil activación de STAT5. Otra diferencia entre estas dos mutaciones de FLT3 es que SRC es un mediador de señalización en FLT3-ITD pero no en muestras de FLT3-TKD.

Contrariamente a este estudio, Choudhary *et al.* han demostrado la activación directa de STAT5 por FLT3-ITD sin ninguna participación de JAKs o SRC. La mayoría de los pacientes con LMA con mutaciones FLT3-ITD tienen alta fosforilación de STAT5. Sin embargo, STAT5 también se activa en blastos leucémicos de pacientes no albergan mutaciones FLT3-ITD (Nordigården, 2013).

STAT5 induce sus genes diana, tales como la ciclina D1, c-myc y el gen p21 anti-apoptótico, los cuales son importantes para el crecimiento celular (Hayakawa, 2000 & Bruserud, 2003). Estos efectos pueden indicar un papel de FLT3-ITD en el crecimiento celular aberrante de células leucémicas (Figura 9) (Lyman, 1994 & Gilliland, 2002).

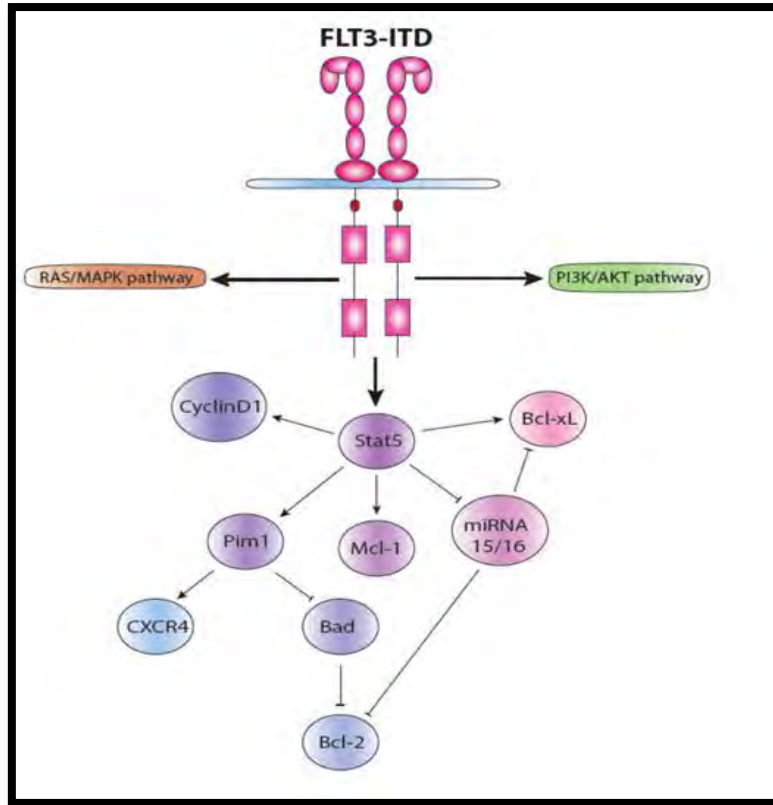


Figura 9. FLT3 señalización oncogénica.

Similar al receptor FLT3 de tipo salvaje tras la activación del ligando, se activan las vías RAS / MAPK y PI3K vías / AKT. Sin embargo, FLT3-ITD también activa la vía STAT5 específicamente, que se cree que es esencial para la proliferación y la supervivencia de células leucémicas. Figura extraída y modificada de Amanda, N. (2013). *The FLT3 tyrosine kinase in leukemia*. Tesis no publicada. Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University. Sweden

4.3.2 FLT3: Duplicación en tándem interno (FLT3/ITD)

Una de las mutación más comunes de FLT3 es la duplicación interna en tándem (FLT3-ITD), la cual resulta por la duplicación de un fragmento dentro de la región de codificación de dominio yuxtamembranal (codificada por los exones 14 y 15) de FLT3 (Nordigården, 2013).

El interés en FLT3 en la leucemogénesis fue generado inicialmente por la demostración de la expresión del receptor en la superficie de células blásticas de la mayoría de los casos de LMA. También se expresa en la LLA y crisis blástica de la LMC.

El papel crucial para FLT3 en la leucemogénesis se hizo evidente cuando un estudio de búsqueda de expresión de FLT3 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (PCR) señaló que un número de muestras tenía transcripciones inesperadamente largos en el dominio yuxtamembrana (JM).

Se demostró posteriormente que estas largas transcripciones se debieron a una región del ADN genómico duplicada dentro del dominio JM, excluyendo empalme aberrante como una explicación para este hallazgo. Las duplicaciones eran siempre dentro del marco y ubicados en el dominio JM, pero variado considerablemente en longitud y ubicación exacta de paciente a paciente.

Las mutaciones son somáticas como se demuestra por la ausencia de la FLT3/ITD en las muestras de remisión de pacientes que fueron FLT3 / ITD positivo en el diagnóstico (Mead, 2009).

La prevalencia de FLT3/ITD es altamente dependiente de la edad, donde es rara en lactantes, y la prevalencia aumenta a un paso de manera prudente a 5-10% de edad de 5–10 años, 20% en adultos jóvenes y 35% o más en pacientes mayores de 55 años (Ozeki, 2004).

Los estudios *in vitro* que la mutación FLT3/ITD promueve la dimerización del receptor independiente del ligando, lo que lleva a la fosforilación autónoma y activación constitutiva del receptor, culminando en la proliferación celular independiente de citosinas (Nakao, 1996 & Yanada, 2005).

El mecanismo específico mediante el cual FLT3/ITD conduce a la auto dimerización aún no se conoce a la perfección, sin embargo, se piensa que el dominio yuxtamembranal actúa como un dominio regulador negativo mediante la prevención de la activación de bucle para adoptar una conformación activa, manteniendo así el receptor en un estado inhibido (Kiyoi, 1998 & Gale, 2007).

Otras características físicas de FLT3/ITD, incluyendo la longitud y la posición de la duplicación en tándem dentro del dominio yuxtamembranal, se han relacionado con la variación clínica y biológica, en una duplicación de un solo codón puede alterar la actividad biológica del gen FLT3. Se ha informado que en los pacientes con DTI de más de 40 nucleótidos tuvieron una remisión completa más baja y peor supervivencia en comparación con aquellos con ITDs más cortos.

Características de la región de la duplicación en FLT3 / ITD reciente ha puesto de relieve varios restos funcionales en el exón 14 del gen FLT3 en aminoácidos específicos (aa) los residuos están involucrados en la activación del receptor. A medida que estos motivos funcionales de FLT3 participan de forma variable en FLT3 / ITD. Todas las duplicaciones involucran el exón 14 del gen FLT3, aunque se ha observado que algunas duplicaciones se han extendido hasta el intrón 14 en el exón 15. La longitud de los ITD varía desde 15 hasta 174 pares de bases (pb) con una mediana de 52 pb. La localización genómica de la duplicación varía de paciente a paciente (Meshinchi, 2008).

4.3.3 Ubicación estructural de Y597

La estructura cristalina de FLT3 auto inhibida ha revelado distintas regiones dentro del dominio JM, el motivo de unión JM (JM-B, Y572-M578), el motivo interruptor JM (JM-S, V579-V592), y la cremallera JM (JM-Z, D593-W60314). Los residuos de aminoácidos que se han observaron en los ITD (Y591-Y597) caen dentro de las regiones JM-S y JM-Z (Figura 10). La tirosina-597 está expuesta en la superficie de la proteína y no parece ser crítico para el mantenimiento de la conformación auto inhibida de FLT3.

El residuo observado más frecuentemente dentro de un ITD es Y597, sin embargo, otros residuos de la región de la cremallera de dominio JM (JM-Z) están también duplicados con frecuencia. Estas duplicaciones están transformando fuertemente y dan lugar a la activación constitutiva de FLT3.

Los mecanismos estructurales de la activación FLT3 por estas duplicaciones aún no se ha dilucidado, sin embargo, la estructura cristalina de FLT3 auto inhibida no arrojar algo de luz sobre los posibles mecanismos de activación. En esta estructura la región JM-Z parece jugar un papel importante en la dirección de una orientación óptima de la autofosforilación de residuos "switch" Y589 y Y591 y mantenimiento de la conformación auto inhibida (Meshinchi, 2008).

La recaída de la leucemia es la causa más importante de muerte en pacientes que reciben quimioterapia intensiva. Sin embargo, el riesgo de recaída difiere entre los pacientes, y los dos más importantes predictores de pronóstico son la respuesta a la inducción de quimioterapia y las anomalías citogenéticas detectados en el momento del diagnóstico.

Detección de mutaciones de FLT3 en el momento del diagnóstico es por lo tanto un factor de riesgo importante para la recaída después. Sin embargo, un estudio clínico previo ha informado de que FLT3 / ITD se puede observar en recaída de LMA incluso para los pacientes sin anomalías en FLT3 en el momento del diagnóstico.

En algunos pacientes con AML el FLT3 / ITD se detectó el momento del diagnóstico, pero no en la recaída, lo que sugiere que ITD clínicamente puede estar asociada con la progresión de la leucemia.

La recaída depende en gran medida de factores que son independientes del tratamiento: la edad al momento del diagnóstico, la velocidad de la respuesta inicial y la carga tumoral son útiles para predecir el riesgo de recaída, pero ante todo de ellos es la presencia y tipo de anomalías citogenéticas en el clon leucémico (Gagy, *et al.* 2006).

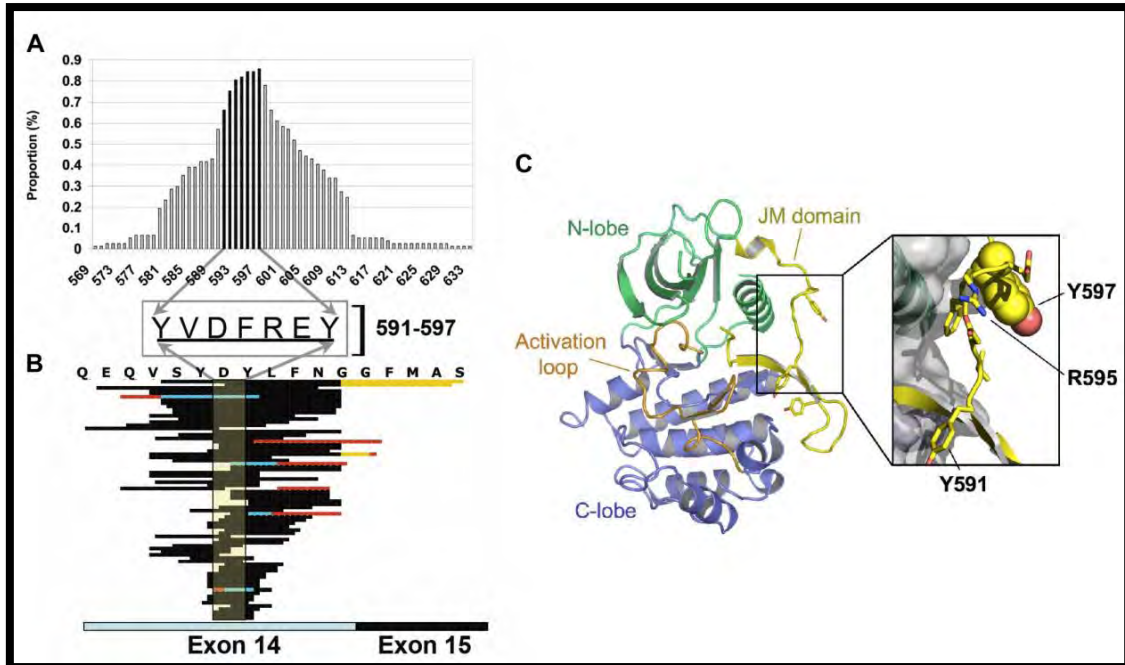


Figura 10. Región de la duplicación en FLT3 / ITD.

(A) Proporción de pacientes con implicación de los residuos de aa específicos en la región duplicada. Los codones 591-597 se muestran en barras oscuras, y los residuos de aa específicos en esta región se muestran en el recuadro central. (B) La región de la duplicación están ordenadas según la longitud ITD (más larga a la más corta) de arriba a abajo. El área de la duplicación del pico principal ITD se muestra en el área resaltada oscura. (C) Estructura de FLT3 que muestra la localización del dominio JM y Y597. El dominio quinasa N-lóbulo es de color verde y el lóbulo C, azul. El bucle de activación es de color naranja y el dominio JM, amarillo. Tirosinas 597, 591 y 589 se muestran en formato de palo. La vista muestra la superficie molecular del dominio quinasa y dominio JM-cadena lateral de los residuos Y591 a Y597. Tirosina 597 se representa con las esferas que llenan el espacio. Figura tomada y modificada de Meshinchi, *et al.* (2008). Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood journal*, 111(10), 4930-4933.

4.3.4 Significado pronóstico de la presencia de múltiples ITD

La longitud de la ITD puede ser importante en el pronóstico de la enfermedad. Es posible que los DTI más largos puedan implicar múltiples dominios funcionales y perturbar de manera más eficaz el reglamento auto inhibitorio de la actividad quinasa.

Es interesante notar que las longitudes de las tres regiones JM (JM-B, JM-S, y JM-Z), son 7, 14, y 11 aminoácidos de longitud; una longitud ITD dominio JM mayor que 14 aminoácidos necesariamente duplica los residuos de más de una de estas regiones, lo que altera más de uno de los requisitos estructurales para auto inhibición.

Por lo tanto, es factible que la interrupción simultánea de más de una de las regiones de dominio JM podría ser la base de la importancia pronóstica de longitud ITD. Se necesitan más estudios para dilucidar las dependencias funcionales de las regiones de dominio JM unas sobre otras (Meshinchi, 2008).

4.4 FLT3 Mutación de dominio tirosin quinasa (FLT3/TKD)

Se han descrito mutaciones en el dominio de bucle de activación de la tirosina quinasa de FLT3 (mutación bucle de activación FLT3, FLT3 / ALM, o mutación del dominio tirosin quinasa FLT3, FLT3 / TKD). La mayoría de la FLT3 / TKD se produce en el codón 835 con un cambio de un ácido aspártico en tirosina (D835Y o Asp835Tyr) (Nordigården, 2013).

Después de la identificación de FLT3/ITD en AML, se observó que blastos de LMA primarias de un número de pacientes tenían FLT3 constitutivamente fosforilada en ausencia de un FLT3/ITD aumentando la posibilidad de otros mecanismos de activación aberrante de FLT3.

Poco después, dos grupos informaron de forma independiente la activación de mutaciones que afectan a los codones D835 e i836 en el segundo dominio tirosin cinasa (TKD) de FLT3 en aproximadamente el 7% de los pacientes con LMA. Estas mutaciones FLT3 / TKD también se producen a una frecuencia inferior en LLA. Un grupo ya había demostrado que la sustitución de aspartato por valina en la posición 838 de la quinasa FLT3 murino (el equivalente a FLT3 humano codón 835) que condujo a la activación constitutiva (Mead, 2009).

Similar a FLT3/ITD, las mutaciones de FLT3 TKD mostraron ser mutaciones somáticas estando ausentes en muestras de remisión. Se cree que las mutaciones de TKD interrumpen aminoácidos clave que estabilizan el bucle de activación en una configuración cerrada, aunque el mecanismo exacto de esta interrupción sigue siendo poco claro.

La activación de bucle es un componente general de la tirosina cinasa y cuando la cinasa está en el estado “inactivo”, funciona para bloquear el acceso de adenosina trifosfato (ATP) y el sustrato para el dominio cinasa (Grundler, 2005).

Después de la activación, que normalmente es después de la unión al ligando, en el caso de los miembros de la familia RTK III, un residuo específico dentro del bloque es típicamente fosforilado, haciendo que el bucle adopte una configuración “activada” que permite el acceso de la cinasa (Meshinchi, 2001).

Aunque FLT3/TKD promueve la autofosforilación del receptor, la activación constitutiva del receptor, y la proliferación independiente de ligando es similar a la de FLT3/ITD (Zhao, 2000 & Minami, 2002).

Existen importantes diferencias biológicas entre los dos tipos de mutaciones de FLT3. FLT3/ITD y FLT3/TKD parece promover la activación de diferentes efectores en las vías descendentes y diferentes respuestas biológicas (Levis, 2001).

La presencia de mutaciones FLT3/TKD en el segundo dominio de tirosin cinasa en LMA se ha confirmado en una serie de otros estudios. La incidencia global en la LMA se ha informado de que aproximadamente el 7%, que oscila entre 5% y 22%, dependiendo de la técnica utilizada y los criterios de inclusión específicos del estudio con respecto a la edad del paciente, citomorfología y cariotipo. Se ha informado de un número de diferentes mutaciones. La mayoría de las mutaciones puntuales son como la sustitución de un residuo aspartato 835 con una tirosina (D835Y, la mutación más frecuente), histidina, valina o glutamato; otras alteraciones incluyen deleciones pequeñas ($\Delta 835$, $\Delta 836$) e inserciones. Todas las mutaciones descritas inicialmente interrumpieron un sitio de corte de la enzima de restricción EcoRV que facilitó una técnica de búsqueda simple usando la digestión de productos de PCR (Mead, 2009). En la figura 11 se muestran los resultados del estudio realizado por Bianchini y colaboradores (2003); donde utilizaron la técnica de PCR para realizar la búsqueda de las mutaciones en FLT3.

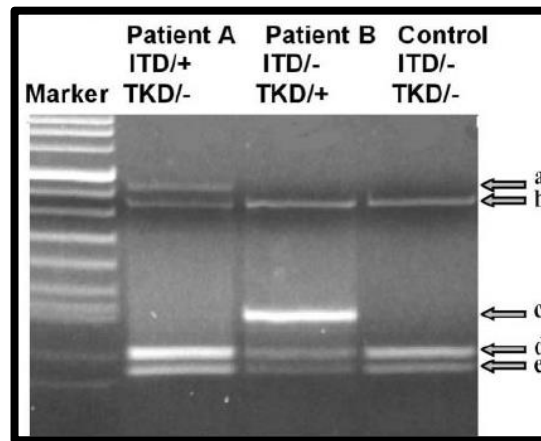


Figura 11. Productos de PCR multiplex de dos pacientes con LMA y un control negativo electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

El paciente A muestra una banda más grande aberrante de 447 pb (banda a) correspondiente a un paciente positivo para la mutación ITD, mientras que la degradación completa (bandas D y E) de su producto 114-bp (banda c) indica la ausencia de mutación TKD. Paciente B proporciona un ejemplo de la situación opuesta; positivo para mutaciones TKD debido a la presencia de producto de PCR no digerido de 114 pb (banda c) y negativo para las mutaciones ITD debido a la ausencia de cualquier producto de PCR más grande detectable (ausencia de la banda a). Bianchini M, Ottaviani E, Grafone T, Giannini B, Soverini S. (2003). Rapid detection of FLT3 mutations in acute myeloid leukemia patients by denaturing HPLC. *Clinical Chemistry*, 49(10), 1642–1650.

Sustituciones de nucleótidos, deleciones, o inserciones que implican los residuos D835 / i836 del segundo dominio tirosina quinasa. La sustitución D835Y constituye aproximadamente el 50% de las mutaciones de FLT3-TKD. Mutaciones FLT3-TKD menos frecuentes que implican otros residuos de aminoácidos incluyen la Y842C, 3 K663Q, 4 y V592A5 y los que se producen en el dominio yuxtamembrana (Whitman, 2008).

5. JUSTIFICACION

Los estudios llevados a cabo durante estos últimos años apoyan un papel importante de FLT3 como una mutación que juega un papel relevante en el desarrollo de leucemias agudas, en la gran mayoría de los casos asociados a un índice de pronóstico negativo.

El estudio actual pretende realizar la detección de las mutaciones en FLT3 a todos los pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide y leucemia linfoide, pues un 41% de pacientes puede llegar a presentar mutación FLT3 y en ellos se puede establecer un tratamiento personalizado; con esto se pretende mejorar el pronóstico de los pacientes a futuro e identificar estas mutaciones para monitorear la enfermedad mínima residual.

La evidencia generada en nuestro estudio aportara información epidemiológica en el conocimiento de las leucemias ya que la investigación de las mutaciones en FLT3 en pacientes pediátricos no ha sido explorada ampliamente sin embargo, las mutaciones de FLT3 se han relacionado con mal pronóstico en la población pediátrica con leucemias agudas y han adquirido un papel importante en las decisiones de tratamiento dirigido y personalizado apoyados del diagnóstico molecular y citogenética específica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Realizar la detección de las mutaciones en FLT3 a todos los pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, diagnosticados de primera vez con leucemia mieloide aguda (LMA) y con leucemia linfoide aguda (LLA) y determinar la frecuencia de mutaciones en el Gen FLT3 en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia mieloide aguda y linfoide aguda a través de RT-PCR para conocer la incidencia en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

6.1 Objetivos particulares

- 1) Realizar la búsqueda de información relacionada con mutaciones en el Gen FLT3 en las leucemias agudas.
- 2) Realizar la búsqueda de mutaciones en el gen FLT3 por medio de RT-PCR.
- 3) Determinar la frecuencia de mutaciones en tándem internas del gen FLT3 (FLT3-ITD) y mutaciones puntuales en el dominio tirosin quinasa (FLT3-TKD).
- 4) Realizar el análisis estadístico de los resultados para establecer la frecuencia de mutaciones en el Gen FLT3 en pacientes pediátricos.
- 5) Relacionar la frecuencia de mutaciones FLT3 con los resultados citogenéticos obtenidos por el protocolo Hemavision y determinar el pronóstico de los pacientes.

7. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, comparativo. La población de estudio fueron pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez, diagnosticados de primera vez con leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica aguda (LLA), que no han recibido tratamiento.

Se realizó un muestreo consecutivo de pacientes con LMA, el número aproximado es de 15 pacientes que llega al año al Hospital Infantil de México Federico Gómez. Esta información servirá, en un futuro, para realizar un cálculo para entrontrar la relación entre las alteraciones genéticas y la evolución clínica, basados en las frecuencias encontradas en este estudio.

7.1 Criterios de selección

7.1.1 Criterios de inclusión:

- * Pacientes que acuden al Hospital infantil de México con reciente diagnóstico de leucemia mieloide y leucemia linfocítica.
- * Pacientes que no han recibido algún tipo de tratamiento.
- * Pacientes que acuden en el periodo de Septiembre del 2013 a Septiembre 2015
- * Sexo: indistinto.
- * Edad: menores a 18 años.

7.1.2 Criterios de exclusión:

- * Pacientes que han recibido tratamiento médico contra LMA.
- * Pacientes que acuden fuera del periodo de período de Septiembre del 2013 a Septiembre 2015
- * Pacientes que no cuenten con expediente clínico en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- * Muestras de pacientes en las que se obtenga un rendimiento de ARN menor a 0.1 µg/µl
- * Muestras de pacientes en las que no se obtenga la banda de control de integridad del ARN y de la presencia de inhibidores de la PCR.

7.2 Extracción de RNA: Kit QIAamp® RNA Blood Mini kit (QIAGEN, 1999)

Se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea del servicio de hematología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoides aguda (LLA). Se tomaron 300 µl de la muestra (medula ósea) y se agregan 1500 µl de buffer EL en un tubo de tamaño apropiado. Incubando de 10 a 15 minutos en hielo mezclamos en vortéx cada 5 min durante la incubación.

Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, al terminar descartamos el sobrenadante y agregamos 600 µl de Buffer EL para resuspender la pastilla. Seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C al terminar descartamos el sobrenadante. Enseguida agregamos 600 µl de Buffer RLT y se mezcla en vortéx. Trasvasamos a una columna QIAshredder (morada) puesto sobre un tubo colector y centrifugamos a máxima velocidad, enseguida descartamos la columna QIAshredder. En el tubo colector agregamos 600 µl de etanol al 70% y se mezcla por pipeteo. El volumen se colocó en una columna QIAamp (blanca) puesta sobre un nuevo tubo colector y se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm, en seguida descartamos el volumen del tubo colector.

Se agregaron 700 µl de buffer RW1 en la columna QIAamp y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm, para descartar el volumen del tubo colector. Agregamos 500 µl de buffer RPE en la columna QIAamp y repetimos el paso previo. Centrifugamos 15 segundos a 10,000 rpm y se descartó el volumen del tubo colector; se agregó 500 µl de buffer RPE en la columna QIAamp y se puso a centrifugar 3 minutos 14,000 rpm, se descartó el volumen del tubo colector. Se transfirió el volumen a la columna QIAamp a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 53 µl de agua libre de RNAasas y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm. Se tomaron 3 µl del tubo eppendorf para obtener lectura de concentración en nanodrop.

7.3 Síntesis de cDNA: kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (ROCHE, 2010)

En un tubo eppendorf de 1.5 ml agregamos 10 µl de RNA (muestra), 1 µl de iniciador Anchore-oligo (dT) (vial 5), 2 µl iniciador Random Hexamer (vial 6). Se colocó el tubo eppendorf a 10 minutos a 65 °C en un termobloc, para lograr desnaturalizar la mezcla RNA plantilla-iniciadores, evitar al máximo la evaporación.

Se enfrió inmediatamente en un termobloc frío, agregamos los siguientes componentes de la mezcla RT en el orden como se muestra en el cuadro 5, mezclamos los componentes por medio de pipeteo y se coloca en microcentrífuga por unos segundos para tener el volumen total en el fondo, se colocó el tubo bien tapado en el termobloc durante 10 minutos a 65 °C, seguido de 60 minutos a 50 °C, para terminar se inactivó la transcriptasa por calentamiento a 85 °C durante 5 minutos y paramos la reacción colocando el tubo en un termobloc frío

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la síntesis de DNA

Reactivo	Volumen (µl)
Amplificador de reacción de la transcriptasa reversa. Conc.5x (vial 2)	4.0
Protector inhibidor de RNAsa, 40 U/µl (vial 3)	0.5
Mezcla de desoxinucleotidos, 10mM (vial 4)	2.0
Transcriptasa reversa, 20 U/µl (vial 1)	0.5
Volumen final	20.0

7.4 PCR

Se realizaron las mezclas de reacción considerando cada par de primers por separado como se indica en el Cuadro 6.

Para cada reacción en 2 tubos eppendorf de 0.5 ml se agregaron 20 µl de cada mezcla de reacción respectivamente, así mismo se colocó 5µl de cDNA (muestra) a cada tubo y se colocaron en termocilcador para iniciar la reacción de PCR comenzando con un precalentamiento inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR 1x

Reactivo	Mezcla F (µl)	Mezcla R (µl)
H ₂ O grado PCR	12.5	12.5
Fast Start	2.5	2.5
MgCl ₂	3.0	3.0
17F	1.0	-----
17R	1.0	-----
R5	-----	1.0
R6	-----	1.0
Vol. Total	20.0	20.0

7.5 DIGESTION

Para cada reacción realizamos una mezcla como se indica en el cuadro 7.

Cuadro 7. Mezcla de reacción para digestión con Eco RV

Reactivo	Volumen (µl)
H ₂ O grado PCR	18.0
Buffer 10x	1.0
Eco RV	1.0
Mezcla de PCR	10.0

La mezcla se mantiene a 37°C durante 12 horas. Después de haber realizado la digestión se elaboró una electroforesis por 60 minutos en un gel de agarosa al 3.5%. Revisar el anexo A donde se muestra la metodología paso a paso y un diagrama simplificado.

8. ANALISIS DE RESULTADOS

Las mutaciones de FLT3 se encuentran en casos nuevos de pacientes con síndromes mielodisplásicos. Debido a que los pacientes con síndromes mielodisplásicos sin mutaciones del FLT3 a veces se diagnostican cuando ya han progresado a leucemia mieloblástica aguda, así mismo se ha encontrado caso de mutaciones en FLT3 en casos con leucemia linfoblástica; en dichos pacientes se podría utilizar la detección de la mutación de FLT3 como indicador temprano de riesgo de leucemogénesis.

En este estudio experimental se analizaron 136 pacientes (n=136); en los cuales se obtuvieron 35 pacientes con diagnóstico de LMA (25.73%), 42 pacientes con diagnóstico de LLA (30.88%), 33 pacientes diagnosticados con síndrome infiltrativo (24.26%) y 26 pacientes con otro tipo de diagnóstico (19.11%) como leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica crónica (LMC) y síndrome linfoproliferativo.

Se analizó la presencia de mutaciones en el receptor FLT3 por medio de RT-PCR multiplex ocupando los cebadores R5, R6, 17F, 17R.

R5: 5'-TgTCgAgCAgTACTCTAAACA-3

R6: 5'-ATCCTAgTACCTTCCCAAACCTC-3

17F: 5'-CCgCCAggAACgTgCTTg-3'

17R: 5'-gCAgCCTCACATTgCCCC-3'

Con los productos de la reacción de PCR se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 3% durante 60 min.

En la figura 12 se muestran los pacientes A, B, C, D donde no se realizó digestión con enzima Eco RV, esta es una enzima de restricción (Eco321), reconoce los sitios GATATC y corta mejor a 37 °C.

En la letra E se observa un paciente positivo para la mutación FLT3 TKD donde obtenemos una banda de 68 pb, otra de 46 pb y la línea positiva de 114 pb, FLT3-TKD se identifica fácilmente debido a que resulta de la pérdida de un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRV, de esta manera evitamos la digestión .

La pérdida del sitio de reconocimiento de nuestra enzima de restricción provoca la nula digestión de nuestro producto de PCR por amplificación de esta región mediante un análisis tipo RFLP, el resultado de nuestra mutación puntual se puede confirmar mediante secuenciación de ADN (Lagunas, 2015).

Así mismo observamos una línea de 366 pb en la parte superior del gel correspondiente a FLT3 WT, zona amplificada para observar mutaciones FLT3 ITD, en esta caso podemos describir pacientes negativo para dicha mutación.

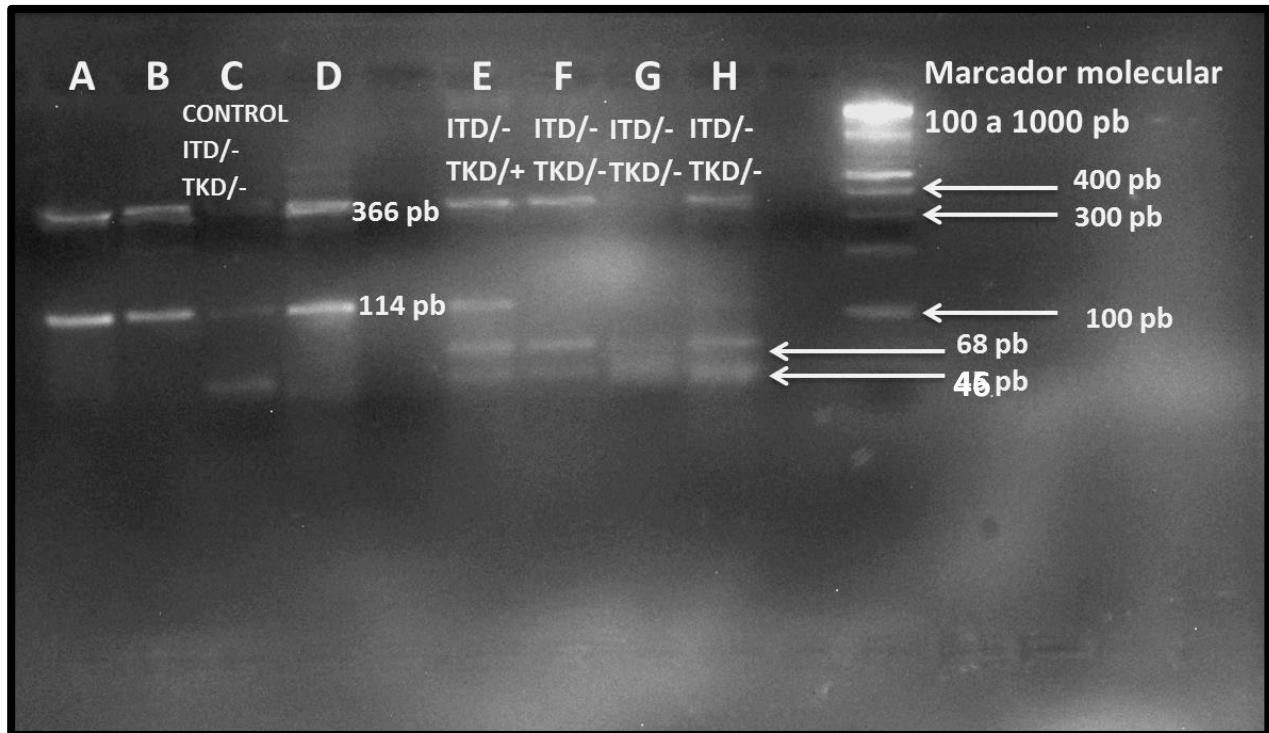


Figura 12. Digestion de los amplificados del dominio Tirosin Cinasa (TKD).

Se muestra el producto de la digestión en gel de agarosa al 3%, donde observamos el marcador molecular que va de 100 pb a 1000 pb, resaltando las bandas de 400pb, 300pb y 100 pb; las letras A, B, C, D contienen el control negativo (muestras sin digestión), en la letra E se observa una muestra para la mutación FLT3-TKD (TKD/+) representada por la banda de 114 pb, así mismo se observan las bandas de 68 pb y 46 pb producto de la digestión de la banda de 114 pb. En las letras F, G, H son muestras digeridas negativas para ambas mutaciones FLT3-ITD (ITD/-) Y FLT3-TKD (TKD/-).

En caso contrario en la figura 13 resaltamos a los pacientes D y J donde observamos una banda superior a la de 366 pb indicando un paciente positivo para mutación FLT3 ITD. Nuestra mutación FLT3-ITD se observa cuando un fragmento de la secuencia que codifica el dominio yuxtamembrana se duplica y se inserta generando un sitio de corte para nuestra enzima Eco RV. La longitud del ITD varía de 3 a 400 pb, siendo siempre un múltiplo de tres nucleótidos (Lagunas, 2015).

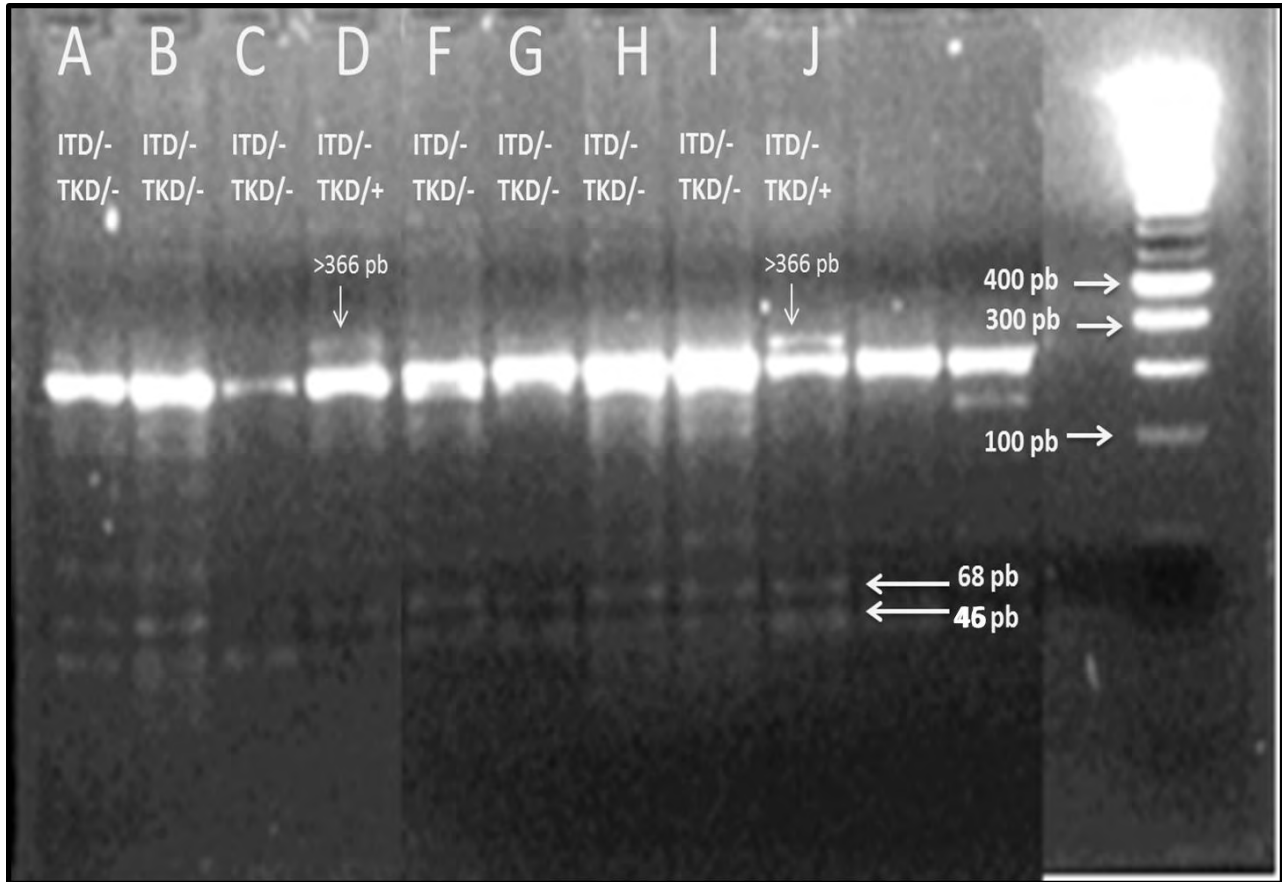


Figura 13. Digestion de los amplificados del dominio yuxtamembrana para identificación de la mutación FLT-ITD. Se muestra el producto de la digestión en gel de agarosa al 3%, donde observamos el marcador molecular que va de 100 pb a 1000 pb, resaltando las bandas de 400pb, 300pb y 100 pb; las letras D y J contienen muestras positivas para la mutación FLT-ITD resaltando una banda mayor a la de 366 pb, en las demás letras se observa muestras negativas representadas por las bandas de 68 pb y 46 pb producto de la digestión de la banda de 114 pb FLT3-TKD (TKD/-) y la banda de 366 pb para la secuencia del dominio yuxtamembrana. FLT3-ITD (ITD/-).

En la figura 14 se muestra la forma en que los cebadores se posicionan en las muestras de extracción de DNA, logrando una amplificación de la secuencia requerida para el análisis de RFLP.

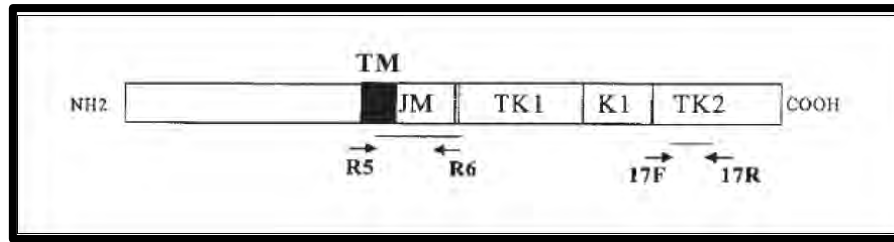


Figura 14. Representación esquemática del gen FLT3 (13q12) y de la localización de los primers utilizados en la reacción de amplificación. Estructura del cDNA de FLT3 y posición de los primers para la RT-PCR Multiplex. Los cebadores R5 Y R6 flanquean parte del dominio transmembranal y parte del dominio juxtamembrana; así mismo, los cebadores 17F Y 17R flanquean parte del dominio TKD. TM: dominio transmembrana. JM: dominio juxtamembrana. TK 1 y 2: dominio tirosina quinasa (TKD). K1: dominio de inserción quinasa (Gaich PB, 2011).

Como se observa en la figura 14, los primers 17F y 17R flanquean el dominio TKD, ubicado en el exón 20, que generan sustitución de Acido aspártico 835 (D835) por residuos Tirosina (Y) e Histidina (H) principalmente, es decir, en la zona donde encontramos la mutación FLT3 TKD encontramos un punto de corte para la enzima EcoRV como se observa en la figura 15; si la mutación está presente este punto de corte no existe, apareciendo una banda de 114 pb en el gel de agarosa al 3%.

17F, 17R

Longitud del producto: 114

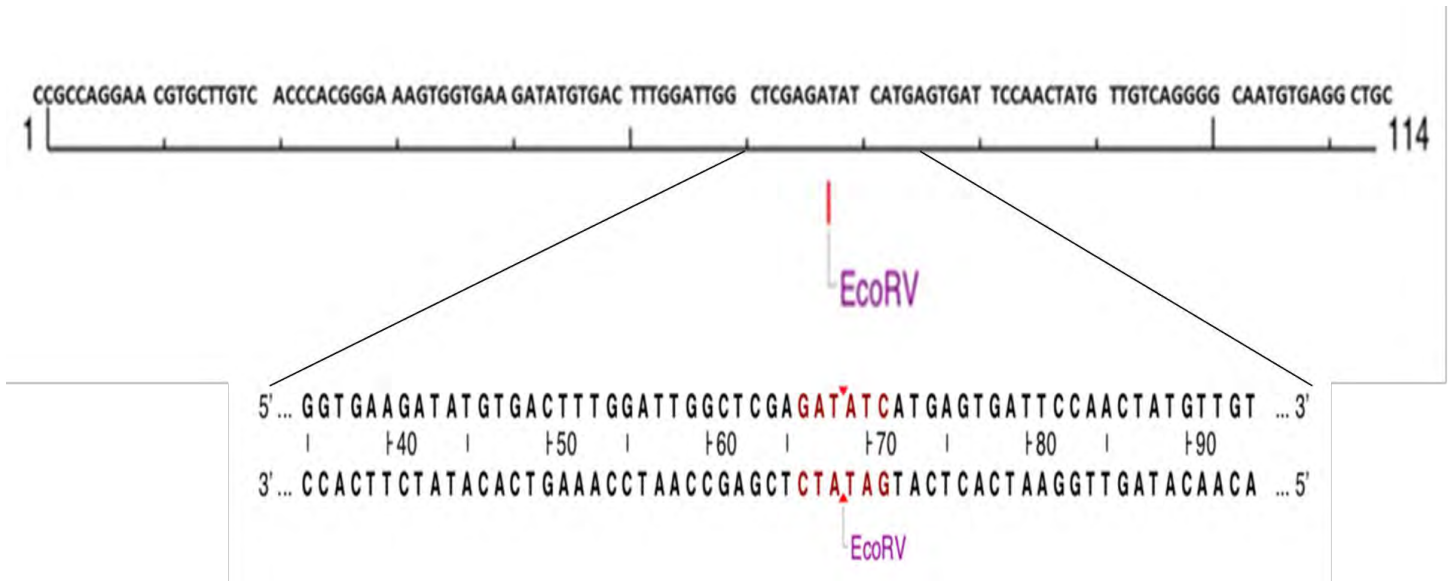


Figura 15. Representación esquemática del sitio de corte de EcoRV en la secuencia del Dominio Tirosin Kinasa. Se representa el sitio de corte en la secuencia del Dominio Tirosin Kinasa para la enzima EcoRV dividiendo la secuencia de 114 pb en una banda de 68 pb y otra de 46 pb; este sitio desaparece al existir mutación puntual de FLT3 (FLT3-TKD).

Los primers R5 y R6 flanquean el dominio transmembrana (TM) y el dominio juxtamembrana (JM), donde encontramos las mutaciones FLT3/ITD que consisten en secuencias duplicadas en tándem, que comprenden de 3 a >400pb, a veces con inserción de nucleótidos adicionales (de 3 a 36pb) en el dominio JM del receptor (exones 14-15) y afectan principalmente los residuos Tirosina Y589, Y591, Y597, Y599 y en menor medida los residuos Acido Aspártico (D593) o Lisina (K602). Cuando se observa un positivo para esta mutación se observa una banda de 366 pb y una banda de mayor peso molecular (>366 pb); la banda mayor a 366 pb es provocada por la aparición de un sitio de corte para la enzima Eco RV debido a las secuencias duplicadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	FLT3 TKD	FLT3 ITD	FLT3 Neg
LMA	14	0	21
LLA	17	2	23
Síndrome infiltrativo	16	1	16
Otro diagnóstico	6	0	19

En total se obtuvo un mayor número de pacientes positivos para mutación FLT3 TKD = 53; para la mutación FLT3 ITD solo se obtuvieron 3 casos positivos de los cuales 2 se presentaron en pacientes con diagnóstico de LLA y ningún caso para pacientes diagnosticados con LMA.

La incidencia de la mutación FLT3-ITD se correlaciona con la edad de los pacientes con leucemia mieloide aguda; en pacientes pediátricos menores de 10 años ocurre en 5 a 16% de los casos, con aumento significativo en pacientes mayores de 10 años. En pacientes adultos se reporta una incidencia de 25 a 35%, sin incremento con la edad. El efecto más significativo de esta mutación es su asociación con altas cuentas blásticas, incremento del riesgo de recaída y disminución de la supervivencia. La mutación FLT3-TKD se ha encontrado en células malignas de pacientes con leucemia mieloide crónica (1%), leucemia linfoblástica aguda (1-3%), síndromes mielodisplásicos (2-5%) y leucemia mieloide aguda (5-10%) (Lagunas, 2015).

Como se observa en la Grafica 1, la incidencia obtenida en la experimentación para mutaciones en FLT3 ITD en pacientes con diagnóstico de LMA es del 0%, sin embargo, para pacientes con diagnóstico de LLA es del 4. 76%. Como se menciona con anterioridad esta mutación se relaciona con la edad. Las muestras de médula ósea que se trabajaron en la experimentación son pacientes cuya edad va desde los 3 meses hasta los 15 años de edad,

con un mayor número de pacientes con edades menores a los 10 años. Por esta razón la incidencia para mutaciones en FLT3 es casi nula en pacientes pediátricos. Sin embargo para mutaciones en FLT3 TKD la incidencia es mayor mostrando un 40% para pacientes con diagnóstico de LMA y un 40.47% para pacientes con diagnóstico de LLA como se muestra en la figura 16.

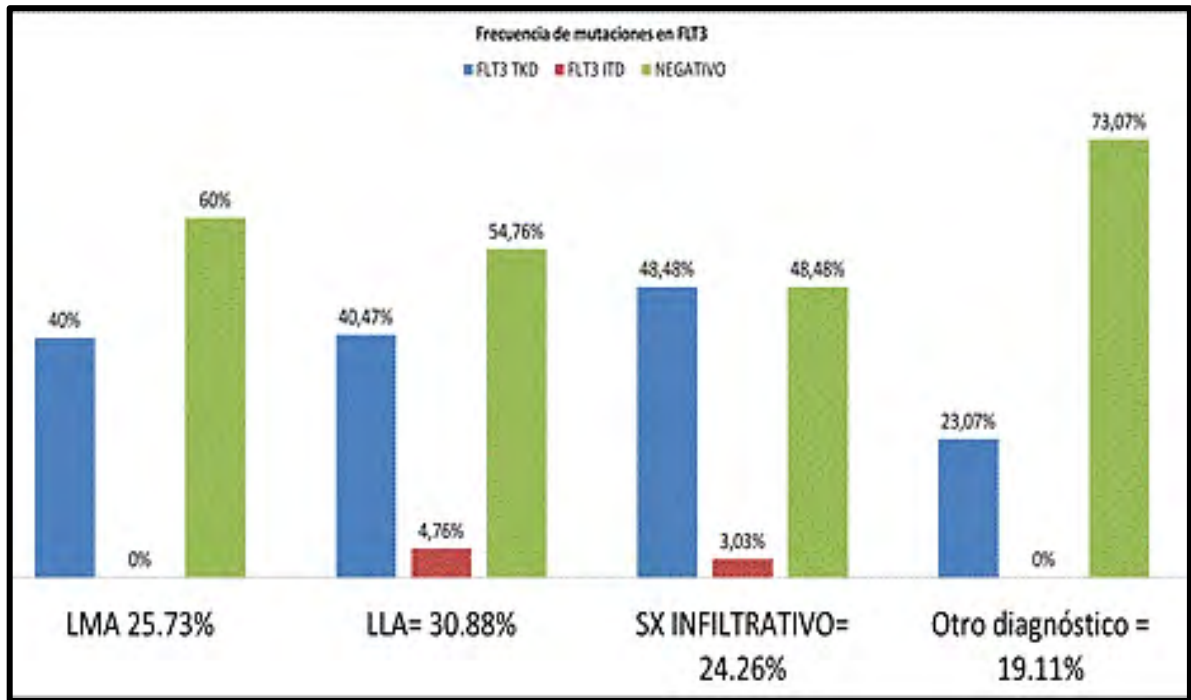


Figura 16. Frecuencia de mutaciones en FLT3.

La citogenética clásica y molecular se ha utilizado tradicionalmente para la identificación de algunas alteraciones genéticas asociadas con leucemia mieloide aguda (traslocaciones, eliminaciones, inversiones, etc.), lo que ha permitido estratificar a los pacientes con este padecimiento en tres categorías de riesgo: favorable, intermedio y desfavorable.

Así, los pacientes con t (8; 21) (q22; q22) [RUNX1/RUNX1T1], inv(16)(p13q22) [CBFB/MYH11] y t(15;17)(q24;q21) [PML/RARA] tienen un pronóstico favorable con buena respuesta al tratamiento y remisiones completas.

Por otra parte, los pacientes con t(9;11)(p22;q23) [MLLT3/MLL] se consideran con pronóstico intermedio, y en los pacientes con t(6;9)(p23;q34) [DEK/NUP214], inv(3)(q21q26) [RPN1/EVI1] y t(1;22)(p13;q13) [RBM15/MKL1] el pronóstico clínico es malo debido a la agresividad del padecimiento y la baja respuesta al tratamiento.

Sin embargo, un grupo importante de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda tienen un cariotipo normal; esto es, sin alteraciones cromosómicas evidentes. Estos pacientes se clasifican con pronóstico intermedio, debido a que clínicamente no se tiene un marcador de referencia y su origen biológico aún es desconocido.

Recientemente, con el desarrollo de metodologías de secuenciación masiva, se han identificado nuevas mutaciones genéticas asociadas con la LMA. Algunos de los genes identificados incluyen a: c-KIT, FLT3, MLL, NPM1, C/EBP α , RAS, RUNX1, WT1, BAALC, ERG, MN1, DNMT, TET2, IDH, ASXL1, PTPN11 y CBL. De todos ellos destacan los que afectan a los genes FLT3, NPM1 y CEBP α , porque se han asociado con la respuesta al tratamiento y el progreso de esta enfermedad (Lagunas, 2015).

A pesar del desarrollo creciente de diversos fármacos dirigidos a blancos moleculares específicos, la leucemia mieloblástica aguda sigue teniendo una tasa de morbilidad y mortalidad alta relacionada con la toxicidad farmacológica y con las recaídas tempranas. Los diferentes índices pronósticos en leucemia mieloblástica aguda, que incluyen edad y los hallazgos de citogenética, entre otros, ayudan a identificar a los pacientes con riesgo elevado de recaída o de enfermedad resistente.

Por esta razón los resultados fueron relacionados con el diagnóstico citogenético, analizado por medio de la técnica Hemavision, para vislumbrar un poco el pronóstico que tiene el paciente al ser portador de diversas aberraciones genéticas mostradas en la Figura 17.

FLT3-ITD se han correlacionado con ciertos subgrupos citogenéticos; son especialmente frecuentes en pacientes con un cariotipo normal. Se ha reportado que 30 a 50% de los pacientes con leucemia aguda promielocítica con t(15;17) (q22;q12) [PML-RARA] también tienen alguna mutación en FLT3. Asimismo, se ha reportado una asociación frecuente con la t(6;9)(p23;q34) [DEK-NUP214] (~90%).

Otras mutaciones asociadas con FLT3-ITD ocurren en NPM1 y DNMT3a. Estudios retrospectivos sugieren que la existencia de mutaciones en NPM1 pueden disminuir el pronóstico negativo de FLT3-ITD, sólo si la relación alélica de este último es baja (Lagunas, 2015).

Desafortunadamente en nuestra experimentación los pacientes con diagnóstico de FLT3 ITD no se pudieron relacionar citogenéticamente debido a que dos de ellos tienen un cariotipo normal entrando en el rubro de pacientes con pronóstico intermedio.

Para las mutaciones FLT3 TKD encontramos una alta relación con diagnóstico citogenético de t(1;19); obteniendo un valor de 11.32% de los pacientes con TKD también contienen esta translocación.

Además se encontró relación con las traslocaciones t (12; 21), t (15; 17), t (9; 22) e INV16. Esta relación puede llevarnos a vislumbrar el pronóstico de remisión del paciente dependiente de la relación de la mutación FLT3 TKD con alguna otra alteración genética; ya que FLT3 TKD tiene un pronóstico favorable mientras su citogenética es anormal.

Así mismo se puede lograr un mejor tratamiento al encontrar este tipo de relación entre diversas anomalías genéticas.

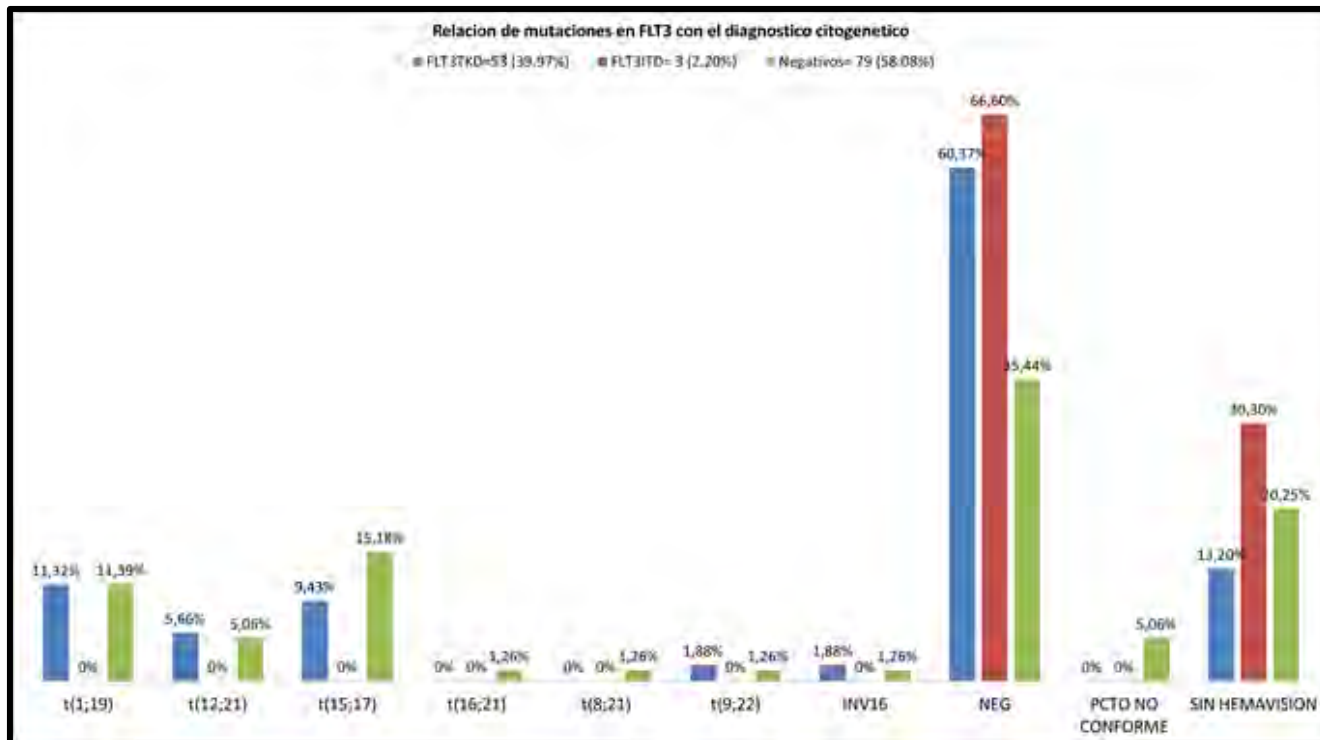


Figura 17. Relación de mutación en FLT3 con el diagnóstico citogenético.

9. CONCLUSIONES

Se determinó la frecuencia de mutaciones del receptor FLT3 en pacientes pediátricos del servicio de hematología del Hospital infantil Federico Gómez por medio de RT-PCR; donde concluimos que la mutación FLT3-ITD en pacientes con diagnóstico de LMA es del 0%, sin embargo, para pacientes con diagnóstico de LLA es del 4.76%. Así mismo en FLT3 TKD la incidencia es mayor mostrando un 40% para pacientes con diagnóstico de LMA y un 40.47% para pacientes con diagnóstico de LLA.

La relación entre nuestra citogenética realizada con el protocolo de Hemavision con la mutaciones en FLT3 no pudo realizarse en el caso de la mutación FLT3-ITD debido a la escasa incidencia de esta; Sin embargo se debe poner atención en la presencia de mutación FLT3-ITD, la extensión de esta mutación y la relación con alguna alteración genética debido al mal pronóstico que presentan los pacientes con dicha mutación de FLT3.

En el caso de la mutación FLT3-TKD está altamente relacionada con la translocación t (1; 19). Además se encontró relación con las translocaciones t (12; 21), t (15; 17), t (9; 22) e INV16. De esta manera podemos concluir que los pacientes que presentan relación entre mutación FLT3-TKD y alguna otra alteración genética es favorable y con escasa incidencia en nuestra población pediátrica.

El receptor FLT3 se ha vuelto un blanco molecular atractivo para el desarrollo de tratamientos que inhiban su módulo de cinasa. Se han desarrollado inhibidores de tirosina cinasa (ITK) de molécula pequeña. Entre los inhibidores de FLT3 están CEP701 (lestaurtinib), PKC412 (midostaurin), MLN 518 (tandutinib) y SU11248 (sunitinib). Todos tienen actividad nanomolar (nM) y han mostrado destruir las líneas de células leucémicas y muestras de leucemia mieloblástica aguda primaria que expresan mutaciones del FLT3. Otra forma de atacar al FLT3 específicamente es con anticuerpos anti-FLT3. Se han creado fagos humanos que tienen anticuerpos seleccionados para unirse a FLT3 humano y con la capacidad de bloquear la unión del FL con el FLT3.

10. REFERENCIAS

- Barrera, R., Drago, S., Pérez, R., Gómez, A., Sainz, E., Mendoza, P. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria*, 17(1).
- Benasayag, J., Gallino, I. (2010). Bases citogenéticas para la práctica hematológica De lo supuesto a lo expuesto en nomenclatura citogenética. *Hematología*, 14(2).
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., *et al.* (1976). Proposal for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. *British Journal haematology*, 33(4), 451-458.
- Bianchini, M., Ottaviani, E., Grafone, T., Giannini, B., Soverini, S. (2003). Rapid detection of FLT3 mutations in acute myeloid leukemia patients by denaturing HPLC. *Clinical Chemistry*, 49(10), 1642–1650
- Brasel, K., Escobar, S., Anderberg, R., de Vries, P., Gruss, H. J., Lyman, S. D. (1995). Expression of the FLT3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*, 9 (7), 1212-8.
- Braun, S. E., Aronica, S. M., *et al.* (1997). Retroviral mediated gene transfer of FLT3 ligand enhances proliferation and MAP kinase activity of AML5 cells. *Experimental Hematology*, 25(1), 51-56.
- Bruserud, O., Hovland, R., Wergeland, L., Huang, T. S., Gjertsen, B. T. (2003). Flt3-mediated signaling in human acute myelogenous leukemia (AML) blasts: a functional characterization of Flt3-ligand effects in AML cell populations with and without genetic Flt3 abnormalities. *Haematology*, 88(4), 416-28.
- Calvo, A. G. (2013). Evaluación del uso de microarreglos genómicos como herramienta de apoyo para determinar el pronóstico en pacientes con LMA. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, México.
- Cano, A., Rodríguez, M., Campos, S., Nizza, J., Noruega, J. (2011). Leucemia mieloide aguda con t (8; 21)(q22; q22). Reporte de casos. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 9(2), 64-71
- Dosil, M., Wang, S., Lemischka, I. R. (1993). Mitogenic signaling and substrate specificity of the flk2/flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Molecular and cellular biology*, 13(10), 6572-85.
- Drexler, H. G., Meyer, C., Quentmeier, H. (1997). Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leukemya and lymphoma*, 33(1-2), 83-91.
- Drexler, H. G. (1996). Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, 10(4), 588-599.
- Elyamany, G., Awad, M., Alsuhaibani, O., *et al.* (2014) FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia and its Clinical Significance. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1).

- Fernández, H. F., Sun, Z., Yao, X., et al. (2009). Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 361(13), 1249-1259.
- Gaich, P. B., Sastre, D. A., Rodríguez, C. M. (2011). Prevalencia de mutaciones flt3 en leucemias mieloblásticas agudas. Laboratorio de Oncohematología, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Gale, R. E., Green, C., Allen, C., et al. (2007). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size and interaction with NPM1 mutation in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood journal*, 111(5), 2776-84.
- Gilliland, D. G., Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood journal*, 100(5), 152 -42.
- González, S., Olarte, C., Gutiérrez, R., Montaña, F., Martínez, M. (2012). Frecuencia de leucemias agudas. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 50(2), 167-171.
- Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C., Duyster, J. (2005). FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutant induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood journal*, 105(12), 4792-9.
- Gupta, V., Tallman, M. S., Weisdorf, D. J. (2011). Allogenic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood journal*, 117(8), 2307-2318.
- Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H., Naoe, T. (2000). Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*, 19(5), 624-31.
- Hubbard, S. R. (2001). Theme and variations: juxtamembrane regulation of receptor protein kinase. *Molecular cell*, 8(3), 481-2.
- Hurtado, M. R., Solano, E. B., Vargas, V. P. (2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 55(2), 11-25.
- Juan, T. S., McNiece, I. K., Van, G., et al. (1997). Chronic expression of murine flt3 ligand in mice result in increased circulating white blood cell levels and abnormal cellular infiltrates associated with splenic fibrosis. *Blood journal*, 90(1), 76-84.
- Karabacak, B. H., Erbey, F., Bayram, I., Yilmaz, S. (2010). Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Mutations in Childhood Acute Leukemias and their Association with Prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11, 923-927.
- Kayser, S., Dohner, K., Krauter, J., et al. (2010). Impact of allogenic transplantation from with FLT3 internal tandem duplication. *Blood journal*, 116(21), 217-45.
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., Naoe, T. (1998). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12(9), 1333-7.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., et al. (2001). The presence of FLT3 internal tandem duplication in patient with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostics information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of

chemotherapy: analysis of 854 patients from United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood journal*, 98(6), 1752-1759.

- Lagunas, R., Perez, C., Cortes, P. (2015). FLT3, NPM1 y C/EBP α como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol Mex*, 16(2), 152-167
- Lagunas, R. (2016). Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta mexicana de oncología*, 15(3), 150-157.
- Levis, M., Allebach, J., Fai-Tse, K., et al. (2001). FLT3-targeted inhibitors kill FLT3-dependent modeled cells, leukemia-derived cell lines, and primary AML blasts in vitro and in vivo. *Blood*, 89(721).
- Lisovsky, M., Braun, S. E., Ge, Y., et al. (1996). FLT3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*, 10(6), 1012-1018
- Lopez, S. (2016). La biometria hematica, *Acta Pediatr Mex*, 37(4), 246-249.
- Lyman, S. D., Brasel, K., Rousseau, A. M., Williams, D. E. (1994). The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem cell*, 12(99).
- Lyman, S. D., Jacobsen, S. E. (2000). C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood journal*, 91(4), 1101-1134
- Lyman, S. D., James, L., Johnson, L., et al. (1994). Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood journal*, 83(10), 2795-2801.
- Lyman, S. D., James, L., Zappone, J., Sleath, P. R., Beckmann, M. P., Bird, T. (1993). Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene*, 8(4), 815-822.
- Mackaretschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Inmunity*, 3(1), 147-161.
- Mead, J. A. (2009). The clinical and biological consequences of different flt3 mutations in patients with MLA. University College London.
- Meshinchi, S., Alonzo, T. A., Gerbing, R., Lang, B., Radich, J. (2003). FLT3 internal tandem duplication (FLT3/ITD) is a prognostic factor for poor outcome in pediatric AML: a CCG2961 study. *Blood journal*, 102(35).
- Meshinchi, S., Stirewalt, D. L., Alonzo, T. A. (2008). Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood journal*, 111(10), 4930-4933p.
- Meshinchi, S., Woods, W. G, Stirewalt, D. L, Sweetser, D. A. (2001). Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood journal*, 97(1), 89-94.
- Meshinchi, S., Appelbaum, F. R. (2009). Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research*, 15(13), 4263-4269.

- Minami, Y., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, K., Ueda, R., Saito, H., Naoe, T. (2002). Selective apoptosis of tandemly duplicated FLT3-transformed leukemia cells by Hsp90 inhibitors. *Leukemia*, 16(8), 1535-40.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., et al. (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(12), 1991-18.
- Naoe, T., Kiyoi, H. (2013). Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *International journal hematology*, (97), 165–174p.
- Nordigården, A. (2013). The FLT3 tyrosine kinase in leukemia, deciphering the downstream signaling events and drug-escape mechanisms. Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University. Sweden
- Ortega, S. M, Osnaya, O. L, Rosas, B. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26-33p.
- Ozeki, K., Kiyoi, H., Hirose, Y., et. al. (2004). Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood journal*, 103 (5), 1901-1908.
- Ozeki, K., Kiyoi, H., Hirose, Y., Iwai, M., Ninomiya, M., et al. (2004). Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood journal*, 103(5), 1901-8.
- Parcells, B. W., Ikeda, A. K., et al. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cell*, 24(5), 1174–1184p.
- Parcells, B. W., Ikeda, A. K., Simms-Waldrup, T. (2006). FMS-like Tyrosine Kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem cells*, 24(5), 1174-1184.
- Perez, S. M., Fajardo, G. A., Bernaldez, R. R., et.al. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, 11(355), 1471-2407.
- Piedras. (2006). Citometria de flujo en el diagnóstico y clasificación de padecimientos hematológicos: Leucemias agudas, síndromes linfoproliferativos crónicos y glicoproteínas plaquetarias. *Revista de Hematología*, 7(2), 53-88.
- QIAGEN, (1999), *QIAamp® RNA Blood Mini Handbook*. Consultado 20 de febrero del 2015. ©,all rights reserved. <https://www.qiagen.com>
- Rasko, J. E., Metcalf, D., Rossner, M. T., Begley, C. G., Nicola, N. A. (1995). The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haematopoietic cell survival and proliferation. *Leukemia*, 9(12), 2058-66.
- Rivera, L. R., Shalkow, K. J., Velasco, H. L., Cardenas, C. R., et.al. (2014). Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*, 14(790), 1471-2407.
- Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., et al. (2014). Targetable Kinase-Activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*, 371(11), 1005-1015.
- Roche. (2010), *Transcriptor first strand cDNA synthesis kit*, consultado el 1 de marzo del 2015. <https://lifescience.roche.com/shop/home>

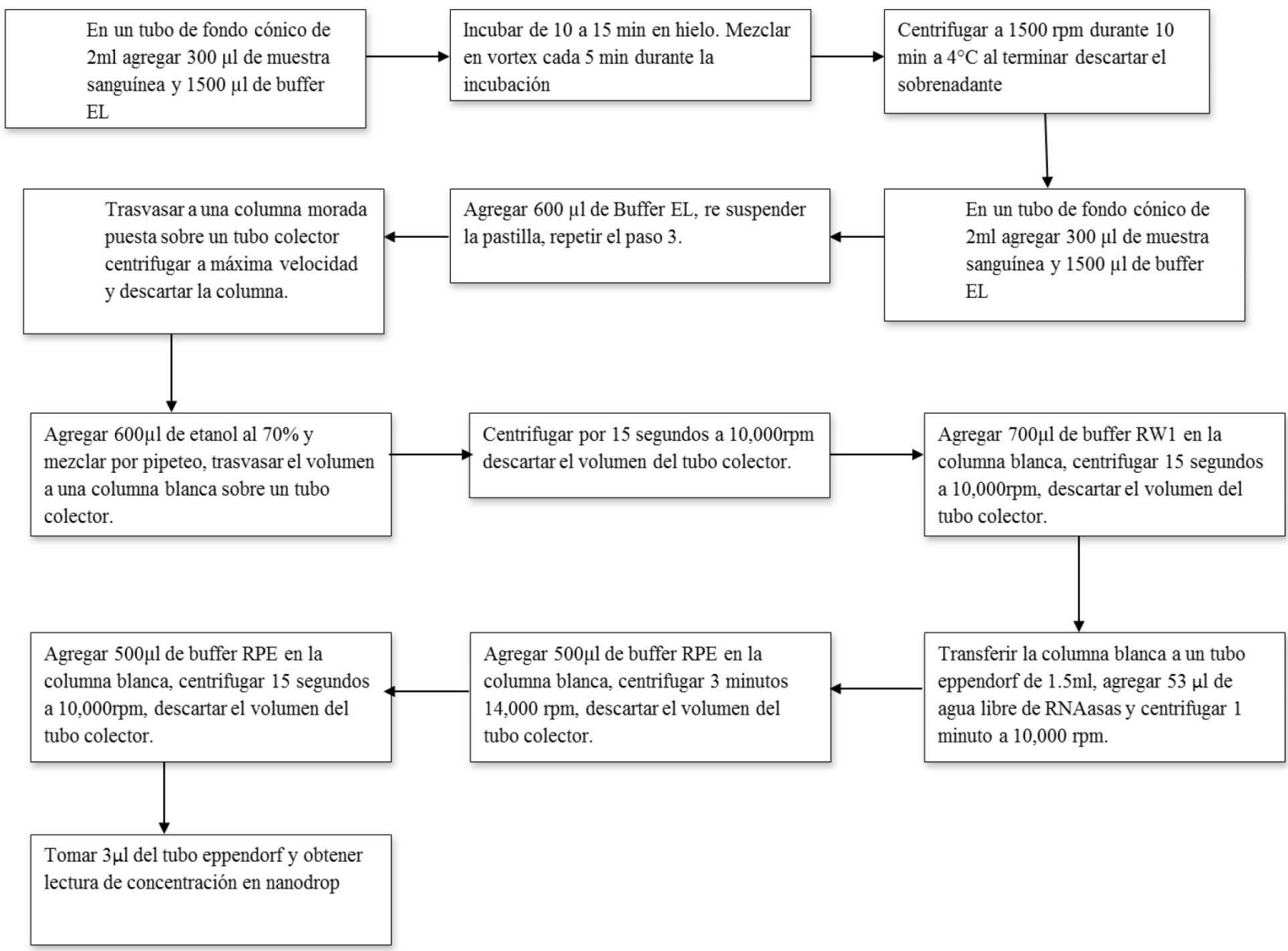
- Roche. (2015), *Restriction endonuclease EcoRV*. Consultado el 1 marzo del 2015. <https://lifescience.roche.com/shop/home>
- Rodak, F. B. (2005). Hematología fundamentos y aplicaciones clínicas, Ed Médica Panamericana.
- Rosnet, O., Buhning, H. J., Marchetto, S., et. al. (1996). Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*, 10(2), 238-48.
- Rosnet, O., Mattei, M., Marchetto, S., et. al. (1991). Isolation and chromosomal localization of novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, 9(2), 380-385.
- Rosnte, O., Bimbaum, D. (1993). Hematopoietic receptors of class III receptor- type tyrosine kinase. *Critical reviews in Oncology*, 4(6), 595-613.
- Ruiz-Argüelles, G. J. (1994). Fundamentos de hematología. Ed. Medica Panamericana.
- Santoyo, S., Ramos, P., Palmeros, M., Mendoza, G., Olarte, C., Martinez, T., Collazo, J., (2014). Leucemias agudas características clínicas y patrón estacional. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 52(2), 176-81.
- Sato, T., Yang, X., Knapper, S. (2011). FLT3 ligand impedes the efficacy of FLT3 inhibitors in vitro and in vivo. *Blood journal*, 117(12), 3286-3293.
- Shin, L. Y., Huang, C. F., Wu, J. H., et al. (2002). Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood journal*, 100(7), 2387-2392.
- Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Larsson, S., Nygren, J. M., Liuba, K., Jacobsen, S. E. (2003). Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. *Blood journal*, 102(3), 881-6.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E., et al. (1994). STK-1, the human homolog of Flk2/Flt3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/ stem cell. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America*, 91(2), 459-63.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E. (1994). STK-1, the human of Flk2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proceedings of the national academy of Science of the USA*, 91(2), 459-463.
- Stirewalt, D. L., Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature review cancer*, 3(9), 650-65.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Digestion of PCR products. Consultado el 15 de marzo del. © Copyright All Rights Reserved. <http://www.thermoscientific.es/home.html>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Product information Eco321 (EcoRV). Consultado el 15 de marzo del 2015. © Copyright All Rights Reserved. <http://www.thermoscientific.es/home.html>

- Thiade, C., Koch, S., Creutzig, E., et al. (2005) no evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 115 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML 10 and 12 trials. *Blood journal*, 106(10), 3658-65.
- Wang, Z., Kim, E., Chinault, A., Civin, C., Small, D. (1996). Genomic organization of the human STK-1 (FLT3/FLK2) gene. *Blood journal*, 88(111).
- Whitman, P. S. Ruppert, S. A. Radmacher, D. M. et.al. (2008). *FLT3* D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking *FLT3* internal tandem duplications. *Blood journal*, 111(3), 1552-1559p.
- Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Kiyoi, H., Naoe, T. (2005). Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*, 19(8), 1345-9.
- Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., et al. (2000). Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5a but not Stat5b for flt3- dependent signaling. *Journal of experimental medicine*, 192(5), 719-718.
- Zhao, M., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Ito, M., Towatari, M., Omura, S. (2000). In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*, 14(3), 374-8.

11. ANEXO A

Extracción de RNA por medio del Kit QIAamp® RNA Blood Mini kit (QIAGEN, 1999)

1. Se obtuvieron muestras de aspirado de médula ósea del servicio de hematología diagnosticados con leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoides aguda (LLA).
2. Se tomaron 300 µl de la muestra (medula ósea) y se agregaron 1500µl de buffer EL en un tubo de tamaño apropiado.
3. Se incubo de 10 a 15 min en hielo. Se mezcló en vortex cada 5 min durante la incubación
4. Centrifugamos a 1500 rpm durante 10 min a 4°C al terminar se descarta el sobrenadante
5. Se agregaron 600 µl de Buffer EL, re suspender la pastilla
6. Se centrifugo a 1500 rpm durante 10 min a 4°C al terminar se descartó el sobrenadante
7. Se agregaron 600µl de Buffer RLT y se mezcló con vortex o por medio de micro pipeta
8. Se trasvaso a una columna QIAshredder (morada) puesto sobre un tubo colector y se centrifugo a máxima velocidad; se descartó la columna QIAshredder.
9. Agregamos 600µl de etanol al 70% y se mezcló por pipeteo
10. Trasvasamos el volumen a una columna QIAamp (blanca) puesta sobre un nuevo tubo colector
11. Se centrifugo por 15 segundo a 10,000 rpm, descartamos el volumen del tubo colector
12. Se agregaron 700µl de buffer RW1 en la columna QIAamp
13. Centrifugamos 15 segundos a 10,000 rpm, se descarta el volumen del tubo colector
14. Se agregaron 500µl de buffer RPE en la columna QIAamp
15. Centrifugamos 15 segundos a 10,000 rpm, se descarta el volumen del tubo colector
16. Agregamos 500µl de buffer RPE en la columna QIAamp
17. Centrifugamos por 3 minutos 14,000 rpm, se descartó el volumen del tubo colector
18. Transferimos la columna QIAamp a un tubo eppendorf de 1.5ml
19. Se agregaron 53 µl de agua libre de RNAasas y se centrifugo durante 1 minuto a 10,000 rpm
20. Se tomaron 3µl del tubo eppendorf y obtuvimos lectura de la concentración en nanodrop.



Procedimiento QIAamp RNA Blood Mini

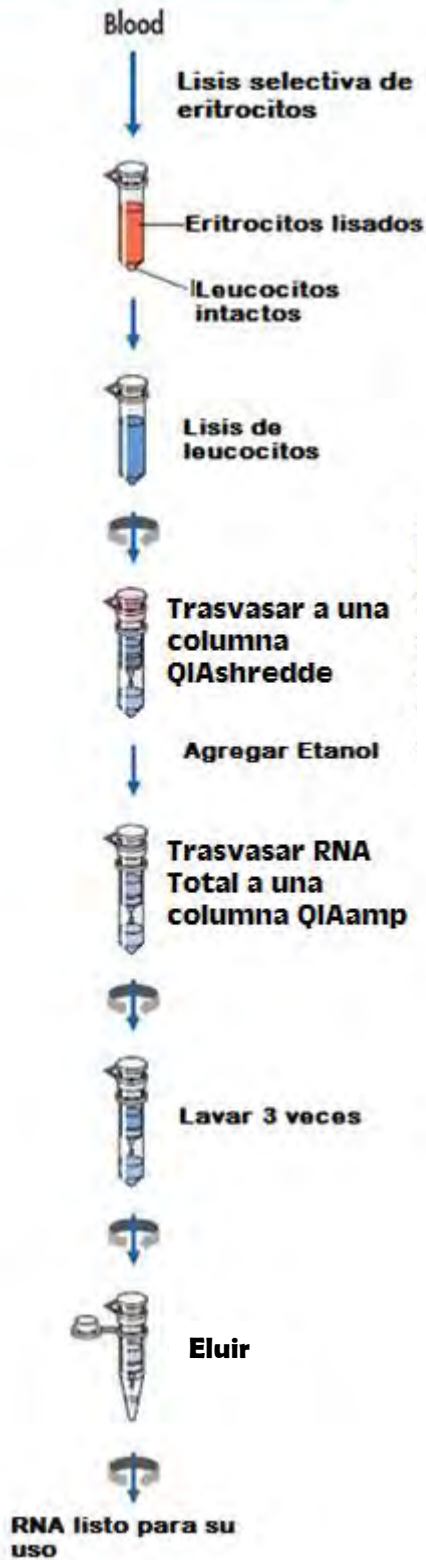


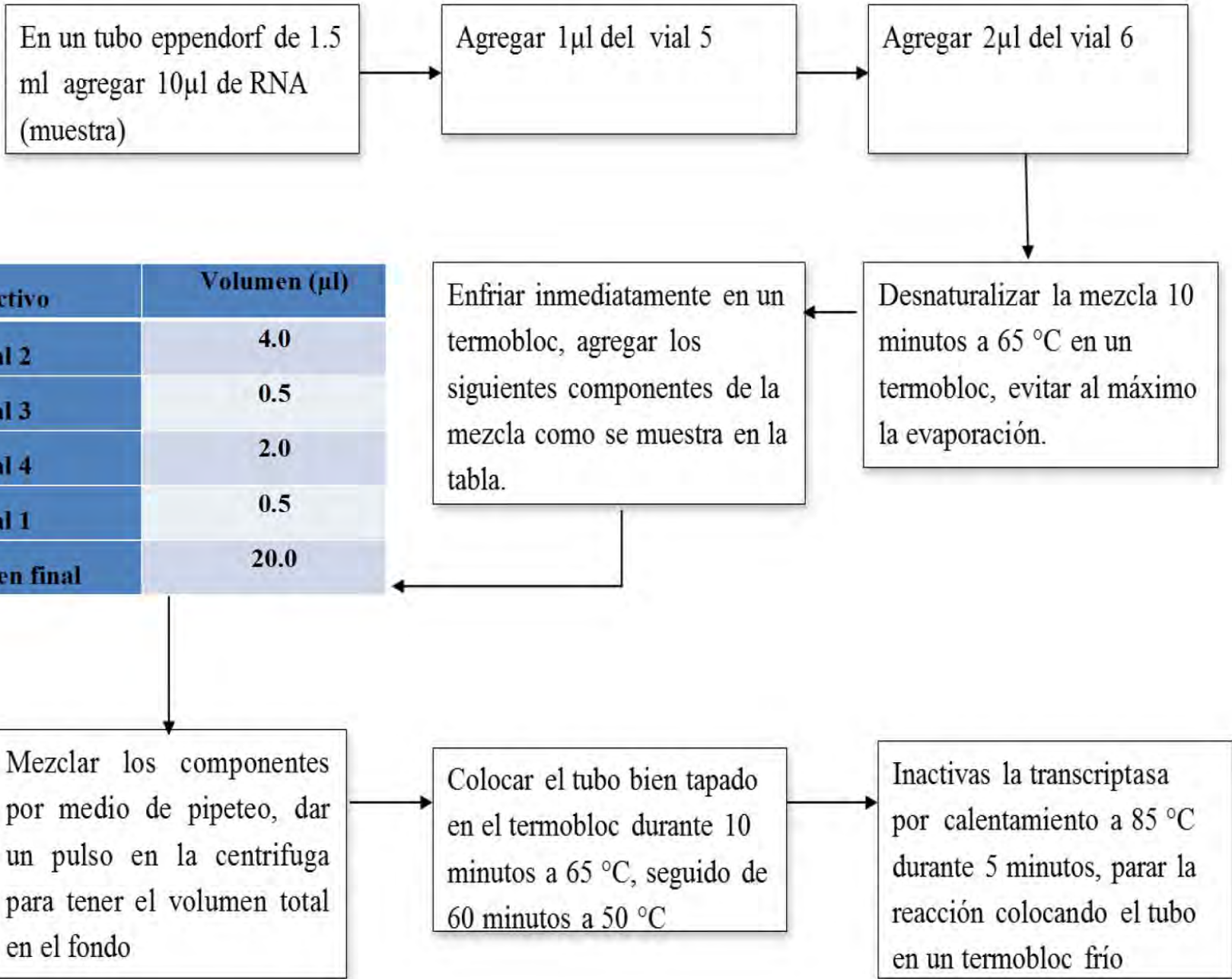
Figura 18. Procedimiento de extracción de RNA por medio del Kit QIAamp RNA Blood Mini. Figura tomada y modificada de QIAGEN, (1999). QIAamp RNA Blod Mini Handbook. Consultado el 20 de febrero del 2015.

Síntesis de cDNA por medio del kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml agregamos 10 μ l de RNA (muestra)
2. Se agregaron 1 μ l de iniciador Anchore-oligo (dT) (vial 5)
3. Se agregaron 2 μ l iniciador Random Hexamer (vial 6)
4. La desnaturalización de la mezcla RNA plantilla-iniciadores se logró colocando 10 minutos a 65 °C en un termobloc, evitando al máximo la evaporación.
5. Se enfrió inmediatamente en un termobloc frío
6. Se agregaron los siguientes componentes de la mezcla RT en el orden listado a continuación

Cuadro 5. Mezcla de reacción para la síntesis de DNA	
Reactivo	Volumen (μl)
Amplificador de reacción de la transcriptasa reversa. Conc.5x (vial 2)	4.0
Protector inhibidor de RNAsa, 40 U/ μ l (vial 3)	0.5
Mezcla de desoxinucleotidos, 10mM (vial 4)	2.0
Transcriptasa reversa, 20 U/ μ l (vial 1)	0.5
Volumen final	20.0

7. Se mezclaron los componentes por medio de pipeteo, dar un pulso en la centrifuga para tener el volumen total en el fondo
8. Se colocó el tubo en el termobloc durante 10 minutos a 65 °C, seguido de 60 minutos a 50 °C
9. inactivamos la transcriptasa por calentamiento a 85 °C durante 5 minutos
10. Se detiene la reacción colocando el tubo en un termobloc frío.



PCR Y DIGESTION CON LA ENZIMA ECO RV.

1. Se realizaron las mezclas de reacción considerando cada par de primers por separado:

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR 1x		
Reactivo	Mezcla F (µl)	Mezcla R (µl)
H2O grado PCR	12.5	12.5
Fast Start	2.5	2.5
MgCl ₂	3.0	3.0
17F	1.0	-----
17R	1.0	-----
R5	-----	1.0
R6	-----	1.0
Vol. Total	20.0	20.0

2. Para cada reacción en 2 tubos eppendorf de 0.5ml se agregaron 20µl de cada mezcla de reacción respectivamente, así mismo se colocaron 5µl de cDNA (muestra) a cada tubo.
3. Se colocó en el termociclador y se inició la reacción de PCR comenzando con un precalentamiento inicial de 5min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 56°C y 30s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.
4. Para cada reacción de digestión se realizó la siguiente mezcla:

Cuadro 7. Mezcla de reacción para digestión con Eco RV	
Reactivo	Volumen (µl)
H2O grado PCR	18.0
Buffer 10x	1.0
Eco RV	1.0
Mezcla de PCR	10.0

5. Se mantuvo a 37°C durante 12 horas
6. Después de haber realizado la digestión se elaboró una electroforesis por 60 minutos en un gel de agarosa al 3%.

