



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División De Estudios De Postgrado
CMN 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE**



ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL, MEDIDA POR RT-PCR EN LEUCEMIAS AGUDAS DE NOVO, Y SU IMPACTO EN LA RECAIDA.

**Tesis de Posgrado
Para obtener el Diploma de Especialista en Hematología**

**Presenta
Dra. Ma. de Monserrat González López Elizalde**

**Asesor
Dra. Martha Alvarado Ibarra**

**México D.F.
Diciembre-2009**

No. De registro: 240-2009



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.

**A mis maestros cuya generosa entrega amplió mi formación médica y
fincó mi entereza personal. Gracias.**
**A mis compañeros residentes por su apoyo incondicional durante esta
aventura.**
A la sangre, que siempre estará conmigo.

Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de Enseñanza e Investigación
CMN “20 de Noviembre”

Dr. Manuel López Hernández
Profesor Titular del Curso
Jefe del Servicio de Hematología
CMN “20 de Noviembre”

Dra. Martha Alvarado Ibarra
Médico Adscrito del Servicio de Hematología
Asesor de Tesis
CMN “20 de Noviembre”

Dra. Ma. de Montserrat González López Elizalde
Médico Residente de Hematología
CMN “20 de Noviembre”



I N D I C E

Resumen	2
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Antecedentes.....	5
Pacientes y métodos.....	8
Resultados.....	13
Tablas.....	15
Discusión.....	19
Conclusiones.....	20
Bibliografía.....	21

Resumen

ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL, MEDIDA POR RT-PCR EN LEUCEMIAS AGUDAS DE NOVO, Y SU IMPACTO EN LA RECAÍDA.

González- López M, Servicio de Hematología CMN “20 de Noviembre”, ISSSTE. México DF.

Introducción: Actualmente, el análisis de la Enfermedad Mínima Residual (EMR) por RT-PCR, se ha convertido en una herramienta necesaria en la valoración general de leucemias agudas, ya que la presencia de ésta se ha asociado con recaídas a corto plazo.

Objetivo: Conocer la incidencia y variedad de alteraciones citogenéticas medidas por RT-PCR en pacientes con leucemia aguda de novo, y conocer si la presencia de EMR al término de la inducción influye para la recaída.

Material y métodos. Se incluyeron pacientes con leucemia aguda de novo, ambos sexos, mayores de un año, candidatos a recibir quimioterapia intensiva. Se les realizó RT-PCR en sangre periférica al inicio y al final de la quimioterapia de inducción, en búsqueda de alteraciones citogenéticas. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de histocompatibilidad.

Resultados. Fueron incluidos 65 pacientes: 37 hombres y 28 mujeres. La media de edad fue de 21.4 años (1-69). Con leucemia aguda linfoblástica 39 (60%); de leucemia aguda mieloide 16 (25%); leucemia aguda promielocítica 7 (11.4%), y leucemia bifenotípica 3 (3.2%). Se encontraron alteraciones citogenéticas en el 37.7% de las muestras basales, las más frecuentes: t(15;17), t(12;21), t(9;22); t(8;21), y t(4;11). En 34 pacientes (52%), no se encontraron alteraciones citogenéticas. Solo dos pacientes con t(9;22) dieron positivos para EMR. La media de seguimiento fue de 8.2 meses. Se encuentran en remisión completa continua 24, falla 5, recaídas 9, muertes en inducción 6. La media del tiempo de recaída fue de 7 meses (4-10 meses), 2 de ellos con PCR normal inicial.

Conclusión. Existe consenso en que el estudio de la EMR debe realizarse al término de la inducción, y en los 6 meses posteriores a ésta. En este trabajo no se logró la asociación de EMR con las recaídas tempranas. Para la obtención de un resultado más objetivo, sería necesario un tiempo mayor de seguimiento.

Abstract

MINIMAL RESIDUAL DISEASE, AS MEASURED BY RT-PCR IN DE NOVO ACUTE LEUKEMIA AND ITS IMPACT ON RELAPSE.

Gonzalez-Lopez M, Hematology Department, CMN "20 de Noviembre, ISSSTE". Mexico DF.

Introduction: Currently, the analysis of minimal residual disease (MRD) by RT-PCR, has become a necessary tool in the overall evaluation of acute leukemias, and its presence, has been associated with short-term relapse.

Objective: To determine the incidence and variety of cytogenetic abnormalities as measured by RT-PCR in patients with de novo acute leukemia, and to know whether the presence of MRD at the end of induction and influence in relapse.

Material and methods. Patients with de novo acute leukemia, both sexes, aged one year or older, candidates for intensive chemotherapy. Was performed RT-PCR in peripheral blood, at the beginning and end of induction chemotherapy in search of cytogenetic alterations. The samples were analyzed in the histocompatibility laboratory.

Results. We included 65 patients: 37 men and 28 women. The mean age was 21.4 years (1-69). Acute lymphoblastic leukemia 39 (60%); and acute myeloid leukemia 16 (25%); promyelocytic leukemia 7 (11.4%), and biphenotypic leukemia 3 (3.2%). Cytogenetic abnormalities were found in 37.7% of the samples at baseline, the most frequent t (15; 17), t (12; 21), t (9; 22), t (8; 21), t (4; 11). In 34 patients (52%), no cytogenetic abnormalities were found. Only two cases were positive to EMR on t(9;22), none of the patients in morphological remission at the end of intensive chemotherapy provide new cytogenetic abnormalities. Median follow up was 8.2 months. They are in continuous complete remission 24, failed 5, relapse 9, chemotherapy induction deaths 6. The median time to relapse was 7 months (4-10 months), 2 with normal PCR.

Conclusion. There is consensus that the study of EMR should be performed at the end of induction, and for 6 months after it. In this work we not achieved the association between early relapse and EMR. To obtain a more objective would require a longer follow-up.



Enfermedad Mínima Residual Medida por RT-PCR en Leucemias Agudas de Novo y su Impacto en la Recaída.

1.- INTRODUCCION

En la actualidad muchos tipos de leucemia aguda son considerados potencialmente curables, la respuesta al tratamiento y las características clínicas dependen estrechamente de los factores pronósticos y del defecto molecular desencadenante. A pesar del avance de los tratamientos para esta enfermedad como la quimioterapia, radioterapia o el trasplante de precursores hematopoyéticos, el riesgo de recaída continua siendo, en muchos casos, un impedimento importante para su curación. El desarrollo de la genética molecular para el diagnóstico de las leucemias, ha permitido la descripción de alteraciones cromosómicas en las células tumorales y la identificación de oncogenes y genes supresores involucrados en la transformación maligna, todo lo cual, ha contribuido a mejorar las herramientas diagnósticas y a planificar tratamientos más efectivos.

La Enfermedad Mínima Residual (EMR) consiste en la persistencia de un clon anormal, en niveles bajos, durante o tras finalizar el tratamiento y la detección de esta será el tema de análisis de este protocolo de investigación.

2.-ANTECEDENTES

Los índices de remisión en leucemias agudas linfoblásticas (LAL) en niños y adultos es del 95 y 80%, en leucemias agudas mieloides (LAM) del 80 y 60%, en niños y adultos, respectivamente. A pesar de los nuevos esquemas en el tratamiento muchos de estos pacientes sufrirán recaídas.

El cálculo aproximado de células leucémicas al diagnóstico es de 10^{12} a 10^{13} células; la gran mayoría de estos pacientes alcanzarán la remisión a la cuarta semana después de un ciclo de quimioterapia intensiva. La remisión morfológica contempla una cuenta de blastos inferior al 5% en medula ósea normocelular. Esta definición, si muy bien útil, y en plena vigencia, es poco sensible para detectar EMR, definida como el nivel mínimo detectable de células leucémicas por métodos especiales en pacientes con remisión morfológica; su importancia radica en la detección de pacientes con mayor probabilidad de recaída y como consecuencia un mal pronóstico a largo plazo. La detección de 1×10^{-3} células leucémicas al final de la terapia de inducción se asocia a un riesgo 10.5 mayor de recaída en comparación con el grupo por debajo de este nivel.

Los métodos más empleados para la detección de EMR están: la citometría de flujo, la transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la hibridación in situ con inmunofluorescencia (FISH). Estos dos últimos, poseen la cualidad de ser altamente sensibles y específicos (1×10^{-5} – 1×10^{-6}), con la ventaja de que el RT-PCR tiene mayor aplicabilidad, es menos costoso y con resultados reproducibles en menor tiempo¹.

La RT-PCR es una técnica molecular que permite amplificar secuencias de ADN o ARN expresadas en las células tumorales, multiplicando por 100 el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ADN. Con esta técnica, se puede analizar el ARN de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por traslocaciones primarias o de otros genes asociados a la enfermedad¹.

Los marcadores moleculares más utilizados en la detección de EMR en las leucemias mediante PCR son: a) análisis de los reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas b) reordenamiento clonales del receptor de la célula T (TCR) y c) aberraciones cromosómicas con oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características; por ejemplo, el oncogén BCR/ABL ó t(9;22). Estas alteraciones estructurales de los genes tienen como consecuencia: la activación de proto-oncogenes o la formación de proteínas quiméricas, como tirosinquinazas o factores de transcripción que se comportan como factores de crecimiento, activadores intracelulares que dan como consecuencia el estado mitógeno.

Diversos trabajos realizados con análisis de citometría de flujo ponen de manifiesto que el riesgo de recidiva en los pacientes con EMR $> 1 \times 10^{-2}$ al finalizar la inducción es superior al 60% en el curso de los tres siguientes años, frente a menos del 15% en los que no se detecta EMR por debajo de este nivel. Los pacientes que tienen EMR con niveles de 1×10^{-3} al terminar el tratamiento de consolidación tienen un riesgo de recidiva de aproximadamente 70%². Otros autores han realizado estudios similares midiendo la EMR por PCR con resultados superponibles: la probabilidad de la recaída fue 100% con niveles de EMR $> 1 \times 10^{-3}$ al finalizar la inducción comparado con un 14% con niveles menores ($p < 0.001$)³.

Se reporta en la literatura que las alteraciones obtenidas por RT-PCR para leucemias mieloides agudas es cercano al 30%: t(8;21) 9%, t(15;17) 13%, inv(16) 8%, y para las leucemias agudas linfoblásticas suman aproximadamente el 26%: t(1;19)PBX/E2A 1.6%, t(4;11)MLL/AF4 4%, t(9;22)BCR/ABL p190 2.4% y t(12;21)TEL/AML1 17.5%⁴.

La mayoría de los análisis que han utilizado la RT-PCR en LANL lo han hecho con aberraciones cromosómicas específicas como control de remisión. Un estudio analizó el gen de fusión t(8;21)(q22;q22)AML1-ETO presente en la LANL-M2 y observaron que todos los pacientes que tuvieron una remisión prolongada y sin recaída presentaron estudios PCR negativos y concluyeron que la EMR negativa detectada por esta técnica antes de la consolidación, predice un buen pronóstico⁵.

Otro marcador utilizado en el seguimiento de EMR, es el gen de fusión CBF β -MYH11 que identifica la inversión inv(16)(p13;q22) encontrado en el subtipo de LANL-M4Eo. Diversos estudios observaron que los pacientes en remisión morfológica completa, con PCR negativos en el seguimiento posterior se mantuvieron en remisión completa durante más de 12 meses. El número de copias de gen CBF β -MYH11, tras la inducción y consolidación, fue significativamente más alto en los que recayeron, comparado con los que mantuvieron remisión completa, lo que confiere a esta determinación de EMR un importante valor predictivo^{6,7}. Dos estudios coincidieron que la enfermedad molecular precedió a la enfermedad hematológica en un promedio de 7 meses^{6,7}.

La técnica de PCR se ha utilizado también como marcador de actividad en líquido cefalorraquídeo, resultando un factor predictivo útil en la detección de recaída temprana en sistema nervioso central proponiéndose intensificar el tratamiento a este nivel antes de la infiltración manifiesta⁸.

En la actualidad existen protocolos que utilizan la detección de enfermedad mínima residual para estratificar a los pacientes en grupos de mayor o menor riesgo. Así por ejemplo, el PETHEMA LAL-BR/2001 contempla cambiar a los niños de protocolo terapéutico de bajo riesgo a alto riesgo tras la detección de EMR 0.1% al término de la intensificación o 0.01% al término de la consolidación. Por el contrario, son necesarios más estudios para afirmar que con niveles de EMR 0.01% tras la inducción, puedan beneficiarse con tratamientos menos intensivos⁹.

Recientemente se ha comunicado un estudio en el que se analiza la importancia de la detección de EMR por PCR al segundo año del tratamiento. Los autores concluyen que la combinación de los hallazgos de EMR en los meses 1 y 24 tras el diagnóstico, pueden predecir con bastante fiabilidad la evolución clínica de los niños con LAL¹⁰.

Cada vez existe mayor consenso en que sería deseable realizar el estudio de EMR al final de la inducción, al término de la consolidación y a los 12 meses del tratamiento tras finalizarlo, pues la detección de la EMR nos aporta una valiosa información sobre la predicción del curso clínico de la enfermedad y nos permite poder tomar actitudes terapéuticas en consecuencia^{11,3}.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es un método in vitro de síntesis de DNA con el que un segmento particular de este, es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra de manera exponencial a través de diferentes ciclos a diferentes temperaturas. A diferencia de otras técnicas de PCR el RT-PCR es una técnica cualitativa con un nivel elevado de sensibilidad y especificidad.

Técnica de RT- PCR

La RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de RNA (tanto mRNA como RNA total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. La RT-PCR es más sensible que otras técnicas, y requiere menos cantidad de RNA.

El RNA es utilizado como template para la síntesis cDNA, utilizando la transcriptasa reversa. El cDNA resultante provee de templates para la amplificación PCR.

Los PCR obtenidos son separados de acuerdo a su peso molecular en gel de agarosa. La presencia de una banda específica en una de estas reacciones determinará la siguiente reacción específica de amplificación. Así, pueden apreciarse distintos segmentos de DNA en un mismo carril, partiendo de un mismo molde y de una misma PCR. A estas reacciones específicas se denominan split-out y solo se aplican aquellas que han presentado positividad a la prueba.

Cada reacción de split out utiliza una mezcla de primer con la translocación, seguida por otra técnica llamada nested PCR. Esta segunda reacción es también separada por electroforesis y leída en gel agarosa, de acuerdo a su peso molecular .

La presencia de RNA o DNA contaminante: en las muestras, durante su extracción en el laboratorio y en los reactivos, debe ser evitada con el fin de impedir la aparición de productos inespecíficos.

La elección de los primers ha de ser cuidadosamente sopesada. Habitualmente, los primers utilizados en RT-PCR están a ambos lados de un intrón (es decir, en diferentes exones, de forma que se pueda diferenciar fácilmente entre productos procedentes de mRNA y productos procedentes de DNA genómico contaminante). De esta forma, los productos originarios de un proceso de RT-PCR a partir de mRNA serán menores que los productos obtenidos a partir de PCR de DNA genómico contaminante.

Al utilizar transcriptasas reversas termoestables, este problema se minimiza, ya que las temperaturas de reacción (60-65 °C) desnaturalizan este tipo de estructuras. En general, la transcripción reversa se logra en unos 30 minutos a 60 °C. Sin embargo, en algunos experimentos, este tiempo puede ser alargado hasta 1 hora, y la temperatura disminuida a 42 °C, o bien aumentada hasta 70 °C, con el fin de lograr un rendimiento óptimo de la reacción. 80 sitios de ruptura o mRNA variantes.

Estudios recientes reportan que los niveles de EMR, posterior a la quimioterapia de inducción y durante el mantenimiento, son capaces de predecir la recaída^{15,16,17}. El descubrimiento de nuevos factores pronósticos, influyentes en la sobrevida libre de recaída en el caso de pacientes aquejados por leucemia aguda (linfoblástica y no linfoblástica), han permitido mejorar los esquemas de quimioterapia intensiva. Esto, admite clasificar a los enfermos de acuerdo a un mayor o menor grupo de riesgo, además de que nos facilitaría armar esquemas de quimioterapia más agresivos para aquellos documentados por haber presentado factores pronósticos desfavorables. Actualmente, no existe un consenso que determine estos esquemas de tratamiento cuando existe EMR.

El objetivo de este estudio fue conocer la frecuencia de enfermedad mínima residual medidas por RT-PCR en leucemias agudas de novo, linfoblásticas y no linfoblásticas, en niños y adultos, medida al final de la inducción y conocer su trascendencia en las recaídas. Asimismo correlacionar la presencia de EMR con factores de mal pronóstico, ya conocidos al diagnóstico. El estudio sistemático de la EMR puede predecir la recaída, y el conocer su presencia, puede coadyuvar en el planteamiento estratégico que retarde su aparición clínica, en favor de mejorar la calidad del pronóstico.

PACIENTES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en el periodo comprendido entre mayo del 2007 a marzo del 2009 en el Servicio de Hematología. Se trata de un tipo de estudio: longitudinal, observacional y descriptivo.

Se incluyeron pacientes niños y adultos, ambos sexos con leucemia aguda de novo, candidatos a recibir quimioterapia intensiva de acuerdo a los protocolos vigentes del Servicio. Se excluyeron a los tratados en otro hospital de manera inicial; y se eliminaron a los que fallecieron durante la quimioterapia de inducción a la remisión, que no obtuvieron resultados por muestra inhibida, los que al final de la inducción hicieron falla terapéutica y los que cometieron violaciones al protocolo de tratamiento.

Se recolectaron muestras obtenidas de sangre periférica de todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. Los candidatos a recibir quimioterapia intensiva se incluyeron en los protocolos vigentes del Servicio por grupo de edad: LANOL 9 en el caso de las LANL (niños y adultos), LAL 10 y LAL 6 para >21 y < de 21 años respectivamente, en el caso de las leucemias agudas linfoblásticas de alto riesgo; LALRH-96 para el tratamiento de leucemias agudas linfoblásticas de riesgo habitual en niños y LAP para tratamiento de las leucemias agudas promielocíticas (niños y adultos). Las muestras se tomaron de sangre periférica y se almacenaron en tubos con EDTA, al inicio del tratamiento y previo a la quimioterapia de intensificación para LAL o primera postremisión en el caso de las LANL, consolidación en el caso de las LAL de bajo riesgo y consolidación de LAP.

Esquemas de Quimioterapia de Leucemias Agudas

LANOL 9

Inducción

- 1.-Citarabina 100mg/m² SC diluidos a 20 mg/ml de s.f, para infusión IV de 24 horas por siete días (Día1-7).
- 2.-Idarrubicina: 12 mg/m² diluidos 1mg/mL de s.f para pasar por vía iv en bolo (de 15 min) por tres días (día 1-3). Puede usarse daunorrubicina 45 mg/m² sc, día 1 a 3).
- 3.-FEG-G 300 mcg sc a partir del día +7 hasta que los neutrófilos alcancen 1.5 x 10⁹/L

LARH-96

Inducción

- 1.-Vincristina 2.0 mg/m² SC por semana iv (semanas 1 a 4) dos max 2 mg.
- 2.-Prednisona 60 mg/m² SC por día vía oral (días 1 a 28). Disminuir progresivamente del día 29 al 35.
- 3.-L- asparaginasa 4,000 U m² SC/día vía IM. Dos veces a la semana a partir de la semana 1 hasta la semana 8.
- 4.-Dexametasona 5 mg m² SC por dosis vía i.t. (semanas 1,3 y 5)
- 5.-Metrotexate via i.t. (semanas 1,3 y 5)
 - de 2 a 3 años 10 mg
 - > de 3 años 12 mg.

LAL 6

Inducción

- 1.-Día -4 Dexametasona 10 mg/m² día, vía iv en bolo durante 4 días. Tomar AMO día 0.
- 2.-Día 0: Ara C 20, 30, 50 o 70 mg i.t. para edades de <1, 2, 2-3,>3 años respectivamente.
- 3.-Día 1: Daunorrubicina 120 mg m² SC iv a pasar a goteo continuo en el curso de 48 hrs, diluido en una cantidad apropiada de solución fisiológica.
- 4.-Día 2: Ciclofosfamida 1.200mg/m² SC en bolo iv.
 - Vincristina 1.5 mg/m² SC iv en bolo. Repetir los días 9,16 y 23.
 - Prednisona 60 mg/m² SC/día vo hasta el día 23. Dosis reducción en el curso de 9 días.
- 5.- Día 4: Asparaginasa 4,000 U m²/SC/día i.m. posteriormente lun-mier-vier hasta concluir la consolidación.
- 6.- Día 9: FEG-G 5 mcg/kg/día s.c. y continuar hasta que la cuenta de neutrófilos sea mayor a 0.5 x 10⁹/L en dos cuentas consecutivas.

LAL 10

Inducción

- 1.- Dexametasona 15 mg/m²SC iv días -4,-3,-2,-1.
 - 2.- Día 0: Metrotexate 12.5 mg + ara C 40 mg + dexametasona 4 mg via i.t.
 - 3.- Daunorrubicina 120 mg/m²SC via iv para infusión de 48 hrs (días 0 y 1). Como alternativa: Mitoxantrona 20 mg /m²SC, para infusión de 48 hrs días (0 y 1).
 - 4.- Día 2: Ciclofosfamida 750 mg/m²SC iv en bolo.
 - 5.- FEG-G 300 mcg via s.c o i.m. (día 9) hasta que los neutrófilos alcancen 1.5 x 10⁹/L.
 - 6.- Vincristina 2mg en bolo vía i.v. (días 1,8,15 y 22).
 - 7.- L-asparaginasa 6,000 U/m²SC i.m. (días 8,15,21 y 28).
- Prednisona 100 mg/m²SC /día v.o. (semana 1 y 3).

LAP

1.-ATRA 45 mg/m²SC día v.o. dividido en dos tomas con alimentos hasta remisión completa, desde el día 1 hasta mínimo 30 y máximo 90 días.

2.-Daunorrubicina 60 mg/m²sc /día (o Idarrubicina 15 mg/m²SC día) i.v en infusión de 60 min. (días 2,4,6,8).

Análisis De Muestras

Las muestras se analizaron en el laboratorio de histocompatibilidad del CMN 20 de noviembre. Se aislaron leucocitos mediante hemólisis y centrifugación con NH₄Cl al 0.8%. Para la reacción con primers de traslocaciones múltiples, se añadieron 25 µl de muestra hemolizada a otro tubo con 11 mM de tris-HCl (pH 8.3), 55 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 0.2mM de deoxinucleótidos trifosfatados y una mezcla de 0.2 µM de cada mezcla de primers (total 8). Se utilizó como amplificador la enzima termoestable Taq-polimerasa, a un volumen de 1.5 UI en cada tubo. Obteniéndose un volumen total de 100 µl de esta primera reacción, se extraen 4µl para ser utilizados como templates en el segundo análisis (o split-out), que fue llevado a cabo en caso de resultar positivo el paso uno. Se realizaron veinticinco ciclos por cada ronda a temperaturas de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 1 min mediante un termociclador, y para el split-out, se extendió el tiempo en la temperatura de 72°C hasta siete minutos. Se extrajeron 10µl de cada tubo para ser colocados en un medio de gel-agarosa con bromuro de etidio al 1.5%, y separado por electroforesis para su lectura. Lo anterior con la finalidad de detectar 23 tipos diferentes de translocaciones con capacidad de análisis de 80 puntos de ruptura genómica o genes variantes, con una sensibilidad de 1×10^{-5} . El panel de traslocaciones utilizado se muestra a continuación.

Alteración Cromosómica	Genes involucrados
t(x;11)(q13;q23)	MLL1(11q23)AFX1(X;q13)
t(6;11)(q27;q23)	MLL1(11q23)AF6(6q27)
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL1(11q23)ELL(19P13.1)
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL1(11q23)ENL(19P13.1)
t(10;11)(p12;q23)	MLL1(11q23)AF10(10p12)
t(1;11)(p32;q23)	MLL1(11q23)AF-1p(1p-32)
t(1;11)(q21;q23)	MLL1(11q23)AF-1q(1q21)
t(11;17)(q23;q21)	MLL1(11q23)AF-17(11q21)
t(11;17)(q23;q21)	PLZF(11q23)RARa(17q21)
t(9;11)(q22;q23)	MLL1(11q23)AF9C(9q22)
t(1;19)(q23;p13)	E2A(19p13)PBX(PRL)(1q23)
t(17;19)(q22;p13)	E2A(19p13)HLF(17q22)
t(12;21)(p13;q22)	TEL(12p13)AML1(21q22)
TAL1d(40kb deleción)	SIL1(1p34)TAL1(1p34)
t(8;21)(q22;q22)	AML1(21q22)MGT8(ETO)(8q22)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22)MDS1(3q26)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22)EAD(3q26)
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22)MDS1(3q26)EV11(3q26)
t(16;21)(p11;q22)	TLS(16P11)ERG(21q22)
t(15;17)(q21;q22)	PML(15q22)RARa(17q21)
t(4;11)(q21;q23)	MLL1(11q23)AFA(4q21)
inv(16)	CFB(11q22)MYH11(16p13)
t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11)ABL(9q34)
t(9;12)(q34;p13)	TEL(12p13)ABL(9q34)
t(5;12)(q33;p13)	TEL(12p13)PDGFRB(5q33)
t(12;22)(p13;q11)	TEL(12p13)MN1(12q11)
t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23)CAN(9q34)
t(9;9)	SET(9q34)CAN(9q34)
t(15;17)(q34;q21)	NPM(5q34)RARa(17q21)
t(3;5)(q25:1;q34)	NPM(5q34)MLF1(3q25.1)

DEFINICIÓN DE EVENTOS

Remisión. Ausencia De datos clínicos y hemáticos atribuibles a la enfermedad, son evidencia de infiltración a otros órganos y 5% o menos de blastos en médula ósea, y hematopoyesis normal.

Falla: Más de 5% de blastos en médula ósea, al concluir la inducción

Recaída Mieloide. Más de 5% de blastos, en médula ósea, después de obtenida la Remisión.

Recaída Neurológica. Blastos en LCR procesado con ultracentrífuga, después de obtenida la remisión.

Recaída Extramedular. Infiltración a otros órganos, distintos al sistema nervioso central, demostrado con histopatología.

Muerte en la Inducción. Fallecimiento, luego de haber iniciado la quimioterapia de inducción, y antes de evaluar la posible remisión.

Muerte en Remisión: Fallecimiento luego de haberse alcanzado la remisión.

Sobrevida Libre de Enfermedad: Tiempo de remisión completa hasta la recaída.

Sobrevida Global: Tiempo entre el diagnóstico de leucemia aguda y la muerte.

Enfermedad mínima residual: a la persistencia de alteraciones citogenéticas obtenidas posterior al tratamiento de inducción que se encuentren en remisión morfológica de la enfermedad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de las variables se utilizó el programa estadístico de SPSS versión 14 las variables nominales se expresaron en por ciento, las variables numéricas en medias con límites de mínimos y máximo, para la comparación de dos variables nominales se utilizó Chi cuadrada y para la comparación de variables numéricas se utilizó T de Student. Para las pruebas no paramétricas se utilizó Kruskal Wallis Se consideró de valor pronóstico $p < 0.05\%$

Se analizaron 65 pacientes, de enero del 2007 hasta abril del 2009. La media de edad fue de 21.4 años (1-69), 28(43%) pacientes del sexo femenino y 37 (57%) del sexo masculino. En treinta nueve casos (60%), correspondieron a LAL; 16 (25%) a LAM, 7(11%) a LAP, y 3 casos fueron de leucemia bifenotípica. Las características generales de los pacientes se muestran en la tabla 1 y 2.

La media de seguimiento fue de 8.2 meses (1-36). De la quimioterapia de inducción a la remisión, 54 pacientes (83%) alcanzaron remisión morfológica. Cinco (7.66%) se consideraron fallas al tratamiento, de las cuales, cuatro aparecieron en mayores de 45 años ($p=0.03$). El tipo de respuesta alcanzada, según el diagnóstico de leucemia, se detalla en la tabla 3.

Se registraron 15 muertes durante la totalidad del estudio; 6 de ellas durante la quimioterapia de inducción, las cuales se debieron a infección en 2 pacientes, a hemorragia en 3 y, en uno por infarto agudo al miocardio. Durante la segunda etapa del seguimiento, murieron 9 pacientes, 8 por origen infeccioso y uno por hemorragia.

Del total de pacientes en estudio, se encuentran vivos 50 (77%), de los cuales 31 (62%) están en remisión completa continua, y 8 (16%) están en recaída. De los órganos en donde se detectó dicha declinación, 6 (9%) fueron en médula ósea; 1 (1.5%) en SNC, y otro, en ambos. Según el diagnóstico, 5 casos ocurrieron en LAL, incluyendo las 2 recaídas en SNC; y 3, en LAM ($p=0.7$), (ver tabla 9). Todas las recaídas acontecieron en un lapso posterior a los 6 meses, una vez alcanzada la remisión completa.

Análisis de Traslocaciones por PCR

De las 65 muestras iniciales, 7 (11%) se reportaron como inhibidas, por lo que fueron eliminados para el análisis de EMR. Más de la mitad de las muestras, 34(52%) fueron reportadas como negativas en el panel de translocaciones de PCR, y el resto, 24(37%), dieron positivas. El desglose de resultados por diagnóstico se detalla en las tablas 4 y 5.

La translocación más frecuentemente registrada fue la $t(15;17)$ $n=7(11\%)$, que resultó positiva en todos los casos con Leucemia Aguda Promielocítica, seguida de la $t(12;21)$ $n=5(8\%)$, y la $t(9;22)$ $n=4(6\%)$. Las otras translocaciones reportadas en menor porcentaje fueron las $t(8;21)$, inv (16), $t(9;11)$, $t(4;11)$ y del 7. La distribución por grupo de edad se detalla en la tabla 6, donde se detalla que la mayoría de las alteraciones se registró en la población menor a 20 años, con un valor de p significativo ($p=0.026$). La $t(9;22)$ fue detectada predominantemente en adultos, reportándose que, 3 de los 4 resultados con esta alteración se documentaron en mayores de 20 años; en cambio, la $t(12;21)$ fue exclusiva en niños (<10 años).

Enfermedad Mínima Residual

De los 47 pacientes que resultaron evaluables para EMR, 11 fueron descartados por inhibición durante el procesamiento de la muestra, 6 por muerte en inducción y 5 por falla terapéutica; del grupo de muestras inhibidas todos pertenecían al grupo citogenético normal. Treinta y seis pacientes fueron analizados al término de la inducción, y sólo 2 (5%) fueron positivos para enfermedad mínima residual en la t(9;22), y en ninguno de los casos se reportaron alteraciones citogenéticas adicionales.

En el grupo de pacientes con translocaciones de buen pronóstico, no se comprobó la presencia de EMR: t(15;17), t(8;21), e inv(16). De las consideradas como de mal pronóstico: la t(9;22), 2 de 4 pacientes persistieron positivos; en cambio, en la t(4;11) los dos negativizaron.

En cuanto a la respuesta al tratamiento, analizado por tipo de alteración citogenética, tenemos que del grupo de pacientes con PCR normal, 26(92%), hicieron remisión, y 2, fallas terapéuticas. En la t(15;17) los 7 casos remitieron durante la inducción; en la t(9;22), 3 alcanzaron remisión y 1 presentó falla. El resto de las alteraciones se detalla en las tablas 7 y 8.

De las 6 muertes en inducción, se comprobó que todas tenían PCR normal inicial. En los 2 pacientes con EMR positiva en la t(9;22), se encuentra en este momento uno en Remisión completa continua (RCC), y otro con recaída.

Entre los que sustentaban EMR negativa, acaecieron 8 recaídas, 9 muertes, y 17 se encuentran en RCC.

Factores Pronósticos

No se encontró impacto en la respuesta a la inducción, de acuerdo con los factores de mal pronóstico: hepatomegalia, esplenomegalia, cantidad de leucocitos, hematocrito, cuenta plaquetaria, y estirpe leucémica por inmunofenotipo ($p=0.3$). La cuenta de leucocitos no influyó para la remisión ni para la recaída ($p=0.9$). Tampoco se encontró correlación entre la presencia de EMR y estos factores.

TABLAS

Tabla 1. Características Generales	
	N(%)
Total	65
Sexo (M/F)	37/28 (57-43)
Edad (media)	21.4(1-69)
Diagnósticos	
Leucemia Aguda Linfoblástica	39 (60)
Leucemia Aguda Mieloide	16 (25)
Leucemia Promielocítica	7(11)
Leucemia Bifenotípica	3 (5)
Quimioterapia	
LAL 6	34(52)
LAL 10	6 (9)
LANOL 8	18 (27)
LAP 3	7 (11)

Tabla 2.	
Datos al Diagnóstico	Resultado
Leucocitos/mcl (media)	46.1(1-759)
Hematocrito% (media)	25(8-45)
Plaquetas/mcl (media)	90 (4-900)
Blastos% (media)	74(20-100)
Hepatomegalia: (si/no)	28/37(43-57)
Esplenomegalia: (si/no)	15/50(23-77)
Adenomegalias: (si/no)	20/45(31)
Infiltración a SNC	1(1.5)
Otros sitios de infiltración	3(5)
Inmunofenotipo	
Mieloide	23 (35)
Linfoide T	1(1.5)
Linfoide B	38 (58)
Bifenotípica	3 (4.6)

Tabla 3. Respuesta al Tratamiento de Inducción por tipo de Leucemia(p=0.004)

	LAL	LAM	LAP	Bifenotípica
Remisión	33	12	7	2
Falla	2	2	0	1
Muerte en inducción	4	2	0	0

Tabla 4. Análisis de Translocaciones basal

PCR	n(%)
Inhibidas	7(11)
Normal	34(52)
t(15;17)	7(11)
t(9;22)	4(6)
t(12;21)	5(8)
t(8;21)	3(5)
Inv 16	2(3)
T(9;11)	1(1.5)
T(4;11)	1(1.5)
Del 7	1(1.5)

Tabla 5. Frecuencia de Translocaciones por Diagnóstico

Leucemia Aguda Linfoblástica	n
Inhibida	4
Normal	26
t(9;22)	2
t(12;21)	5
t(4;11)	2
Leucemia Aguda Mieloide	
Inhibida	2
Normales	7
t(9;22)	1
t(8;21)	3
Inv 16	2
Leucemia Aguda Promielocítica	
t(15;17)	7
Bifenotípica	
Inhibida	1
Normal	1
t(9;22)	1

Tabla 6. Translocaciones frecuentes por grupo etáreo (p=0.026)

Edad, años	<20	>20
Normal	24	10
t(9;22)	1	3
t(12;21)	5	0
t(8;21)	3	0
inv (16)	1	1
t(4;11)	2	0
Del 7	0	1

Tabla 7. Respuesta a la Inducción de Acuerdo al Tipo de Alteración Citogenética

	RC	Falla	Muerte Inducción
Normal	26	2	6
t(15;17)	7	0	0
t(9;22)	3	1	0
t(8;21)	3	1	0
t(12;21)	5	0	0
Inv(16)	2	0	0
t(4;11)	2	0	0
Del 7	0	1	0

Tabla 8. Status Actual por Tipo de Translocación Citogenética Inicial

	PCR	EMR	RCC	Recaída	Muerte
Normal	26	0	9	3	0
t(15;17)	7	0	7	0	0
t(9;22)	4	2	2	1	1
t(8;21)	3	0	0	2	1
t(12;21)	5	0	3	2	0
Inv(16)	2	0	2	0	0
t(4;11)	2	0	1	1	0

PCR=Reacción en cadena de Polimerasa, EMR=Enfermedad Mínima Residual, RCC= Remisión Completa Continua

Tabla 9. Análisis de Recaídas por Tipo de Leucemia

a) Diagnóstico	Recaída
Leucemia Aguda Linfoblástica	5
Leucemia Aguda Mieloide	3
Leucemia Aguda Promielocítica	0
Leucemia Bifenotípica	0

Discusión

Las técnicas moleculares son reconocidas como de gran sensibilidad y especificidad en la detección de translocaciones celulares. Por lo mismo, este estudio evalúa la aplicación de la técnica de PCR en leucemias agudas desde el diagnóstico y hasta el término de la inducción, con el fin de valorar la presencia de Enfermedad Mínima Residual (EMR). La presencia de estas alteraciones ha sido asociada a diferentes factores de riesgo. De acuerdo con nuestros resultados, estos datos no fueron reproducibles para los factores de riesgo conocidos, como la edad, cuenta de leucocitos, visceromegalias y estirpe celular.

En este estudio, la presencia de alteraciones citogenéticas durante el diagnóstico fue similar a la reportada en la literatura (24-32%). Las otras translocaciones se detectaron en porcentajes similares a los informados en otras series.

Se encontró correlación entre las translocaciones de buen pronóstico, como lo son t(15;17), t(8;21), e inv(16) y también en los índices de remisión durante el tratamiento de inducción, con una significancia estadística ($p=0.0001$), pero no así en las fases de recaída, ya que un paciente con LAM y t(8;21) la presentó al los dos meses de suspensión electiva, sin evidencia de EMR.

La presencia de EMR fue mínima, pues se encontraron sólo 2 casos positivos, no siendo posible su correlación con lo reportado en la bibliografía médica. Esto debido a que las fallas en la técnica de PCR fueron múltiples y debidas a errores humanos, ya que se requiere de mucho adiestramiento y familiarización con el método, por los riesgos de contaminación, causa principal del elevado número de pacientes eliminados (7 en la primera etapa y 11 en la segunda). Con estos datos, no resulta difícil adivinar que esta técnica es de las llamadas cualitativas y no supera al estándar de EMR en leucemias agudas, que es el de inmunofenotipo, como se comprobó en estudios realizados en este mismo hospital.

En ninguno de los casos se reportaron alteraciones citogenéticas adicionales. En el grupo de pacientes con translocaciones de buen pronóstico, no se comprobó la presencia de EMR t(15;17), t(8;21) ni inv(16). En cambio, entre las conocidas de mal pronóstico, como son la t(9;22), 2/4 negativizaron y dos persistieron positivas; y en la t(4;11) las dos revirtieron a negativas

A pesar de los grandes avances en la tecnología de las leucemias agudas, es necesario entender que si bien es cierto que los estudios citogenéticos y los de biología molecular son indispensables para determinar un pronóstico y tratamiento más efectivos, en un país como México es prácticamente imposible que en forma rutinaria -y a nivel nacional- se lleven a cabo dichos estudios. En un consenso nacional sobre la disponibilidad de pruebas de leucemias agudas, se encontró que de todas las instituciones hospitalarias nacionales que tratan a estos pacientes, sólo el 16% lleva a cabo estudios de inmunofenotipo; de éstas, solamente tres instituciones (7%) hospitalarias del Sector Salud efectúan los estudios citogenéticos y de biología molecular. Obviamente, se antojaría decir que estas instituciones deberían ser centros de referencia para todas las pruebas; sin embargo -y como ha sucedido reiteradamente en nuestro país- son los recursos financieros los que limitan la formación de verdaderos centros, no obstante el número tan elevado de pacientes que están presentando esta enfermedad. Este es el primer trabajo realizado en nuestro país que involucra un número importante de casos analizados por técnicas moleculares, las cuales pueden definir mejor la frecuencia de estas alteraciones, además del valor clínico desde el diagnóstico.

Conclusiones

Como señalamos con anterioridad, la presencia de translocaciones en las leucemias agudas fue similar a la reportada en la literatura. Una vez comprobada la translocación celular, no fue factible asociar la presencia de EMR en los pacientes con recaída, debido quizá al factor tiempo y a las pocas muestras que se pudieron analizar post inducción. Será necesario un lapso mayor de seguimiento que dé la posibilidad de ampliar este estudio con una segunda muestra, posterior a la consolidación, u otra a los 6 meses del diagnóstico para su mejor seguimiento a largo plazo.

Es evidente que el empleo de técnicas inmunológicas y genéticas como complemento de los estudios morfológicos, aporta una alta precisión al diagnóstico, y agrega factores pronósticos y de orientación terapéutica que se traducen en un manejo clínico más seguro. Por ende, la mejor utilidad de este método (PCR) debe fundamentarse en la selección orientada de pacientes que sean candidatos a un seguimiento guiado por el mismo. Debido a su alto costo, desde la primera muestra se podrían limitar los seguimientos en consecución de óptimos resultados, dando prioridad a los pacientes con alteraciones citogenéticas iniciales. Racionalizar -en mi opinión- no siempre significa acotar al mínimo los recursos empleados, suponiéndolo una forma de ahorro, sino que en gran parte de los casos el empleo de una técnica bien seleccionada, reafirma un diagnóstico y provoca el verdadero ahorro significativo que es: tratar desde el comienzo una entidad definida con protocolos de documentada eficacia.

Por lo anterior, será necesario hacer un seguimiento de los pacientes y observar la cinética de la respuesta a la terapia (los cambios cuantitativos en varios estadios del tratamiento), en lugar de enfocarse en un valor aislado que por sí solo no es informativo. Este aspecto de las pruebas tiene que mejorar hasta el día en que este tipo de estudios se estandaricen.

BIBLIOGRAFIA

1. Cheung IY, Cheung NK, Detection of microscopic disease: comparing histology, immunocytology, and RTPCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAGE. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36:210-2.
2. San Miguel JF, Martinez A, Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997; 90: 2465–2470
3. Buccisano F, Maurillo L, Gattei V, The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006 Oct;20(10):1783-9.
4. Venditti A, Tamburini A, Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukemia. *J Haemathother Stem Cells Res*. 2002 Apr; 11(2):349-57.
5. Viehmann S, Teigler-Schlegel A, Brunch J, Monitoring of minimal residual disease (MRD) by real time-quantitative reverse transcription PCR (RQ-RT-PCR) in childhood acute myeloid leukemia with AML1/ETO rearrangement. *Leukemia* 2003; 17:1130-6.
6. Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Pronostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics, t(8;21) and inv (16). *Leukemia*, 2006 Jan;20(1):87-94.
7. Laczika K, Mitterbauer G, Prospective monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with inversion inv(16) by CBFbeta/MYH11 RT-PCR: Implications for monitoring schedule and for treatment decisions, *Leuk Lymphoma* 2001 Sept-Oct; 42(5):923-31.
8. De Hass V, VetRJ, Early detection of central nervous system relapse by polymerase chain reaction in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 2002; 81:59-61
9. Borowitz MJ, Pullen DJ, Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group Study. *Leukemia* 2003; 17:1566-72
10. Marshall GM, Haber M, Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21:704-9
11. Venditti A, Buccisano F. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3948–3952.
12. Palacio C. Enfermedad mínima residual en la leucemia aguda linfoblástica del niño. *Haematológica (ed. Esp.)* 2002; 87 (suppl.1):267-9.

13. Maurillo L, Buccisano F, Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica*. 2007 May;92(5):605-11.
14. Beillard E, Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using real-time quantitative reverse transcriptase PCR – A Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17: 1-13.
15. Scrideli CA, Assumpção JG, A simplified minimal residual disease polymerase chain reaction method at early treatment points can stratify children with acute lymphoblastic leukemia into good and poor outcome groups. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):781-9.
16. Bassan R, Spinelli O, Oldani E Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4153-62.
17. Flohr T, Schrauder. A Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia.; International BFM Study Group (I-BFM-SG). *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):771-82.