



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Evaluación de la presencia de las
translocaciones MLL-AF4, TEL-AML1 y
AML1-ETO en recién nacidos y sus
madres expuestos a plaguicidas
organoclorados

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓLOGA KAREN SUÁREZ LARIOS

TUTORA DE TESIS: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

COMITÉ TUTOR: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SUAREZ LARIOS KAREN** con número de cuenta **301008235** con la tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LAS TRANSLOCACIONES MLL-AF4, TEL-AML1 Y AML1-ETO EN RECIÉN NACIDOS Y SUS MADRES EXPUESTOS A PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA**:

Presidente: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
Vocal: DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO
Secretario: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
Suplente: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DR. VICTOR MANUEL DAVILA BORJA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de Junio de 2012.

M: del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONES

- ❖ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de dar un paso más dentro de mi formación profesional.
- ❖ Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT, por el apoyo brindado al proyecto núm. IN220506.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el apoyo otorgado durante mis estudios (Apoyo no. 260448).
- ❖ Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por permitirme realizar mi proyecto de maestría dentro de sus instalaciones.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

- ❖ A mi tutora, la Doctora Regina Dorinda Montero Montoya, quien ha sido uno de mis mayores soportes durante todo este tiempo; quien de una u otra forma me ayudó a superar todos los obstáculos que se presentaron, quien me brindó toda su confianza y a quien siempre tendré en gran estima.
- ❖ Agradezco al Doctor Rafael Camacho Carranza y al Doctor Enrique Isabel Miranda Peralta, quienes durante todo este tiempo me brindaron su tiempo y consejos, su apoyo y opiniones, su gran disposición y entrega para que este trabajo tuviera un buen fin.

❖ A los Miembros de mi Jurado:

Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta

Dra. Sandra Gómez Arroyo,

Dr. Rafael Camacho Carranza

Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte,

Dr. Victor Manuel Dávila Borja,

gracias por el tiempo que se han tomado para leer y revisar este trabajo, gracias por las preguntas, gracias por las observaciones, gracias por sus palabras.

❖ A la Dra. Leticia Yañez Estrada, quien nos proporcionó las muestras evaluadas en este estudio.

❖ Al MVZ Luis Serrano García por su paciencia y apoyo en los cultivos de las líneas celulares y linfocitos.

❖ A la bióloga Laura Elena Ortega Elorza quien me ayudó en los cultivos celulares y estandarización de la técnica; quien siempre entendía mis palabras aun cuando las invertía.

❖ Al Dr. Omar Arellano Aguilar, por su apoyo en el análisis de este trabajo.

❖ A todas las personas con quienes compartí un lugar en el laboratorio, con quienes he intercambiado experiencias y que de una u otra forma me han acompañado durante esta etapa de mi formación, Paulina, Eunice, Sol, Laura, Luis, Omar y Javier.

❖ A mis padres, mi principal pilar, que desde siempre me han dado la libertad para seguir mis ideas.

❖ A mis hermanas, mi segundo pilar, que han debatido y cuestionado.

❖ A mis *usegí*, que durante las noches me acompañaron y me animaron.

❖ A KM y a todo aquello que me permitió no volverme loca *u*.

DEDICATORIA

Este trabajo es para todas las personas que buscan ayudar, no perjudicar.

Para todos los padres que buscan proteger y guiar a sus hijos.

Para todos los estudiantes que buscamos “no cumplir un requisito”, sino encontrar un sueño, un ideal.

Para todos los investigadores que no sólo buscamos satisfacer una curiosidad, sino que ésta vaya acompañada con el interés de encontrar soluciones.

Para todos aquellos que gustamos de la vida, el mejor ejemplo: mis padres.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes	3
Capítulo 1	3
Leucemia: Una Enfermedad Hemato-Oncológica.....	3
Frecuencia de la Leucemia en Población General vs. Frecuencia e la Leucemia Pediátrica	3
Clasificación de la Leucemia.....	4
Leucemias Agudas en Infantes y Niños.....	5
Frecuencia de las Leucemias Agudas en Infantes y Niños (0 a <15 años).....	7
Capítulo 2	10
Anormalidades Genéticas en las Leucemias Agudas en Infantes y Niños.....	10
Asociación Específica entre Ciertas Anormalidades Genéticas y subtipos particulares de Leucemia.....	12
Participación de Anormalidades Genéticas Específicas en el Proceso de Leucemogénesis: Translocaciones Recíprocas y Balanceadas.....	12
Capítulo 3	17
Origen de la Leucemia en Infantes y Niños: Translocaciones Asociadas.....	17
Estudios de Leucemia Concordante en Gemelos Monocigóticos.....	18
Estudios Retrospectivos al Nacimiento: Evaluación de Tarjetas Guthrie.....	20
Tres Translocaciones Asociadas a Leucemias en Infantes y Niños con Origen Prenatal: TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4.....	22
Translocación (12;21)(p13;q22): Gen Fusionado <i>TEL-AML1</i>	24
Translocación (8;21)(q22;q22): Gen Fusionado <i>AML1-ETO</i>	25
Translocación (4;11)(q21;q23): Gen Fusionado <i>MLL-AF4</i>	25
Capítulo 4	27
Factores que Favorecen la Formación de Translocaciones Asociadas a Leucemias.....	27
Incremento de Riesgo a Desarrollar Leucemia en Infantes y Niños por Exposición a Plaguicidas Durante el Desarrollo Embrionario.....	27
Plaguicidas como Agentes Genotóxicos.....	28
Planteamiento	32
Hipótesis.....	32
Objetivo General.....	32
Objetivos Particulares.....	32
Diseño Experimental.....	32

Material y Métodos	33
Muestras de los Donantes.....	33
Líneas Celulares.....	33
Extracción y Cuantificación de RNA Total.....	33
Muestras de Linfocitos Fijados.....	33
Líneas Celulares.....	33
Cuantificación de RNA total.....	34
Síntesis de cDNA a Partir del RNA Total (Reverso-Transcripción, RT).....	34
PCR Anidada.....	34
Primera Reacción.....	34
Segunda Reacción.....	34
Visualización de las Translocaciones.....	35
Análisis de Secuencias.....	36
Prueba de Sensibilidad de la Técnica.....	36
Análisis Estadístico.....	36
Resultados	37
Estandarización.....	37
TEL-AML1.....	38
AML1-ETO.....	39
MLL-AF4.....	40
Estudio de las Muestras.....	41
Secuenciación de las Translocaciones Detectadas por (RT)-PCR.....	42
TEL-AML1.....	42
AML1-ETO.....	43
MLL-AF4.....	46
Asociación: Presencia/Ausencia de Rearreglos Cromosómicos vs Concentración de Organoclorados.....	54
Características Generales de la Población.....	54
Discusión	56
Análisis de los Transcritos Encontrados.....	56
Transcrito TEL-AML1.....	56
Transcrito AML1-ETO.....	57
Transcrito MLL-AF4.....	58
Detección de Transcritos de las Translocaciones TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4 en Madres y Recién Nacidos Expuestos a Plaguicidas Organoclorados.....	60

Frecuencia del Transcrito de la Translocación TEL-AML1.....	60
Frecuencia del Transcrito de la Translocación AML1-ETO.....	61
Frecuencia del Transcrito de la Translocación MLL-AF4.....	61
Translocaciones Asociadas a Leucemia en Infantes y Niños como Marcadores de Genotoxicidad.....	62
Relevancia de evaluar Translocaciones Asociadas a Leucemia en Muestras Neonatales	64
Recomendaciones para Estudios Posteriores.....	65
Conclusiones.....	67
Anexos.....	68
Bibliografía.....	93

TABLAS

Tabla I.1 Distribución en porcentaje de las neoplasias malignas en el grupo de edad de 0-18 años.....	4
Tabla I-2 Clasificación de la Leucemia de acuerdo con el tipo celular involucrado.....	5
Tabla I-3 Clasificación MIC para Leucemias Agudas.....	7
Tabla I-4. Frecuencia de Leucemia, de Leucemia Linfoide (LL) y de Leucemia Mieloide Aguda (AML) en niños de 0 a <15 años. Clasificación con base en la ICCC-3.....	8
Tabla I-5. Número de casos nuevos de Leucemia y sus subtipos principales en diez estados de México.....	9
Tabla I-6. Frecuencia de translocaciones en algunos subtipos de Leucemia en infantes y niños.....	16
Tabla I-7. Posibles marcadores que indiquen el mismo origen clonal (monoclonal) de la Leucemia en Gemelos.....	17
Tabla I-8. Estudios de Leucemia concordante en gemelos monocigóticos con marcadores clonotípicos únicos.....	19
Tabla I-9. Estudios retrospectivos con Tarjetas Guthrie.....	21
Tabla I-10. Estudios retrospectivos de Leucemias en infantes y niños en muestras de sangre neonatal: Tarjetas Guthrie.....	22
Tabla I-11. Características generales de los genes involucrados en las translocaciones TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4.....	23
Tabla I-12. Estudios epidemiológicos de caso-control: Asociación de riesgo a Leucemia en infantes y niños; exposición a plaguicidas en la etapa prenatal durante el desarrollo embrionario.....	29
Tabla M-1. Oligonucleótidos utilizados para la (RT)-PCR de las translocaciones estudiadas.....	35
Tabla M-2. Programas utilizados para la amplificación por PCR anidada de las translocaciones.....	35
Tabla R-1. Número de muestras que presentaron amplificación para las translocaciones evaluadas... ..	41
Tabla R-2. Muestras que presentaron amplificación del transcrito de la (s) translocación (es).....	41
Tabla R-3. Características Generales de la Población de Estudio.....	54
Tabla R-4. Concentración de 15 organoclorados (en ng/g de lípidos), y la sumatoria de estos estos, detectada en las madres y neonatos con y sin translocaciones (t) o rearrreglos de MLL (r).....	55
Tabla D-1. Frecuencia de translocaciones cromosómicas, en tejidos fetales y muestras de sangre de neonatos y adultos sanos, detectadas por (RT)-PCR.....	64

FIGURAS

Figura I-1. Duplicación parcial en tándem en el gen MLL que involucra la fusión del exón 6 con el 2.....	11
Figura I-2. Principales marcadores moleculares de la ALL en infantes (<1 año), niños (2-10 años) y adultos.....	12
Figura I-3. Cariotipo de células Malignas.....	12
Figura I-4. Eventos que llevan a la formación de una translocación recíproca.....	13
Figura I-5. Mecanismos principales por los cuales las translocaciones cromosómicas pueden llevar a la leucemogénesis.....	14
Figura I-6. Frecuencia de las anomalías citogenéticas en la ALL en niños.....	15
Figura I-7. Frecuencia de las anomalías citogenéticas encontradas en 478 casos de AML en niños.....	15
Figura I-8. Registro histórico acumulativo de Leucemia concordante en niños gemelos.....	18
Figura I-9. Puntos de rompimiento de la translocación clonotípica <i>TEL-AML1</i> en 4 pares de gemelos.....	19
Figura I-10. Detección de secuencias genómicas fusionadas y clonotípicas de <i>TEL-AML1</i> en “círculos de sangre neonatal” obtenidos de Tarjetas Guthrie (TG) de gemelos.....	22
Figura I-11. Puntos de rompimiento en el intrón 5 de <i>TEL</i> y en los intrones 1-3 de <i>AML1</i> , genes que integran el gen fusionado más común en la Leucemia en niños.....	24
Figura I-12. Mapa de la localización de 18 puntos de rompimiento a lo largo de las regiones intrónicas de <i>AML1</i> y <i>ETO</i>	25
Figura I-13. Mapa de la localización de la región principal donde se agrupan puntos de rompimiento a lo largo de las regiones intrónicas de <i>MLL</i> y <i>AF4</i>	26
Figura I-14. Relaciones potenciales entre los eventos que inducen AL en infantes y niños (prenatales o postnatales), ventanas de exposición críticas y factores de riesgo dependientes de una exposición.....	28
Figura S-1. Control positivo: transcrito de la translocación <i>TEL-AML1</i>	38
Figura S-2. Control positivo: transcrito de la translocación <i>AML1-ETO</i>	39
Figura S-3. Control positivo: transcrito de la translocación <i>MLL-AF4</i>	40
Figura S-4. Muestra M26: Translocación <i>TEL-AML1</i>	42
Figura S-5. Muestra M09: Translocación <i>AML1-ETO</i>	44
Figura S-6. Muestra M10: Translocación <i>AML1-ETO</i>	45
Figura S-7. Muestra B49: Translocación <i>AML1-ETO</i>	46
Figura S-8. Muestra M4: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	47
Figura S-9. Muestra B13: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	48
Figura S-10. Muestra M1: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	49
Figura S-11. Muestra B46: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	50
Figura S-12. Muestra M26: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	51
Figura S-13. Muestra B11: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	52
Figura S-14. Muestra B41: Rearreglo del transcrito de <i>MLL</i>	52
Figura D-1. Detección de rearreglos en el transcrito de <i>MLL</i>	58
Figura D-2. Secuencia del punto de rompimiento de la Translocación <i>TEL-AML1</i> detectada en un par de gemelos con ALL.....	59

RESUMEN

ANTECEDENTES: La Leucemia es un tipo de cáncer que se presenta en una o más células del linaje hematopoyético. En niños menores a 15 años, la Leucemia es el tipo de cáncer más común con una representatividad del 30%. En México se ha reportado una frecuencia general del 45.8%. Diversos estudios han demostrado el origen prenatal de tres de las translocaciones más comunes asociadas a Leucemias Agudas en infantes y niños: MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO. En los últimos años se ha propuesto que la exposición durante el desarrollo embrionario a compuestos tóxicos, como los plaguicidas, puede promover la formación de estos eventos. **OBJETIVO:** Determinar la presencia de las translocaciones MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO en recién nacidos expuestos a plaguicidas organoclorados. **MÉTODOS:** La presencia de los transcritos de las translocaciones antes mencionadas fue evaluada por (RT)-PCR en muestras de linfocitos fijados, obtenidos de cultivos de sangre de cordón umbilical. Como grupo control se evaluaron muestras de las mamás de los neonatos. Las reacciones que presentaron amplificación fueron secuenciadas. Se buscó una correlación con los niveles de plaguicidas. **RESULTADOS:** En 7 bebés se detectó la amplificación del transcrito de una sola translocación, 3 con MLL-AF4 y 4 con AML1-ETO; un bebé presentó los transcritos de MLL-AF4 y de AML1-ETO. Por otra parte, en 6 mamás se encontró la presencia de sólo un rearrreglo, 3 con MLL-AF4, 1 con TEL-AML1 y 2 con AML1-ETO. No hubo concordancia entre madres y neonatos. La secuenciación de los fragmentos amplificados permitió corroborar la presencia de la translocación TEL-AML1 en la muestra materna y de AML1-ETO en 3 de las 7 muestras con esta amplificación (2 maternas y 1 bebé), los otros 4 no pudieron ser secuenciados. En el caso de los transcritos de MLL-AF4, las secuencias no revelaron la presencia de la translocación; sin embargo, en 6 de las 7 muestras se descubrió la presencia de inversiones en el transcrito del gen *MLL*, ésta es la primera vez que se reporta este tipo de daño. No se encontró una asociación entre los niveles de organoclorados con alguno de los rearrreglos evaluados; sin embargo, se observó que la presencia del transcrito de AML1-ETO fue mayor en los neonatos que en las madres. **CONCLUSIONES:** En el presente trabajo se observó la presencia de translocaciones que se han relacionado con Leucemia en niños recién nacidos de madres expuestas a plaguicidas. Sin embargo, aunque sus madres no habían padecido esta enfermedad ni la portaban al momento del nacimiento de sus hijos, inesperadamente ellas también presentaron translocaciones similares, que podrían atribuirse a la exposición crónica a esos compuestos. Esto indica que la presencia de estas translocaciones en adultos no es un indicativo de un incremento en el riesgo a Leucemia, mientras que en niños es necesario realizar un seguimiento.

ABSTRACT

BACKGROUND: Leukemia is a type of cancer that occurs in one or more cell types of the hematopoietic lineage. Leukemia is the most common type of cancer in children under 15 years old, with a 30% representation. Mexico has reported an overall frequency of 45.8%. Several studies have demonstrated the prenatal origin of three of the most common translocations associated with acute leukemia in infants and children: MLL-AF4, TEL-AML1 and AML1-ETO. In recent years it has been proposed that exposure during embryonic development to toxic compound such as pesticides, may promote the formation of these events. **OBJECTIVES:** To determine the presence of MLL-AF4, TEL-AML1 and AML1-ETO translocations in newborns exposed to organochlorine pesticides. **METHODS:** The presence of transcripts of the aforementioned translocations was evaluated by reverse transcription-PCR, in samples recovered from fixed lymphocytes obtained from cultures of cord blood. Maternal samples were evaluated as control group. The reactions showed amplification was sequenced. A correlation was sought with the pesticides levels. **RESULTS:** In 7 infants was detected amplification of the transcript of a one single translocation, 3 with AML-AF4 and 4 with AML1-ETO, one newborn has MLL-AF4 and AML1-ETO transcripts. Moreover, in 6 mothers found the presence of only one rearrangement, 3 with MLL-AF4, 1 with TEL-AML1 and 2 with AML1-ETO. There was no concordance between mothers and infants. Sequencing of the amplified fragments corroborated the presence of TEL-AML1 translocation in the maternal sample and AML1-ETO in 3 of the 7 samples with this amplification (2 maternal and 1 newborn), the other 4 could not be sequenced. In the case of the MLL-AF4 transcripts, the sequences not revealed the presence of the translocation, but in 6 of 7 samples this revealed the presence of inversions in the *MLL* transcript were detected; this is the first time this type of damage is reported. An association between organochlorine levels of exposure and the rearrangements evaluated could not be found, however, we observed that the presence of AML1-ETO transcript was higher in infants that in the mothers. **CONCLUSIONS:** In this study we observed the presence of translocations that have been linked to leukemia in newborns of mothers exposed to pesticides. However, in spite that the mothers had not suffered this disease before or at the time of the birth of the children, they also, unexpectedly showed similar translocations, which could be attributed to chronic exposure to these compounds. It also indicates that the presence of these translocations in adults is not indicative of an increased risk of leukemia, and for the children a follow-up is necessary.

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1.

LEUCEMIA: UNA ENFERMEDAD HEMATO-ONCOLÓGICA

Las enfermedades hemato-oncológicas son aquellas neoplasias que se generan por alteraciones en los mecanismos de la proliferación, de la diferenciación y de la muerte de las células progenitoras hematopoyéticas [1]. Dentro de este grupo se incluyen los Linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, el Mieloma Múltiple, las Leucemias y otras neoplasias malignas no específicas del tejido hematopoyético, todas ellas incluidas en el capítulo II de la décima revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10, por sus siglas en inglés), versión 2007, publicada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) (*Anexo 1*) [2].

La Leucemia está integrada por un grupo heterogéneo de desórdenes malignos que involucran a las células sanguíneas [3] por lo que, en general, es definida como un “tipo de cáncer causado por la proliferación irregular e incontrolable de una o más clonas mutantes del linaje hematopoyético” [4] y cuyas células malignas pueden o no encontrarse arrestadas en un estado temprano de diferenciación [3].

FRECUENCIA DE LA LEUCEMIA EN POBLACIÓN GENERAL VS. FRECUENCIA DE LA LEUCEMIA PEDIÁTRICA

A nivel mundial, en el 2008 la Leucemia ocupó el 11º lugar de todos los casos de cáncer reportados (*Anexo 2-A*). En ese año México se ubicó en el 12º puesto dentro de los países con mayor número de reportes nuevos de Leucemia (*Anexo 2-B*). A nivel nacional, este grupo de neoplasias ocupó el 8º lugar general en 2008 y el 1º dentro de las enfermedades hemato-oncológicas (*Anexo 2-C*) [5]. En el 2002 se habían reportado 2,837 casos nuevos en el grupo de las Leucemias [1], número que para el 2008 se vio casi duplicado con 6,105 casos [5].

Estos números cambian cuando se evalúan los casos nuevos de cáncer por grupos de edad de forma tal que, la frecuencia con la que se presentan los distintos tipos de cáncer en los infantes y niños difiere de la de los adultos. En éstos últimos sobresalen, dentro de los primeros lugares en incidencia, los tipos de cáncer asociados con el nivel económico de la población afectada (cáncer cervicouterino y cáncer de mama), con los hábitos alimenticios (cáncer colorectal y cáncer de estómago), con diversos factores de riesgo (cáncer de pulmón por exposición al humo de cigarro y cáncer de hígado asociado al virus de la Hepatitis B), así como con factores asociados a la edad (el cáncer de próstata es más frecuente en adultos mayores que en adultos jóvenes) [6, 7]. Sin embargo, en infantes y niños este patrón cambia totalmente. En estos grupos de edad, la Leucemia el tipo de cáncer más común –con una representatividad aproximada del 30% del cáncer en general– seguidas por los Linfomas y los Tumores en el Sistema Nervioso Central (Tabla I-1) [8-14].

Como consecuencia de esta diferencia, los distintos tipos de cáncer en niños se agrupan de forma diferente para su estudio. La Clasificación Internacional del Cáncer en Niños (ICCC, por sus siglas en inglés) es la encargada de esta división con base en la morfología de los tumores, y no con el lugar primario de origen como en adultos, presentando así un total de 12 grupos (*Anexo 3*) [15].

Tabla I-1. Distribución en porcentaje de las neoplasias malignas en el grupo de edad de 0-18 años . Modificado de Rivera [14].

Neoplasia	México*	Estados Unidos	China	Japón	Cuba
Leucemia	34.4	30.7	38.2	40.6	30.4
SNC	10.0	18.0	21.7	14.8	14.4
Linfomas	19.5	13.1	10.3	6.8	23.9
SNP	2.7	7.8	0	9.5	0
Renales	5.6	5.6	2.1	4.8	6.2
SPB	4.8	6.6	2.9	3.4	4.3
Otros	23	18.2	24.8	20,1	20.8

* En México se reporta un 8.5% de Retinoblastoma. SNC, Sistema Nervioso Central; SNP, Sistema Nervioso Periférico; SPB, Sarcoma de Partes Blandas.

Clasificación de la Leucemia

Actualmente, la Leucemia se clasifica en cuatro tipos principales con base en dos características generales: el tipo celular afectado y el curso médico que toma la enfermedad (Tabla I-2) [3, 16].

- a) DE ACUERDO CON EL TIPO CELULAR AFECTADO. Se reconocen dos grupos principales: la Leucemia Linfoblástica y la Leucemia Mieloide. Se le denomina Leucemia Linfoblástica o Linfocítica cuando la clona maligna proviene del tipo celular que da origen a los linfocitos (origen linfoide) y Leucemia Mieloide o Mielógena, cuando proviene del tipo celular del que se originan los glóbulos rojos, los glóbulos blancos granulocíticos y las plaquetas (origen mieloide) [17, 18].
- b) DEPENDIENDO DE SU CURSO MÉDICO. La tasa de progresión de la enfermedad y la forma en que las células reemplazan a las células sanguíneas y medulares normales son diferentes en cada tipo de Leucemia. En las AL la célula leucémica original continúa formando células leucémicas que son descritas como “no funcionales” debido a que no se comportan como las células normales; este tipo de células jóvenes, conocidas como “linfoblastos” o “mieloblastos” (también llamados indistintamente “blastos”), desplazan a las células normales en la médula ósea y, a su vez, esta acción provoca la disminución en el número de células nuevas normales producidas en la médula, lo que conlleva a una reducción en el conteo de glóbulos rojos (anemia). Dependiendo del tipo celular, se subclasifican con base en la morfología de la célula, punto en el que se ahondará más adelante. Este grupo de Leucemias se caracteriza por presentar una rápida progresión sin tratamiento. En las *Leucemias Crónicas* se presentan muy pocos o ningún blasto, debido a que las células afectadas son células maduras, no jóvenes, y generalmente avanza lentamente en comparación con las AL. En este grupo, la forma en que se desencadena el cáncer depende del origen celular. En la Leucemia Mieloide Crónica (CML, por sus siglas en inglés) la célula leucémica produce células sanguíneas que funcionan de forma similar a las células normales; sin embargo, la cantidad de glóbulos rojos es generalmente inferior a lo normal provocando anemia, caso contrario al de los glóbulos blancos que, a pesar de que su funcionamiento es casi normal, su número se va incrementando continuamente ocasionando que el flujo sanguíneo se desacelere, agravando así la anemia. En la Leucemia Linfocítica Crónica (CLL, por sus siglas en inglés), de la célula leucémica se origina una cantidad exagerada de linfocitos no funcionales que reemplazan a

las células normales en la médula y los nódulos linfáticos e interfieren con su trabajo, debilitando la respuesta inmune; por otra parte, la alta cantidad de células leucémicas en la médula puede desplazar a las células del linaje mieloide lo que provoca una caída del conteo de glóbulos rojos y blancos (neutrófilos), así como de plaquetas [17].

Tabla 1-2. Clasificación de la Leucemia de acuerdo con el tipo celular involucrado. Fuente: Howard y Hamilton [3] y Hoffbrand y cols. [16].					
Leucemia Linfoide	Leucemia Linfoblástica Aguda: subdividida en 8 tipos con base en su morfología. Leucemia Linfoblástica Crónica. Se subdivide con base en el tipo celular involucrado (células T y B).				
Leucemia Mieloide	Leucemia Mieloide Aguda: Subdividida con base en su morfología o en su expresión celular de antígenos de superficie. Leucemia Mieloide Crónica. Se subdivide con base en la presencia/ausencia del cromosoma Filadelfia.				
Otros tipos:	<table border="0"> <tr> <td>Células B:</td> <td>Leucemia Prolinfocítica-B, Leucemia de Células Pilosas, Leucemia de Células Plasmáticas. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma Folicular, Linfoma Esplénico con Linfocitos Vellosos, Linfoma de Células del Manto, Linfoma no Hodgkin Linfoplasmácito.</td> </tr> <tr> <td>Células T:</td> <td>Leucemia Linfocítica Granular de Células Grandes, Leucemia Prolinfocítica-T, Leucemia de Células de Sezary. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma/Leucemia de células T en adultos, Síndrome de Sezary, Linfoma no Hodgkin de Células T</td> </tr> </table>	Células B:	Leucemia Prolinfocítica-B, Leucemia de Células Pilosas, Leucemia de Células Plasmáticas. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma Folicular, Linfoma Esplénico con Linfocitos Vellosos, Linfoma de Células del Manto, Linfoma no Hodgkin Linfoplasmácito.	Células T:	Leucemia Linfocítica Granular de Células Grandes, Leucemia Prolinfocítica-T, Leucemia de Células de Sezary. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma/Leucemia de células T en adultos, Síndrome de Sezary, Linfoma no Hodgkin de Células T
Células B:	Leucemia Prolinfocítica-B, Leucemia de Células Pilosas, Leucemia de Células Plasmáticas. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma Folicular, Linfoma Esplénico con Linfocitos Vellosos, Linfoma de Células del Manto, Linfoma no Hodgkin Linfoplasmácito.				
Células T:	Leucemia Linfocítica Granular de Células Grandes, Leucemia Prolinfocítica-T, Leucemia de Células de Sezary. Síndromes Linfoma/Leucemia: Linfoma/Leucemia de células T en adultos, Síndrome de Sezary, Linfoma no Hodgkin de Células T				

Partiendo del curso médico, se ha visto que el número de casos nuevos registrados por grupo de edad es distinto. La incidencia de las Leucemias Crónicas es casi nula en niños y más aún en infantes, caso contrario es la incidencia de este grupo de Leucemias en los adultos, en los que se observa un incremento gradual teniendo un pico máximo en personas con 80 años o más [19, 20]. Por otra parte, a diferencia del tipo crónico, las Leucemias Agudas tienen una incidencia importante en infantes y niños (menores de 15 años), la cual varía según el tipo celular involucrado como anteriormente se mencionó: la Leucemia Linfoblástica Aguda se presenta en cerca del 80% de los casos, mientras que la Leucemia Mieloide Aguda representa el otro 20% aproximadamente [21, 22]. Dado que el presente trabajo tiene como grupo de estudio a neonatos, de ahora en adelante se hará referencia sólo a las Leucemias Agudas (AL, por sus siglas en inglés) en infantes y niños por su alta representatividad en estos grupos de edad, no obstante, en el *Anexo 4* se encuentra la clasificación de las Leucemias Crónicas.

Leucemias Agudas en Infantes y Niños

Las Leucemias Agudas, divididas en Linfoblástica (ALL por sus siglas en inglés) y Mieloide (AML por sus siglas en inglés), son definidas patológicamente como *Leucemias de blastos* o *neoplasias malignas de células hematopoyéticas inmaduras*, en donde más del 30% de las células en la médula ósea son blastos leucémicos. Éstos pueden ser identificados mediante un análisis morfológico, citoquímico y, en algunas ocasiones, por reactivos inmunológicos (por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales, McAb), análisis citogenéticos y raramente por microscopía electrónica o técnicas de biología

molecular –como los estudios en genes que tienen rearrreglos para identificar características particulares –. Esto es importante debido a que tanto la etiología de la enfermedad como la respuesta a la terapia varían de acuerdo al tipo de blasto que está involucrado en el proceso de leucemogénesis [16].

Actualmente, para las AL se ha propuesto la clasificación MIC (morfológica, inmunológica y citogenética), que busca integrar las tres clasificaciones ya existentes, y que sólo se enfocan en una característica particular de la célula leucémica:

1. LA MORFOLOGÍA DE LA CÉLULA LEUCÉMICA: Clasificación propuesta por un grupo de terminólogos de Francia, Estados Unidos e Inglaterra, la FAB (French-American-British). Con base en la estructura morfológica de las células (núcleo, nucléolo, citoplasma y vacuolas) se divide a la ALL en tres grupos, L1, L2 y L3, mientras que a la AML en 8 grupos: M0-M7 (*Anexo 5*).
2. LA EXPRESIÓN CELULAR DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE: Utilizando técnicas de inmunología se pueden detectar antígenos de superficie que permiten conocer el estado de maduración de las células. En la ALL la identificación de marcadores de membrana permite diferenciar entre el linaje B y el linaje T; esta clasificación no correlaciona con la clasificación morfológica con excepción del tipo poco común L3. También permite identificar tipos pocos frecuentes de AML, como el M0 (Leucemia Mieloide Indiferenciada) y el M7 (Leucemia Megaloblástica) (*Anexo 6*).
3. EL CARIOTIPO CELULAR. La integración de esta característica se debe a que se ha encontrado la asociación de algunas translocaciones cromosómicas y otros rearrreglos cromosómicos con tipos específicos de AL y que, dadas las características particulares que presentan, se cree pueden servir para desarrollar mejores tratamientos (*Anexo 7-A*).

Así, la clasificación MIC fue elaborada con base en la alta correlación existente entre la presencia de translocaciones cromosómicas y las características citoquímicas en la AML, o bien, entre estas dos características y los casos definidos por inmunología en la ALL (Tabla 1-3) [16].

Finalmente, otra forma de clasificar a las AL es de acuerdo a la edad del paciente. Un primer grupo está integrado por los adultos (mayores de 18 años) y dentro del cual existe un subgrupo integrado por adultos cuya edad es mayor a los 60 años; esto se debe a que la respuesta de estas personas a los tratamientos establecidos es inferior al resto de los pacientes y porque no son considerados como candidatos para el trasplante de médula ósea autóloga o alogénica [16]. El segundo grupo de edad está conformado por todos los pacientes menores de 18 años (Leucemias pediátricas); sin embargo, tomando en cuenta las características clínicas y moleculares –tema que será retomado más adelante– se pueden clasificar las AL en Leucemias en infantes (<1año), Leucemias en niños (1 a <15 años) y Leucemias juveniles; éste último es integrado a los adultos [23]. Para efectos de este trabajo, es de interés el estudio de los dos primeros subgrupos de las Leucemias pediátricas y, por este motivo, los siguientes temas se centrarán prioritariamente en las Leucemias en infantes y en niños.

Tabla I-3. Clasificación MIC para Leucemias Agudas. Modificado de Hoffbrand y cols. [16].

Categoría de la enfermedad	Morfología (FAB) ^a	Inmunología ^a	Cariotipo
Linfoblástica (ALL) del linaje de células B^b			
ALL de células tempranas precursoras de linfocitos B	L1, L2	TdT ⁺ CD19 ⁺ , CD10 ⁻	t(4;11) t(9;22)
ALL común	L1, L2	TdT ⁺ CD19 ⁺ , CD10 ⁺	6q ⁻ casi haploide o del(12p) t(9;22)
ALL de células pre-B	L1	TdT ⁺ CD19 ⁺ , C μ lg	t(1;19) t(9;22)
ALL de células B	L3	TdT ⁻ CD19 ⁺ , Smlg ⁺	t(8;14) t(2,8) t(8;22); 6q ⁻
Linfoblástica (ALL) del linaje de células T^b			
ALL de células tempranas precursoras de linfocitos T	L1, L2	TdT ⁺ CD2 ⁻ , CD7 ⁺	t o del(9p)
ALL de células T	L1, L2	TdT ⁺ CD2 ⁺ , CD7 ⁺	t(11;14), 6q ⁻
Leucemia mieloide aguda (AML)^c			
	Subtipos^d		
AML sin maduración	AML-M1 con trombocitosis	---	inv(3)
	AML-M1	---	t(9;22)
AML con maduración	AML-M2	---	t(8;21)
Leucemia Promielocítica Aguda	AML-M3	---	t(15;17)
AML con maduración o Leucemia Mielomonocítica	AML-M2 o M4 con basofilia	---	t(6;9), t(12p)
Leucemia Mielomonocítica	AML-M4Eo	---	inv(16)
Leucemia Monocítica Aguda	AML-M5a	---	t(11q23)
	AML-M5b con fagocitosis	---	t(8;16)

a. La morfología y los análisis inmunológicos detallados del inmunofenotipo de ALL y AML se encuentran en el Anexo 2

b. Primer Grupo de Estudio Cooperativo MIC (1986).

c. Segundo Grupo de Estudio Cooperativo MIC (1988).

d. En el caso de AML, algunos subtipos de la clasificación de la FAB han sido asociados con translocaciones,

e. No hay anticuerpos específicos asociados.

Frecuencia de las Leucemias Agudas en Infantes y Niños (0 a <15 años)

Como se comentó anteriormente, la frecuencia con la que se presentan las Leucemias Agudas cambia dependiendo del tipo celular involucrado. Sin embargo, para reportar el número de casos de cáncer en infantes y niños se utiliza la ICCC, como se mencionó anteriormente. En su tercera edición (ICCC-3), las Leucemias se encuentran en el grupo I, dividido a su vez en los subgrupos de Leucemias Linfoides (Ia), Leucemias Mieloides Agudas (Ib), Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas (Ic) y los tipos no específicos o combinados (Ie). A diferencia de la clasificación presentada por la ICD-10, en el subgrupo Ia se encuentran integradas las Leucemias Linfoblásticas Crónicas (M-9823), pues al ser extremadamente raras en los niños, las tasas de la ALL no se ven afectadas (*Anexo 3*) [15].

Como se mencionó anteriormente, la Leucemia, a nivel mundial, ocupa el primer lugar de cáncer en niños de entre 0 y <15 años, lo que representa aproximadamente el 30% de todos los casos de cáncer registrados anualmente en este rango de edad. Además, tomando en cuenta la clasificación de la ICCC-3, el subgrupo de la Leucemias Linfoides es el que se presenta con mayor frecuencia representando aproximadamente el 80% de los casos seguido por el subgrupo de las AML con más o menos el 15% de los reportes (Tabla I-4).

Tabla I-4. Frecuencia de Leucemia, de Leucemia Linfóide (LL) y de Leucemia Mieloide Aguda (AML) en niños de 0 a <15 años. Clasificación con base en la ICCC-3. Fuente: Steliarova-Fouchery y cols. [15].

País	No. Casos de Leucemia (% *)	No. Casos de LL (%**)	No. Casos de AML (%**)	Periodo	Fuente
Países Nórdicos	882 (---)	723 (81.97)	159 (18.03)	1997(8)-2001 ³	Hjalgrim y cols. [24]
México (5 regiones) ^a	903 (46.14)	715 (79.18)	163 (18.05)	1996-2002	Fajardo-Gutiérrez y cols. [13]
México (5 regiones) ^a	294 (44.68)	243 (82.65)	43 (14.63)	1998-2000	
Bielorrusia	408 (22.76)	226 (82.35)	57 (13.97)	1993-1997	ACCIS [9]
Dinamarca	205 (28.63)	163 (79.51)	30 (14.63)	1993-1997	
Estonia	51 (25.37)	39 (76.47)	7 (13.72)	1993-1997	
Finlandia	254 (30.70)	212 (83.46)	30 (11.81)	1993-1997	
Francia (8 regiones)	687 (29.75)	523 (76.13)	126 (18.34)	1993-1997 ¹	
Alemania	2972 (34.10)	2474 (83.24)	439 (14.77)	1993-1997	
Hungría	344 (27.70)	283 (82.27)	43 (12.05)	1993-1997	
Islandia	8 (16.67)	7 (87.50)	0 (0.00)	1993-1997	
Irlanda	127 (29.20)	104 (81.89)	19 (14.96)	1994-1997	
Italia (4 regiones)	278 (31.95)	232 (83.45)	42 (15.11)	1993-1997 ²	
Países Bajos	335 (28.56)	270 (80.60)	47 (14.03)	1993-1995	
Noruega	184 (28.75)	141 (76.63)	32 (17.39)	1993-1997	
Eslovaquia	201 (27.05)	168 (83.58)	21 (10.45)	1993-1997	
Eslovenia	57 (23.27)	52 (91.23)	5 (8.72)	1993-1997	
España	182 (25.93)	147 (80.77)	26 (14.29)	1993-1995	
Suiza (2 regiones)	32 (25.6)	25 (78.13)	5 (15.63)	1993-1997	
Turquía (1 región)	116 (34.94)	92 (79.31)	17 (14.66)	1993-1996	
Inglaterra y Gales	1236 (31.54)	1006 (81.39)	19 (15.37)	1993-1995	
Irlanda del Norte	74 (33.33)	55 (74.32)	11 (14.86)	1993-1996	
Escocia	221 (35.14)	184 (83.26)	30 (13.57)	1993-1997	
Australia	207 (33.5)	159 (76.72)	34 (16.42)	1997-2006	Blade y cols. [10]
Cuba	284 (30.84)	204 (71.83)	40 (14.08)	2001-2003	Torres y cols. [12]
Estados Unidos	13,396 (32.43)	10,121 (75.55)	2,092 (15.62)	2002-2006	USCS [25]

*Porcentaje del total de casos de cáncer. ** Porcentaje del total de casos de Leucemia.

1. Periodo 1993-1996 en tres regiones. 2. Periodo 1993-1996 en una región. 3. Periodo 1997-2001 en Leucemia Linfóide y 1998-2001 en Leucemia Mieloide Aguda.

a. Clasificación con base en la primera edición de la ICCC.

La Leucemia en México, al igual que en otros países, representa aproximadamente el 34.4% de todos los casos de cáncer reportados en infantes y niños [26]. Se ha reportado una alta incidencia de ALL en el Distrito Federal, así como en los estados de Puebla, Jalisco y Nuevo León, valores que se cree puedan estar relacionados al hecho de que se tratan de centros de referencia de muchas zonas geográficas aledañas. Por otra parte, en el caso de la AML (anteriormente Leucemia no Linfoblástica Aguda) se ha detectado una incidencia relativamente mayor en ciudades como el Distrito Federal, Guadalajara, Monterrey y Puebla, datos que pueden asociarse a que posiblemente en dichas zonas el diagnóstico es más preciso [14]. Sumado a lo anterior, en 2007, Fajardo-Gutiérrez y cols. [13] con base en la primera clasificación del ICCO y con fuente en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reportaron el número de casos de Leucemia Linfoblástica Aguda y de Leucemia no Linfoblástica Aguda (actualmente Leucemia linfocítica y Leucemia Mieloide Aguda, respectivamente) que se presentaron en 10 entidades del país evaluadas en dos periodos de tiempo, el primero entre los años 1996 y 2002 y, el segundo, entre 1998 y 2000 (Tabla I-5). En su reporte, la Leucemia ocupó el primer lugar en los diez estados con porcentajes que fueron desde el 31.6% (Nuevo León) hasta el 51.4% (Estado de México) del total de casos de cáncer en niños, y, en particular, la Leucemia Linfoblástica aguda se presentó con mayor frecuencia variando desde un 68.5% (Chiapas) hasta un 94.6% (Nuevo León) de los casos de Leucemia, mientras que la Leucemia no Linfoblástica Aguda se encontró con frecuencias entre el 5.4% (Nuevo León) y el 29.6% (Chiapas).

Tabla I-5. Número de casos nuevos de Leucemia y sus subtipos principales en diez estados de México. Fuente: Fajardo-Gutiérrez y cols [13].

Estado	Frecuencia de Leucemia	Frecuencia de Leucemia Linfoblástica Aguda	Frecuencia de Leucemia no Linfoblástica Aguda
Periodo: 1996-2002			
Chiapas	54 (37.8%)	37 (68.5%)	16 (29.6%)
Ciudad de México	321 (43.7%)	249 (77.6%)	58 (18.1%)
Guerrero	43 (34.4%)	35 (81.4%)	7 (16.3%)
Estado de México	431 (51.4%)	352 (81.7%)	70 (16.3%)
Morelos	54 (46.2%)	42 (77.7%)	12 (22.3%)
Periodo: 1998-2000			
Jalisco	97 (50.8%)	78 (80.3%)	16 (16.5%)
Nuevo León	56 (31.6%)	53 (94.6%)	3 (5.4%)
Puebla	56 (49.1%)	48 (85.7%)	8 (14.3%)
Veracruz	60 (48.0%)	46 (76.7%)	11 (18.3%)
Yucatán	25 (49.0%)	18 (72.0%)	5 (20.0%)

CAPÍTULO 2.

ANORMALIDADES GENÉTICAS EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS EN INFANTES Y NIÑOS

Con el empleo de la genética molecular, se han analizado los cambios específicos en las Leucemias a este nivel. Su estudio ha permitido encontrar diversas anormalidades genéticas que, a su vez, han ayudado a determinar la patobiología de la enfermedad mejorando así el diagnóstico y, sobre todo, el detectar algunas de estas anormalidades cromosómicas ha sido de vital importancia para el desarrollo de terapias más efectivas [27, 28]. La citogenética estándar permite identificar anormalidades cromosómicas clonales en al menos 70-80% de los casos diagnosticados de Leucemia [28] y, con ello, se ha podido reafirmar el hecho de que las Leucemias son un grupo de enfermedades biológicamente diverso. Algunas de estas alteraciones genéticas pueden ser a nivel molecular o a nivel cromosómico, siendo algunas de ellas la sustitución de un nucleótido, deleciones, inversiones, duplicaciones, cambios en el número cromosómico (hiperdiploidía o hipodiploidía) y translocaciones cromosómicas; todas presentes con mayor o menor frecuencia en el grupo de las Leucemias Agudas en infantes y niños [28,29].

- a) SUSTITUCIÓN DE UN NUCLEÓTIDO. Mutación a nivel molecular en donde un par de nucleótidos en la doble cadena de DNA es remplazado con un par diferente. Por ejemplo, en una sustitución $A \mapsto G$, la A es cambiada por una G en una de las hebras de DNA provocando una reparación de desapareamiento de bases G-T; por lo que, en la siguiente replicación, el desapareamiento es resuelto como un par de bases G-C (mutante) en una molécula hija y un par A-T (no mutante) en la otra. Este tipo de mutación puede dividirse en dos subtipos: transiciones y transversiones. El primer subtipo involucra el cambio de una purina por otra purina ($G \mapsto A$ o $A \mapsto G$), o bien, una pirimidina por otra pirimidina ($T \mapsto C$ o $C \mapsto T$). En el segundo subtipo, una pirimidina reemplaza a una purina (T o $C \mapsto A$ o G) o viceversa (A o $G \mapsto T$ o C) [29]. El cambio en una base de la secuencia de ciertos oncogenes puede predisponer a la Leucemia. Este tipo de daño se ha observado en el oncogén *c-ras* –que codifica para una proteína vital en la transducción de señales– y que se encuentra en el 50% del total de casos de AML [3].
- b) DELECCIONES. También conocidas como deficiencias, son la pérdida de un segmento del material genético que puede ir desde unos pocos pares de bases (generalmente de 1 a 6), hasta la eliminación de genes enteros o parte de un cromosoma, por lo que tiende a ser un evento peligroso para la célula. Una deleción (del) es letal cuando involucra un gran fragmento del cromosoma, aun cuando el cromosoma homólogo no esté alterado. A diferencia de ello, una deleción pequeña puede ser viable cuando el cromosoma homólogo no ha sido afectado y éste puede suplir los productos génicos que son requeridos para la supervivencia de la célula [30]. La deleción del brazo corto del cromosoma 12 –del(12p)– puede presentarse en algunos casos de ALL común, mientras que la deleción del brazo corto del cromosoma 9 –del(9p)– es característica en casos de la ALL de células tempranas precursoras de linfocitos T [3].
- c) INVERSIONES. Una inversión (inv) se produce cuando un segmento de un cromosoma es cortado, girado e insertado de nuevo en el cromosoma ocasionando que la orientación del segmento dentro del cromosoma quede en el sentido opuesto. Debido a que las inversiones son rearrreglos balanceados no alteran la cantidad del material genético y no generan un desbalance génico [31]. En niños, es común la inv(16) asociada al subtipo AML-M4E0; ésta (al igual que otras inversiones presentes en otros tipos de AML) tiene la particularidad de generar un nuevo gen fusionado que

codifica para una proteína quimérica, como si se tratara de un evento de translocación: *CBFβ-MYH11* –inv(16)/t(16;16)(p13;q22)– [28, 31].

- d) **DUPLICACIONES.** Los procesos de mutación en un cromosoma algunas veces producen una copia extra de una región del cromosoma, generando así una duplicación. Se le llama duplicación en tándem cuando las regiones duplicadas se encuentran adyacentes la una de la otra, y duplicación insertada cuando una copia extra se encuentra en cualquier lugar del genoma (Figura I-1) [32, 33]. En diversos casos de ALL, pero principalmente, de AML en niños se ha detectado la presencia de duplicaciones en tándem parciales del gen *MLL* que involucran la fusión del exón 5, 6 u 8 con el exón 2 [34-38], del exón 9 o 10 con el exón 3 [39] y, en un reciente estudio, la fusión del exón 11 con el 10 [40].

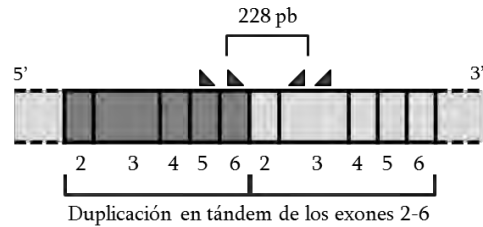


Figura I-1. Duplicación parcial en tándem en el gen *MLL* que involucra la fusión del exón 6 con el 2 (fusión del exón 6/2). Modificado de Caligiuri y cols. [33].

- e) **CAMBIOS EN EL NÚMERO CROMOSÓMICO.** El cambio en el número de cromosomas lleva a la pérdida o ganancia de material genético. En el caso de las Leucemias, la pérdida de un cromosoma (monosomía) está generalmente asociado con un pronóstico adverso debido a la pérdida de genes supresores de tumores; sin embargo, una ganancia total de material genético (trisomía o polisomía) está asociada con un pronóstico más favorable. Estas aberraciones numéricas son más frecuentes en la ALL que en la AML. En la ALL este tipo de eventos se encuentra restringido a los subtipos de la FAB L1 y L2 (en donde se han detectado aproximadamente en el 50% de los casos con cambios clonales) y, en el caso del subtipo L3, tiende a presentarse una pseudodiploidía [27]. Aproximadamente el 20% de los niños con ALL presentan hiperdiploidía (>50 cromosomas), mientras que sólo el 1% refleja un cariotipo hipodiploide (<46 cromosomas) [41]. Caso contrario, en pacientes con AML, es más común detectar trisomías (generalmente en los cromosomas 8 o 21) o bien, monosomías (afectando con mayor frecuencia al cromosoma 7) [42].
- f) **TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS.** Son aberraciones cromosómicas que resultan de la inserción de un fragmento de cromosoma en otro. Las translocaciones (t) pueden formarse por el intercambio de fragmentos de dos cromosomas rotos o por recombinación ectópica entre las copias de secuencias de DNA repetidas presentes en dos cromosomas no homólogos [30], aunque no es necesario que ambos cromosomas reciban el fragmento del otro. La primera translocación descubierta es la t(9;22), también conocida como “Cromosoma Filadelfia” (abreviado Ph1), que involucra un intercambio entre el cromosoma 9 con el 22. En niños, si bien esta translocación se detecta en algunos casos de ALL, en este grupo de Leucemias es más común la presencia de la t(12;21) [41]. En AML, algunas de las translocaciones más comunes son la t(821) y la t(15;17) [42]. Particularmente en el caso de las Leucemias Agudas en infantes, se ha observado una alta frecuencia de translocaciones que involucran particularmente al cromosoma 11 [43].

De entre todas las alteraciones cromosómicas que anteriormente se enlistaron, las translocaciones son los eventos de mayor relevancia entre las Leucemias debido a que (1) son la alteración citogenética que se presenta con mayor frecuencia y (2) a su asociación con el proceso de leucemogénesis [27-29, 31, 41-49].

ASOCIACIÓN ESPECÍFICA ENTRE CIERTAS ANORMALIDADES GENÉTICAS Y SUBTIPOS PARTICULARES DE LEUCEMIA

Además de permitir un mejor diagnóstico y diseñar nuevas terapias, la identificación de estas anomalías genéticas es de importancia debido a que ha permitido encontrar una asociación estrecha entre algunos de estos eventos con subtipos particulares de Leucemias. En las Leucemias Linfoblásticas Agudas, algunas anomalías genéticas se presentan de forma distinta entre los grupos de edad (Figura I-2), lo que ha ayudado a explicar las diferencias significativas entre el progreso de la enfermedad en infantes (menores de un año de edad), en niños de 2 a 10 años y en adultos [29]. En las Leucemias Mieloides Agudas también se presenta un espectro de diversidad molecular que, aunque no diferencia a las AML por grupo de edad, permite diferenciarlas por subtipos, de modo que ciertas translocaciones cromosómicas e inversiones que generan translocaciones han sido incorporadas en la clasificación de la WHO como un criterio para la subclasificación de las AML, incluida $t(8;21)$, $t(15,17)$, $inv(16)/t(16;16)$ o rearrreglos en 11q23, sin importar la morfología o el porcentaje de los blastos [28, 50]. Gracias a toda la información que se ha ido obteniendo, en 2008 se integraron nuevos subtipos de Leucemia asociadas a translocaciones específicas (*Anexo 7-B*) [51].

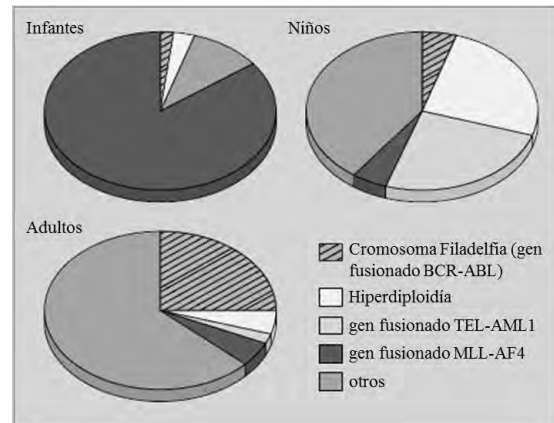


Figura I-2. Principales marcadores moleculares de la ALL en infantes (<1 año), niños (2-10 años) y adultos. Modificado de Greaves [29].

PARTICIPACIÓN DE ANORMALIDADES GENÉTICAS ESPECÍFICAS EN EL PROCESO DE LEUCEMOGÉNESIS: TRANSLOCACIONES RECÍPROCAS Y BALANCEADAS

La identificación de alteraciones genéticas particulares ha favorecido un mejor conocimiento dentro de la tumorigénesis de la enfermedad, como la interacción y expresión tiempo-dependiente de productos génicos que gobiernan la supervivencia y función celular [27]. Por otra parte, lo interesante de estos eventos es la forma en la que se presentan dentro de las células leucémicas. Los análisis citogenéticos han revelado la presencia de una sola anomalía genética (generalmente una translocación balanceada), en comparación con otros tipos de cáncer, por ejemplo, los tumores epiteliales que presentan un patrón complejo de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Figura I-3) [44]. En la Leucemia, muchas de las

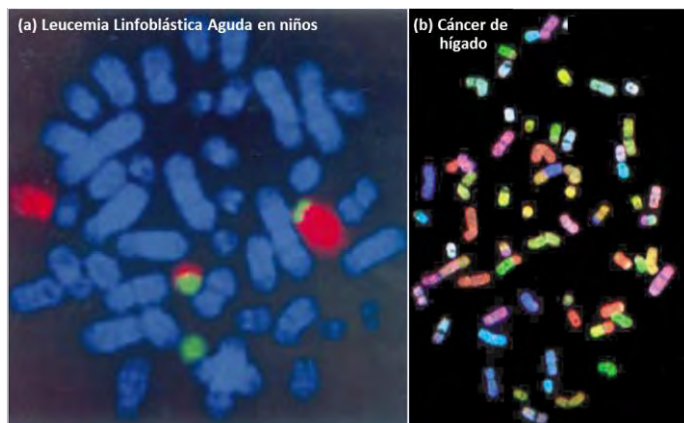


Figura I-3. Cariotipo de células malignas. (a) Prueba de FISH: El cariotipo de una célula de leucemia linfoblástica aguda en niños muestra la $t(12;21)$, única anomalía detectable. Cromosoma 12 en rojo y cromosoma 21 en verde. Fuente: Greaves [29]. (b) El cariotipo espectral de un carcinoma de hígado muestra numerosas anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Fuente: Aplan [44].

translocaciones cromosómicas recurrentes son recíprocas, estables y/o balanceadas a un nivel citogenético y frecuentemente se presentan con un mínimo de anomalías genéticas [27, 42]. Como consecuencia de la constante asociación de translocaciones específicas con subtipos de Leucemia, se fortalece la hipótesis de que estas translocaciones cromosómicas, eventos no al azar y clonales, participan en el inicio de la etiopatogénesis de los subtipos de Leucemias asociados a ellas [28, 44].

Como se comentó anteriormente, las translocaciones que se presentan en la Leucemia tienen la particularidad de ser recíprocas, estables y balanceadas. Se les llama recíprocas porque el evento de translocación se da entre dos cromosomas que se fragmentan simultáneamente e intercambian el fragmento desprendido (Figura I-4), estables porque no alteran la estructura molecular del cromosoma, y balanceadas porque no hay pérdida ni ganancia de material genético total.

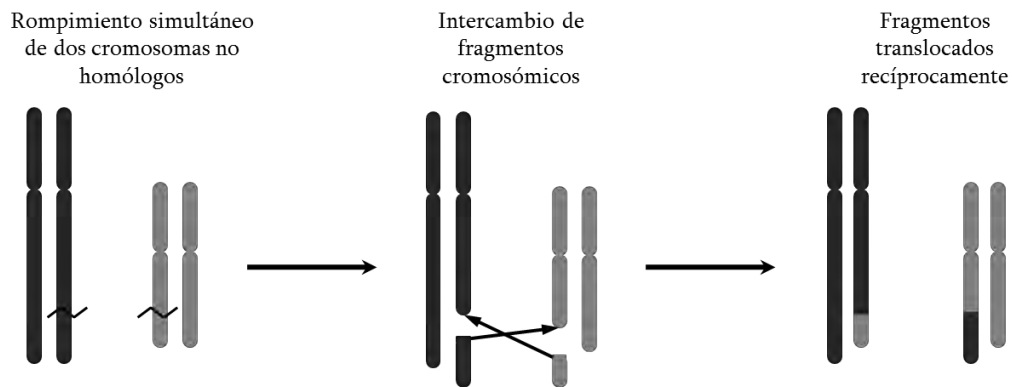


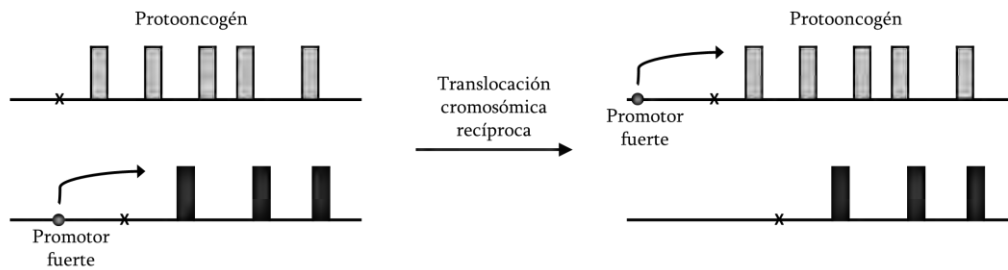
Figura I-4. Eventos que llevan a la formación de una translocación recíproca.

En general, las translocaciones pueden producir uno de dos eventos principales a nivel molecular que pueden llevar a la transformación maligna de una célula: la expresión no programada del producto génico de un protooncogén o bien, la generación de nuevos genes fusionados.

- a. **EXPRESIÓN NO PROGRAMADA DEL PRODUCTO GÉNICO DE UN PROTOONCOGÉN.** La inserción de secuencias reguladoras o de elementos potenciadores en un protooncogén normal, como consecuencia de un evento de translocación, puede provocar que la expresión de dicho gen se vea alterada (Figura I-5a) [27,44]. Por ejemplo, en la $t(1;14)(p32;q11)$, presente en aproximadamente el 25% de los casos en niños de ALL de células precursoras de linfocitos T [43], los elementos regulatorios del gen de Leucemia en células troncales, *SCL* (por sus siglas en inglés), son reemplazados por las secuencias reguladoras del gen *SIL* (por sus siglas en inglés) lo que promueve la transcripción de *SCL* [44,45].
- b. **GENERACIÓN DE NUEVOS GENES FUSIONADOS.** Para que se originen nuevos genes quiméricos a partir de un evento de translocación se deben de cumplir dos condiciones: la primera es que el rompimiento de los cromosomas se produzca dentro de los genes, en una región intrónica; la segunda es que se conserve el marco de lectura de los genes involucrados una vez que se llevó a cabo la translocación (Figura I-5b) [28]. Una de las particularidades de estos nuevos genes

quiméricos es que pueden codificar para una proteína híbrida cuyas propiedades se encuentran alteradas, presentando usualmente una actividad cinasa incrementada o un nuevo regulador transcripcional [45, 46]. En la Leucemia, este tipo de eventos es el más común y tiende a involucrar principalmente a tirosinas cinasas como *ABL*, que son importantes reguladores de la proliferación celular, y a factores de transcripción (ejemplo, *AML1*), que son relevantes para la diferenciación hematopoyética [47-49]; sin embargo, también se ven comprometidos factores de crecimiento (*IL3*) o sus receptores (*TANI*) (*Anexo 8*), por lo que, de acuerdo a la función de los genes blanco, las translocaciones cromosómicas pueden agruparse en siete subgrupos: (1) translocaciones asociadas al gen *MLL*, (2) inversiones/translocaciones asociadas a *TEL* (o *ETV6*) y *CBF* (*AML1* (o *CBFA*) y *CBFB*), (3) translocaciones asociadas a *RARA*, (4) translocaciones asociadas a *E2A*, (5) translocaciones asociadas a tirosinas cinasas, (6) translocaciones asociadas a *NUP98* (o *NUP214*) y (7) translocaciones relacionadas con el gen *TCR* o el gen de la inmunoglobulina (*IG*) (*Anexo 9*) [28].

a. Activación de un protooncogén celular



b. Generación de nuevos genes fusionados

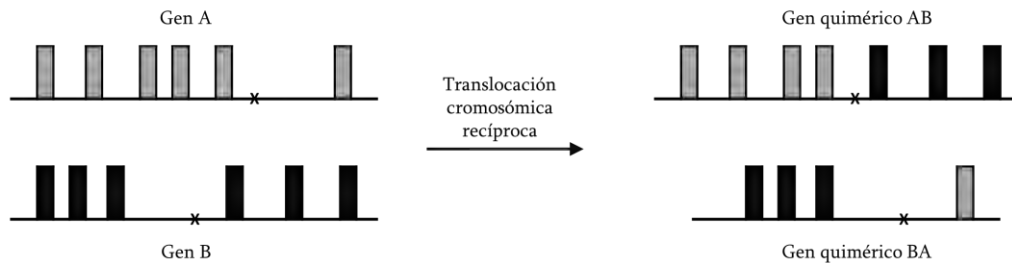


Figura I-5. Mecanismos principales por los cuales las translocaciones cromosómicas pueden llevar a la leucemogénesis (X: sitio del rompimiento cromosómico). a) Alteración de la expresión de un gen normal, por ejemplo, si un promotor fuerte o un elemento potenciador es translocado cerca de un protooncogén, este puede ser consecutivamente activado. b) Generación de nuevos genes fusionados. Cuando el rompimiento cromosómico ocurre en los intrones de dos genes y el marco de lectura se conserva, por lo que resultarán dos nuevos genes quiméricos de la translocación. *Modificado de Burmeister y Thiel* [27].

En las Leucemias Agudas en infantes y niños, las translocaciones que tienen como consecuencia la formación de genes quiméricos son los eventos más comunes (Figuras I-6 e I-7; *Anexo 10*) [31, 41, 42]. En estos dos grupos de edad se han identificado más de 200 genes involucrados en translocaciones, pero sólo muy pocos predominan (Tabla I-6).

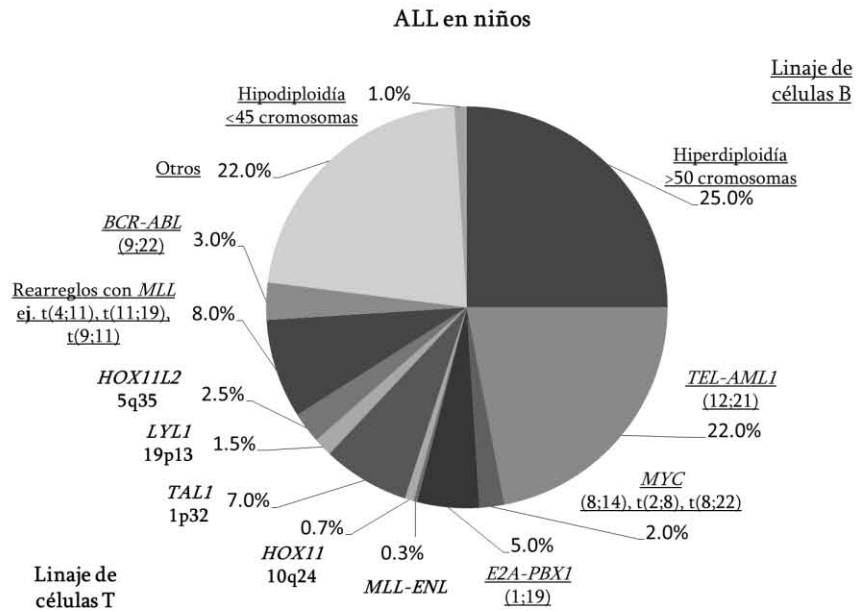


Figura I-6. Frecuencia de las anomalías citogenéticas en la ALL en niños. En negritas se representan los eventos característicos del linaje de las células T y subrayadas, los del linaje de células B. *Modificado de Pui y cols. [41].*

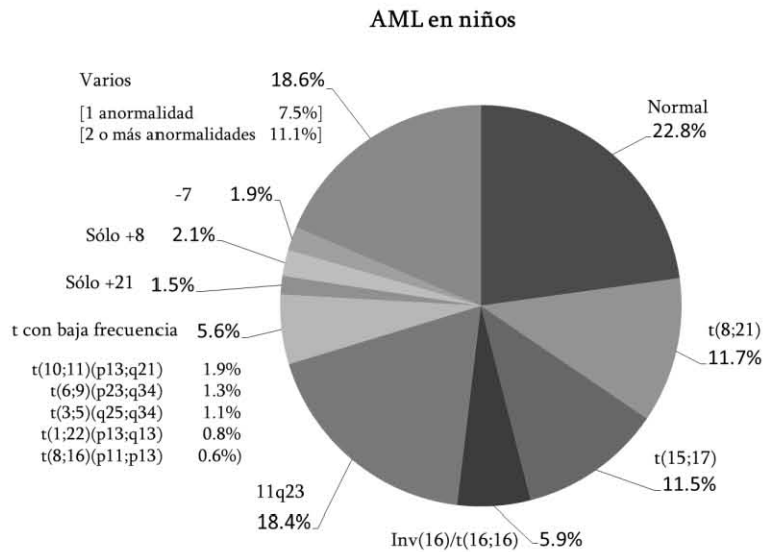


Figura I-7. Frecuencia de las anomalías citogenéticas encontradas en 478 casos de AML en niños. *Modificado de Raimondi y cols. [42].*

Tabla I-6. Frecuencia de translocaciones en algunos subtipos de Leucemia en infantes y niños. *Modificado de Greaves y Wiemels* [43].

Subtipo	Tipo celular involucrado	Anormalidad cromosómica	Lesión Molecular	Frecuencia	Producto funcional
Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL)	Progenitor de células B y monocitos (infantes)	t(4;11)(q21;q23)	Fusión <i>MLL-AF4</i>	~ 85% de ALL infantil	Factor de transcripción modificado
		Translocaciones 11q23	<i>MLL-ENL</i> y otras fusiones	~ 5% del total de ALL	Factor de transcripción modificado
	Precursor de células B	Hiperdiploidía	Incrementa el número de genes	~ 35% de ALL de precursoras de células B	Desconocido
		t(12;21)(p13;q22)	Fusión <i>TEL-AML1</i>	~ 20% de ALL de precursoras de células B	Factor de transcripción quimérico
		t(1;19)(p23;p13)	Fusión <i>E2A-PBX1</i>	~ 5% de ALL de precursoras de células B	Factor de transcripción quimérico
t(9;22)(q34;q11)	Fusión <i>BCR-ABL</i>	~ 5% de ALL precursoras de células B	Cinasa activada		
	Precursor de células T	Deleción 1q; t(1;14)(p32;q11)	Fusión <i>SIL-SCL</i>	~ 25% de ALL de precursoras de células T	Factor de transcripción desregulado (<i>SCL/TAL1</i>)
Leucemia Mieloide Aguda (AML)	En infantes	t(9;11)(p21-22;q23)	Fusión <i>MLL-AF6</i> , - <i>AF9</i> , - <i>AF10</i> , otros	~ 50% de AML infantil	Factor de transcripción modificado
		t(8;21)(q22;q22)	Fusión <i>AML1-ETO</i>	~ 15% de AML	Factor de transcripción quimérico

Dentro de las translocaciones más recurrentes se incluyen los rearrreglos en *MLL*, gen que ha sido asociado, tanto en Leucemias *de novo* como en las secundarias, con más de 70 genes diferentes [28, 54] estando presente en el 7-10% de todas las ALL y del 5-6% de todas las AML [55]. Particularmente en Leucemias en infantes (<12 meses), la frecuencia de translocaciones que involucran a este gen es de cerca del 80-85% en ALL y del 50-65% en AML [54-56]; el diagnóstico de los pacientes que portan esta translocación es pobre en comparación con niños (>1 año - 15 años) con AL [28, 43, 55, 58, 59], siendo los eventos más comunes la t(4;11)(q21;q23) –que da origen al gen fusionado *MLL-AF4*– en ALL y la t(9;11)(p21-22;q23) –cuyo producto es el gen quimérico *MLL-AF9*– respectivamente [43, 55, 59]. En niños con AL (1-15 años) esta frecuencia baja al 8% en ALL [41] y al 18.4 - 22% en AML [42, 60], aunque mantienen la misma representatividad [41, 42, 57, 61, 62]. En cambio, en éste último grupo de edad, predominan principalmente dos translocaciones, la t(12;21)(p13;q22) –que involucra la fusión de los genes *TEL* y *AML1*– que se presenta en aproximadamente el 20-25% de los casos de ALL de células precursoras de linfocitos B [44, 63, 64], y la t(8;21)(q22;q22) –donde la fusión se da entre los genes *AML1* y *ETO*– con una frecuencia entre el 9 y 15% [42, 43, 61].

Para concluir esta parte, es importante resaltar que, por los menos en las AL en infantes y niños, todas las translocaciones que han sido asociadas a un subtipo de Leucemia codifican para una proteína quimérica funcional, por lo que su papel dentro del proceso leucémico está en estudio.

CAPÍTULO 3.

ORIGEN DE LA LEUCEMIA EN INFANTES Y NIÑOS: TRANSLOCACIONES ASOCIADAS

Una de las características de las Leucemias en infantes y niños es su relativamente corta historia clínica, principalmente en la ALL, ya que se ha observado que de cuatro a seis meses atrás, antes de manifestar algún síntoma de palidez, letargo, hematomas o infección que llevan al diagnóstico, el paciente usualmente se mostraba perfectamente saludable [23]. Debido a que es poco probable que este tipo de cáncer tenga una latencia de pocas semanas, se puede suponer que la historia natural de la enfermedad debe de ser más prolongada, aunque de forma encubierta y clínicamente silenciosa [23]. Al mismo tiempo, dada la relativa juventud de la mayoría de los niños con Leucemia (<0 años – 5 años), es posible que esta enfermedad pudiese estar iniciando antes del nacimiento. Esta teoría es reforzada por registros que señalan un incremento en el riesgo a desarrollar ALL por exposición a rayos X durante el embarazo, así como distintos estudios epidemiológicos que han provisto evidencia indirecta para el origen fetal de la Leucemia Aguda –que es más marcada para la AML en infantes o en niños con ALL–, por los casos de Leucemia neonatal o congénita y por algunos modelos matemáticos que endosan esta posibilidad [23, 65, 66].

Para comprobar esta teoría, a principios de los 90's, comenzó la búsqueda de evidencia molecular que pudiese indicar, de manera directa, el origen prenatal de la Leucemia en infantes y niños. Dentro de los posibles biomarcadores candidatos (Tabla I-7), las translocaciones cromosómicas recíprocas demostraron ser los marcadores moleculares más idóneos ya que con su estudio, no sólo se demostró en varias Leucemias que el proceso leucemogénico puede estar iniciando durante el desarrollo embrionario (más específicamente, durante la hematopoyesis fetal) sino que además, el origen de la enfermedad es clonal y que varias de las translocaciones más comunes son posibles eventos tempranos o iniciadores de la Leucemia [23, 43, 66, 67].

Tabla I-7. Posibles marcadores que indiquen el mismo origen clonal (monoclonal) de la Leucemia en gemelos. Fuente: Greaves y cols. [67].	
Marcador	Limitaciones
Marcadores cromosómicos	<ul style="list-style-type: none">Algunos marcadores son comunes en leucemias independientes.Los marcadores pueden ser eventos secundarios o tardíos.
Rearreglos clonales <i>IGH/TCRV(D,N)J</i>	<ul style="list-style-type: none">La transformación inicial de la célula leucémica puede preceder a los rearreglos.Los rearreglos pueden no ser estables.
Expresión alélica ligada al cromosoma X en gemelas	<ul style="list-style-type: none">Puede ser concordante para la expresión de alelos por coincidencia (50%) pero la discordancia de la expresión de alelos es una fuerte evidencia en contra de la monoclonalidad.
Secuencia específica de oncogenes (ej. Fusión de genes –translocaciones–)	<ul style="list-style-type: none">Puede no ser iniciador o un evento temprano.

La evidencia necesaria para apoyar lo anterior pudo obtenerse gracias a dos tipos de investigación; la primera involucró el estudio de la relación clonal de Leucemias concordantes en gemelos monocigóticos y, la segunda, el escrutinio de muestras de sangre neonatal obtenido de tarjetas Guthrie pertenecientes a pacientes con Leucemia. Ambas investigaciones utilizaron la secuencia genómica del gen fusionado, resultado del evento de translocación, como un único marcador clonotípico [43].

ESTUDIOS DE LEUCEMIA CONCORDANTE EN GEMELOS MONOCIGÓTICOS

El primer reporte de Leucemia concordante en niños gemelos fue en 1882 y actualmente se cuentan con más de 70 reportes de parejas de gemelos monocigóticos conocidos o del mismo sexo con esta enfermedad en todo el mundo (Figura I-8) [67].

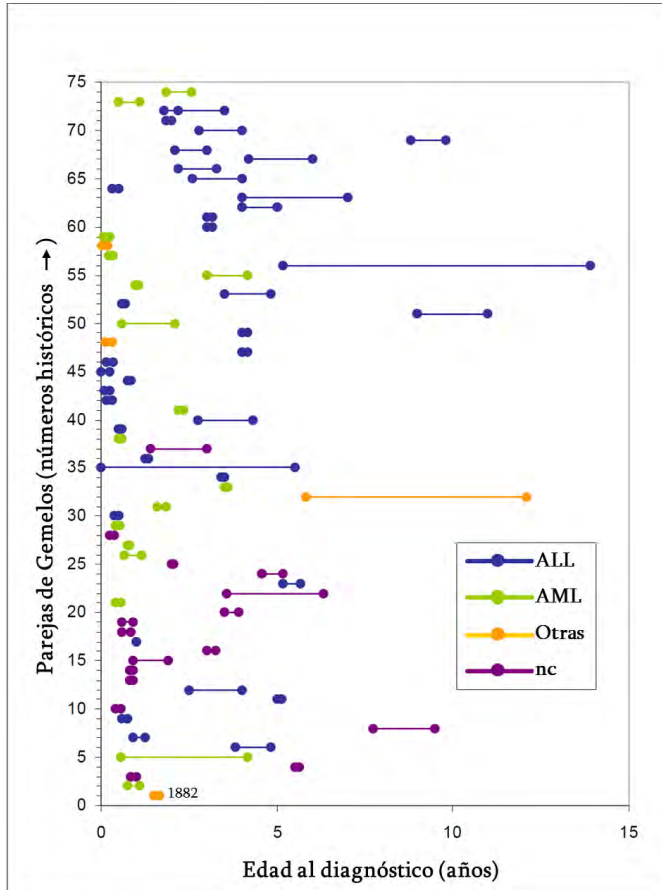


Figura I-8. Registro histórico acumulativo de Leucemia concordante en niños gemelos. nc: el subtipo es desconocido; uno o dos puntos fusionados: los gemelos fueron diagnosticados con diferencia menor a un mes entre ellos. No se incluyeron los reportes con detalles inadecuados. El primer par reportado en 1882 es el número 1 en esta secuencia. *Modificado de Greaves y cols.* [67].

La explicación para este fenómeno, ofrecida por Clarkson y Boyse en 1971, propone que la Leucemia concordante en gemelos puede ser resultado de sangre quimérica en donde esta enfermedad tiene un origen clonal y prenatal en uno de los fetos (teoría de una clona única) y posteriormente, siguiendo un efecto de “metástasis”, migra al otro gemelo a través de la anastomosis vascular que se forma en una sola placenta compartida. Con lo anterior se sugiere que la explicación de este origen prenatal y monoclonal puede ser sustentada con la detección de anomalías citogenéticas, no constitutivas y compartidas por las células leucémicas de ambos gemelos [43, 67].

La evidencia necesaria para sostener esta idea de “metástasis intraplacentaria” fue proporcionada por una serie de estudios internacionales sobre casos de Leucemia concordante en gemelos. En todos los casos, se utilizaron como marcadores puntos de rompimiento genómico únicos en translocaciones cromosómicas que involucran al gen *MLL* y en la translocación *TEL-AMLI*, así como rearrreglos clonotípicos de *TCR* e *IGH* [43].

En cada una de las parejas de gemelos estudiados, las muestras de células leucémicas de cada uno presentaban la misma secuencia del gen fusionado [68-75] (Tabla I-8; Figura I-9) o de los rearrreglos en *IGH/TCR* evaluados [76-78]. Sólo un estudio llegó a la misma conclusión utilizando seis marcadores cromosómicos sin tener translocaciones molecularmente definidas [79].

Tabla I-8. Estudios de Leucemia concordante en gemelos monocigóticos con marcadores clonotípicos únicos.

Marcador Molecular	Leucemia	Sexo	edad de diagnóstico		Aportación	País	Referencia
			1er gemelo	2do gemelo			
Rearreglos en <i>MLL</i>	nALL (L1)	M	5 semanas	5 semanas	1er. artículo que reporta un origen clonal y único. Evento no constitutivo.	Reino Unido	Ford y cols. [68]
	ALL	F	2 meses	2 meses			
	nALL	F	9 meses	10 meses	Gemelas dicigóticas. Evento no constitutivo.	Estados Unidos	Gill Super y cols. [69]
	ALL	F	Nacimiento	3 meses			
	ALL (L1)	F	2 meses	2 meses			
AML (M2)	F	11.5 meses	13 meses	Plantea posible asociación de la dieta materna (consumo de inhibidores de topo II naturales) y la presencia de los rearreglos. Evento constitutivo.	Estados Unidos	Megonigal y cols. [71]	
<i>TEL-AML1</i>	cALL	F	3 años, 6 meses	4 años, 10 meses	del <i>TEL</i> en un gemelo y rearreglos distintos de IGH sugieren la presencia de eventos moleculares independientes durante la promoción de la leucemia.	Países Bajos	Ford y cols. [72]
	ALL (SI) / cALL (L2)	F	5 años, 2 meses	13 años, 11 meses	Pre-diagnosia 9 años antes del desarrollo de la leucemia. Latencia prolongada.	Países Bajos	Wiemels y cols. [73]
	ALL (L1)	M	23 meses	23 meses	Embarazo triple: 2 gemelos monocigóticos, 1 dicigótico. El 3er hermano sólo presentó la translocación en la TG.	Reino Unido	Maia y cols. [74]
	ALL pre-B	M	4.8 años	5.1 años	Rearreglo de IGH distinto en cada gemelo. Se evaluaron TG.	Suiza	Teuffel y cols. [75]

F – Femenino; M – Masculino; nALL – ALL progenitor de B o nulo; cALL – ALL común; ALL pre-B – ALL de células precursoras B; T-ALL – ALL de células T; NHL – Linfoma no Hodgkin; TG: Tarjeta Guthrie; del *TEL*: delección del gen *TEL* normal; * Embarazo de trillizas moocigóticas, la tercer bebé desarrolló la leucemia a los 37 meses.

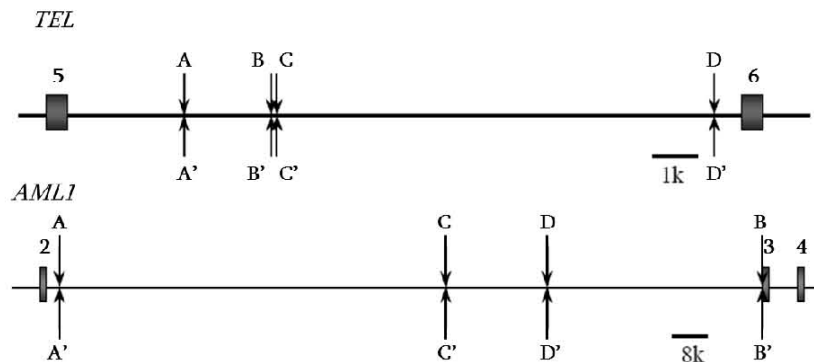


Figura I-9. Puntos de rompimiento de la translocación clonotípica *TEL-AML1* en 4 pares de gemelos. Cada par de flechas señaladas con las letras A/A', B/B', C/C' y D/D' en el intrón 5 de *TEL* y en el intrón 2 de *AML1* corresponden a una pareja de gemelos. Los exones están representados con cajas. Modificado de Greaves y Wiemels [43].

Con los resultados obtenidos en estos trabajos se determinó, de forma general, que los marcadores moleculares antes mencionados –principalmente las translocaciones cromosómicas– son eventos clonales, no constitutivos y adquiridos, de modo que se llegó a una única conclusión: debe de existir una clona única a partir de la cual se está desencadenando la Leucemia. Esta clona se estaría generando en uno de los gemelos para posteriormente ser transmitida a su hermano a través de pequeñas conexiones venosas interconectadas dentro de la placenta, conocidas como *anastomosis*. Aunado a lo anterior, los estudios en gemelos encontraron que (1) la latencia de esta enfermedad es variable, llegando a ser en algunos casos, muy prolongada [73, 76] y (2) la causa de que la concordancia de la Leucemia entre ambos hermanos disminuya de casi un 100% en infantes a poco menos de 10-15% en niños [67] puede ser la presencia de eventos genéticos adicionales postnatales, que son complementarios a una translocación cromosómica o rearrreglo de origen prenatal [72, 75-77].

ESTUDIOS RETROSPECTIVOS AL NACIMIENTO: EVALUACIÓN DE TARJETAS GUTHRIE

Los estudios en gemelos monocigóticos otorgaron las primeras pruebas que demostraron el origen prenatal de algunas translocaciones cromosómicas características de algunos subtipos de Leucemia. Sin embargo, una de las interrogantes que posteriormente surgieron fue si esta misma idea podría aplicarse a las Leucemias en niños unigénitos, ya que tanto las características biológicas y clínicas, así como en edad de incidencia, son similares entre estos dos grupos [67]. Para poder responder esta pregunta, Gale y cols. [80] propusieron en 1997 la evaluación de pequeñas muestras de sangre neonatal obtenidas a partir de Tarjetas Guthrie –papel filtro especial utilizado para realizar un tamiz metabólico en los neonatos– de pacientes con Leucemia. Este grupo determinó la secuencia del punto de fusión en la translocación *MLL-AF4* en 3 bebés de 5, 6 y 24 meses de edad con ALL, y después buscó la misma secuencia en la Tarjeta Guthrie de cada paciente, encontrando que era exactamente igual a las muestras de células leucémicas. A partir de entonces, diversos grupos han confirmado el origen prenatal de algunas de las translocaciones más comunes en Leucemias infantiles como *MLL-AF4*, *TEL-AML1*, *AML1-ETO* y *E2A-PBX1* [80-89] (Tabla I-9), así como de rearrreglos en *IGH* y *TCR* [81, 90-92]. La información recaudada ha permitido establecer una frecuencia estimada de cada una de estas translocaciones (Tabla I-10). Sumado a lo anterior, un par de estudios ha reforzado esta idea al combinar el estudio en gemelos monocigóticos con la detección en Tarjetas Guthrie (Figura I-10) [74, 75, 84]. Sin embargo, una de las desventajas que presenta el uso de esta herramienta es el hecho de que pueda estarse subestimando la frecuencia de los casos con origen prenatal. Esto se debe principalmente a que los casos negativos no proporcionan información alguna, ya que pueden indicar tanto un origen postnatal de la translocación como un origen prenatal que no cuenta con el número de células leucémicas necesarias en la sangre para que puedan ser rastreadas en la prueba [43]. Aun así, al igual que en los estudios en gemelos monocigóticos, este grupo de trabajos ha coincidido en que, en algunos casos, la latencia de la Leucemia puede ser muy larga [82, 89, 90, 93] y en la posibilidad de un segundo evento postnatal para que se desencadene la enfermedad [87, 91].

Tabla I-9. Estudios retrospectivos con Tarjetas Guthrie.

Marcador Molecular	Leucemia	No. De casos	edad de diagnóstico	% de casos positivos	Observaciones	País	Referencia
<i>MLL-AF4</i>	ALL	3	5 meses – 2 años	100%	1er. estudio en evaluar una translocación en TG.	Reino Unido	Gale y cols. [80]
	Pro-B ALL	2	6 meses y 1 año	100%	También presentan mismo rearrreglo de IGH.	Austria	Fasching y cols. [81]
	ALL	3	5 años, 1 mes – 8 años, 6 meses	33.33%	Latencia de 6 años en la muestra positiva.	NE	Maia y cols. [82]
<i>MLL-AF6</i> , <i>MLL-AF9y</i> <i>MLL-AF10</i>	AML	1	1 año, 5 meses;	0%		República Checa	Burjanivova y cols. [83]
		1	1 año, 7 meses;	0%			
		1	5 años, 4 meses	0%			
<i>MLL-AF9y</i> <i>MLL-AF10</i>	ALL	1	5 años, 9 meses;	0%		NE	Maia y cols. [82]
		1	3 AÑOS	0%			
<i>MLL-AF10</i>	AML (M5)	1	2 años	100%	Se detectó <i>dic(1;19)</i> en las células leucémicas, no se establece si es prenatal.	Reino Unido	Jones y cols. [84]
<i>TEL-AML1</i>	ALL pre-B	9 1 par de gemelos	2 años – 5 años 4 años	66.67% 100%	Inicialmente 12 muestras de bebés unigénitos; 3 fueron descartados al no amplificar los genes control.	Italia y Reino Unido	Wiemels y cols. [85]
	ALL pre-B	9	2 años, 11 meses – 6 años, 2 meses	33.33%	Máximo periodo de latencia: 5 años, 8 meses.	Dinamarca	Hjalgrim y cols. [86]
	cALL	14	2 años, 2 meses – 6 años, 8 meses	50%	Eventos secundarios: del <i>TEL</i> el más común.	Estados Unidos	McHale y cols. [87]
	ALL	7	5 años, 10 meses – 11 años, 2 meses	42.86%	Máximo periodo de latencia detectado: 9 años, 4 meses.	NE	Maia y cols. [82]
	ALL	3	3 años, 3 meses – 5 años, 7 meses	33.33%	Máximo periodo de latencia detectado: 3 años, 6 meses	República Checa	Burjanivova y cols. [83]
<i>E2A-PBX1</i>	ALL	15	NE	13.33%	2 pacientes positivos para TG: 5 años, 3 meses y 8 años, 7 meses.	Estados Unidos	Wiemels y cols. [88]
<i>AML1-ETO</i>	AML	10	3 años, 6 meses – 12 años, 2 meses	50%	3 pacientes con la translocación en muestras de remisión clínica completa.	Estados Unidos y Reino Unido	Wiemels y cols. [89]
<i>AML1-ETO</i> ; <i>FLT3/ITD</i> ; <i>PML-RARA</i> ; <i>CBFB-MYH11</i>	AML	2	1 año, 5 meses –	Ningún caso dio positivo	Se agruparon todos los casos evaluados para tomar el mín-máx de edad.	República Checa	Burjanivova y cols. [83]
		2	14 años, 8 meses				
		4					
<i>PML-RARA</i> / <i>CBFB-MYH11</i>	AML	2	¿? – 10 años, 8	50%		Estados Unidos	McHale y cols. [90]
		2	meses / ¿? – 9 años, 5 meses	50%			

cALL – ALL común; ALL pre-B – ALL de células precursoras B; T-ALL – ALL de células T; TG : Tarjeta Guthrie; *dic*: cromosoma dicéntrico; del *TEL*: delección del gen *TEL* normal; NE: No Especificado.

Finalmente, uno de los puntos clave del estudio con Tarjetas Guthrie son las frecuencias estimadas del origen prenatal de las translocaciones *TEL-AML1* (51.06%), *AML1-ETO* (41.67%) y, particularmente de *MLL-AF4* en infantes con Leucemia (100%) (Tabla I-10). Estos valores hacen suponer, de forma general, que los niños que presenten este tipo de eventos al nacimiento, tendrán un mayor riesgo a desarrollar Leucemia en un futuro.

Tabla I-10: Estudios retrospectivos de Leucemias en infantes y niños en muestras de sangre neonatal: Tarjetas Guthrie. Modificado de Greaves y Wiemels [43].

Subtipo de leucemia	Translocación cromosómica	No.Total de casos evaluados	Frecuencia estimada en muestras de sangre neonatal.	Referencias
ALL en infantes	<i>MLL-AF4</i>	5	100%	[80, 81]
ALL en niños	<i>MLL-AF4</i>	3	33.33%	[82]
ALL en niños	<i>TEL-AML</i>	47	51.06%	[82, 83, 85-87]
ALL en niños	<i>E2A-PBX1</i>	15	13.33%	[88]
AML en niños	<i>AML1-ETO</i>	12	41.67%	[83, 89]

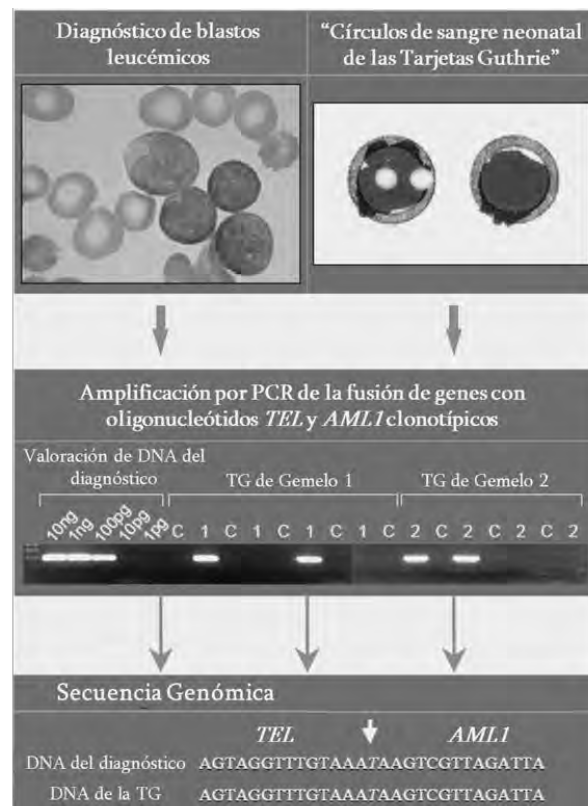


Figura I-10. Detección de secuencias genómicas fusionadas y clonotípicas de *TEL-AML1* en “círculos de sangre neonatal” obtenidos de Tarjetas Guthrie (TG) de gemelos. Modificado de Greaves y Wiemels [43].

TRES TRANSLOCACIONES ASOCIADAS A LEUCEMIAS EN INFANTES Y NIÑOS CON ORIGEN PRENATAL: TEL-AML1, AML1-ETO Y MLL-AF4

Las translocaciones asociadas son alteraciones cromosómicas que han sido relacionadas con un subtipo morfológico o fenotípico de una Leucemia, Linfoma o Sarcoma, y cuya característica particular –la generación de genes yuxtapuestos– ha permitido valorar la noción de que las translocaciones cromosómicas son parte crítica en el desarrollo de estos tres grupos de cáncer, por lo que se ha

asumido que varios de estos eventos indican la presencia de una enfermedad hematopoyética [94, 95]. En Leucemia, algunos ejemplos de translocaciones asociadas son la t(9;22)(q34;q11) (gen fusionado *BCR-ABL*) característica de la Leucemia Mieloide Crónica, la t(15;17)(q22;q21) (*PML-RARA*) en la Leucemia Promielocítica Aguda y la inv(16)/t(16;16)(p13;q22) (*MYH11-CBFB*) relacionada con la AML subtipo M4, así como varias translocaciones que involucran al gen *MLL* como la t(9;11)(p22;q23) detectada en casi la mitad de los casos de AML relacionados con terapia (t-AML) [28, 94, 95].

En la Leucemia en infantes y niños, particularmente se reconocen tres translocaciones asociadas a esta enfermedad: la t(12;21)(p13;q22), *TEL-AML1*, característica de aproximadamente el 20-25% de los casos de ALL pre-B en niños; la t(8;21)(q22;q22), *AML1-ETO*, presente en más o menos el 15% de AML en niños, y la t(4;11)(q21;q23), *MLL-AF4*, relacionada con más del 80% de los casos con ALL en infantes y del 10% de ALL en niños (ver Tabla I-10, en la sección de Anormalidades Genéticas en las Leucemias Agudas de Infantes y Niños) [43]. Su reconocimiento fue reforzado por los estudios realizados en gemelos con Leucemia concordante y con tarjetas Guthrie, trabajos que no solo demostraron su origen *in utero*, sino que además, ayudaron a determinar su valor como marcadores tempranos o iniciadores del proceso leucemogénico [43, 67]. Estas tres translocaciones son del tipo que generan genes fusionados que codifican para una proteína quimérica, cuyo papel biológico está en continuo estudio (Tabla I-11; *Anexo 1I*).

Tabla I-11. Características generales de los genes involucrados en las translocaciones TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4.

Gen	Localización	Función de la Proteína	Translocación, Proteína quimérica	Función de la proteína quimérica	Referencia
<i>TEL</i>	<i>12p13.1</i>	Regulador transcripcional de importancia durante la hematopoyesis en la médula ósea.	<i>t(12;21)(p13;q22)</i> , TEL-AML1	Puede interactuar con sitios de unión al DNA de AML1 e inhibir la transcripción de forma negativa.	4, 98-100
<i>AML1</i>	<i>21q22.3</i>	Factor de transcripción (activador) de varios genes específicos para la hematopoyesis (GM-CSF, CSF1R, TCRβ y mieloperoxidasa mieloide).			
<i>ETO</i>	<i>8q22</i>	Factor de transcripción putativo.	<i>t(8;21)(q22;q22)</i> , AML1-ETO	Tiene la capacidad de reconocer los sitios de unión conceso de AML1 (compite con la proteína normal AML1 de forma dominante negativa). Forma dímeros con la subunidad c/ebp/CBTF; esto probablemente altera la regulación transcripcional de la proteína AML1 normal.	108, 109
<i>MLL</i>	<i>11q23</i>	Factor de regulación transcripcional (Principal regulador de la hematopoyesis y desarrollo embrionario): La región N-terminal actúa como represor transcripcional. Participa en el complejo de remodelación de la cromatina y en el complejo de transcripción TFIID. Se une a los promotores de los genes HOX a través de la acetilación y metilación de histonas regulando su expresión, principalmente de HOXA9.	<i>t(4;11)(q21;q23)</i> , MLL-AF4	Activador transcripcional potente. Posible reclutador de AF9 y SWI-SNF (complejo remodelador del nucleosoma).	117-120
<i>AF4</i>	<i>4q21</i>	Activador transcripcional.			

Translocación (12;21)(p13;q22): Gen Fusionado *TEL-AML1*

La t(12;21) fue reportada por primera vez en 1994 por Romana y cols. [96] en tres niños con ALL y está asociada con una buena prognosis. Actualmente, es conocida como una translocación críptica debido a que sólo puede ser detectada mediante una (RT)-PCR o por FISH (*inmunofluorescencia in situ*), puesto que, con citología clásica, su detección es menor al 0.5%, lo que infravalora su asociación con la ALL [97].

Esta translocación genera el gen fusionado *TEL-AML1* como consecuencia de la unión de los genes *TEL* ("translocation ETS leukemia", gen represor de tumores; ETS: familia de factores de transcripción), localizado en el cromosoma 12, y *AML1* (o CBF α 2; CBF: familia de factores de transcripción que juegan un papel clave en el proceso de diferenciación y maduración durante la hematopoyesis temprana), ubicado en el cromosoma 21 (Tabla I-11) [27, 98-100]. Ambos genes anteriormente habían sido relacionados, de forma independiente, con otras translocaciones en Leucemias Mieloides [101].

Diversos estudios han encontrado que los puntos de ruptura ocurren a lo largo del intrón 5 del gen *TEL* y, preferentemente, en el intrón 2 (antes reportado como intrón 1) de *AML1* [28, 72-74, 85, 102, 103], aunque también se han encontrado puntos de ruptura en el intrón 1 y 3 de este gen (anteriormente región -1 e intrón 2, respectivamente) (Figura I-11) [85, 102, 103], por lo que el gen fusionado *TEL-AML1* está integrado por los exones 1-5 de *TEL* y, generalmente, por los exones del 3-10 de *AML1*. Diversos estudios han reportado la función de la proteína quimérica que resulta de la fusión de estos genes (*Anexo 11-A*) [104-106].

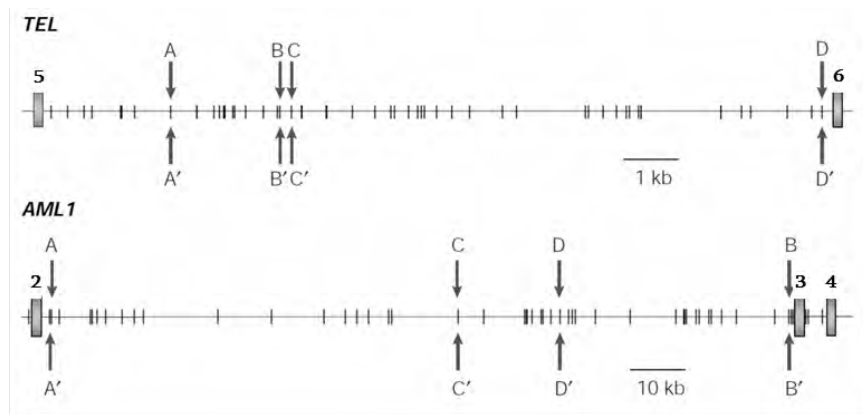


Figura I-11. Puntos de rompimiento en el intrón 5 de *TEL* y en los intrones 1-3 de *AML1*, genes que integran el gen fusionado más común en la Leucemia en niños. Los exones son representados por cajas. Cada línea vertical indica la posición de un punto de rompimiento secuenciado y mapeado de la muestra de leucemia de un paciente. Los rompimientos son únicos y dispersos, con excepción de los rompimientos A/A', B/B', C/C' y D/D', que corresponden a pares de gemelos idénticos con leucemia. *Modificado de Greaves y Wiemels*[43].

Translocación (8;21)(q22;q22): Gen Fusionado *AML1-ETO*

La t(8;21) fue la primera translocación identificada en Leucemia, siendo descrita como un evento que involucraba un rearrreglo recíproco de los cromosomas 8 y 21 en pacientes con AML en 1973; está asociada particularmente con el fenotipo M2 [94], es la translocación más común en AML y se caracteriza por tener una buena respuesta a la terapia y una supervivencia prolongada libre de la enfermedad [28].

Como resultado del intercambio cromosómico, se promueve la formación del gen *AML1-ETO* a través de la fusión de los genes *AML1* y *ETO*, éste último localizado en el cromosoma 8 (“eight twenty-one” o *MTG8*; miembro de la familia *ETO*: reguladores transcripcionales que interactúan con co-receptores y con la histona deacetilasa) (Tabla I-11) [49, 107-109]. La caracterización molecular de esta translocación en diversas muestras de pacientes pediátricos ha permitido determinar puntos de rompimiento a lo largo del intrón 6 (antes conocido como intrón 5) de *AML1* y, principalmente, en el intrón 2 (antes 1b) de *ETO* [28, 89, 110] y en algunos casos en el intrón 3 (antes 1a) (Figura I-12) [28, 110], de tal forma que el gen fusionado *AML1-ETO* está integrado por los exones 1-6 de *AML1* y, en la mayoría de los casos, por los exones 3-13 de *ETO*. La función de la proteína quimérica ha sido reportada en varios estudios (*Anexo 11-B*) [49, 106, 111-114].

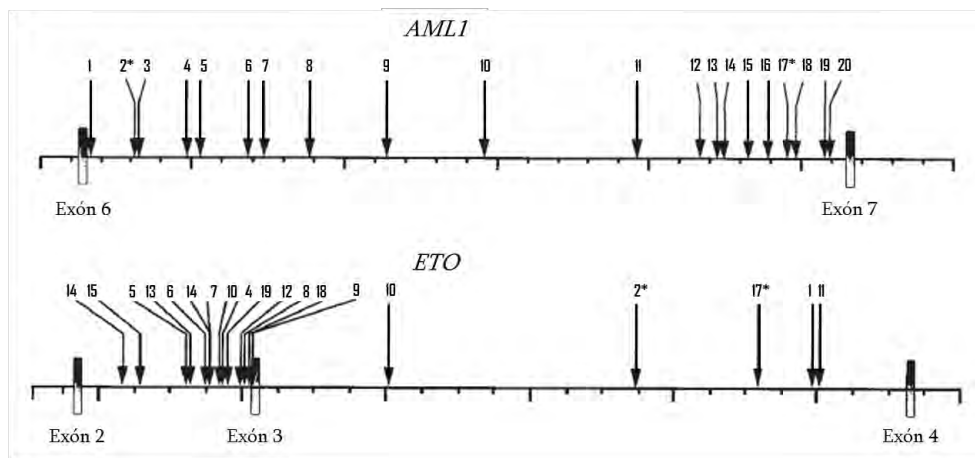


Figura I-12. Mapa de la localización de 18 puntos de rompimiento a lo largo de las regiones intrónicas de *AML1* y *ETO*; * Muestras 2 y 7 corresponden a las líneas celulares Kasumi y SKNO-1, respectivamente. Modificado de Xiao y cols. [110].

Translocación (4;11)(q21;q23): Gen Fusionado *MLL-AF4*

De todos los rearrreglos que involucran a 11q23/MLL en la Leucemia en infantes, la translocación (4;11) es el subtipo molecular más recurrente con una frecuencia entre el 50 y 70% de todos los casos reportados y, a su vez, está relacionada con prognosis pobre comparada con otras translocaciones. Esta representatividad disminuye a aproximadamente un 8% en niños, donde se observa una buena prognosis [41, 59, 115, 116].

Esta translocación tiene como consecuencia la unión de los genes *MLL* (“myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia”, la proteína es un factor de regulación transcripcional) localizado en el cromosoma 11, y *AF4* (“ALL1 fused gene from chromosome 4”, miembro 1 de la familia AF4/FMR2, activador

transcripcional) ubicado en el cromosoma 4, originando el gen fusionado *MLL-AF4* (Tabla I-11) [117-120]. Sin embargo, a diferencia de las dos translocaciones asociadas antes mencionadas, en la t(4;11) se ha detectado un grupo o *cluster* de puntos de ruptura que abarca varios intrones en ambos genes (Figura I-13), por lo que los exones que participan en el nuevo gen son variados. En *MLL* se ha identificado una región de 6.5 kb donde se agrupan puntos de rompimiento y que abarca del intrón 8 al intrón 12, mientras que en el gen *AF4* se reporta una región de agrupamiento de puntos de ruptura de 40 kb, entre los exones 3 y 7 [115]. Esto conlleva a que el tamaño de la proteína quimérica dependa de los exones involucrados en el rearreglo, siendo el evento más común, en la Leucemia en infantes (aprox. 55%), la unión de los exones 1-8 de *MLL* con los exones 4-20 de *AF4* (*Anexo 11-C*) [115]; aun así, parece ser que el efecto de la nueva proteína sigue siendo el mismo (*Anexo 11-C*) [119, 120].

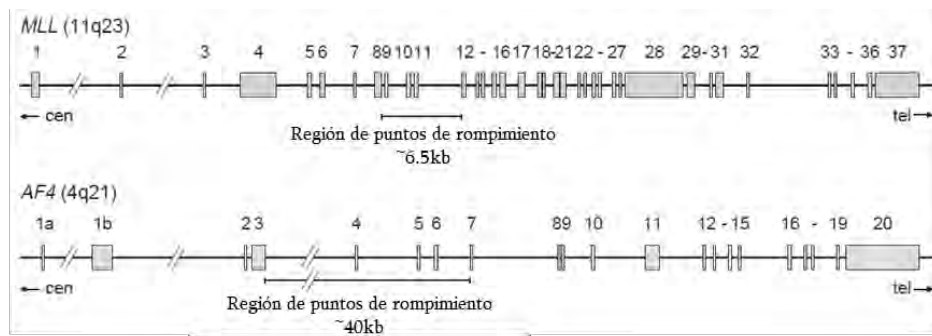


Figura I-13. Mapa de la localización de la región principal donde se agrupan puntos de rompimiento a lo largo de las regiones intrónicas de *MLL* y *AF4*. Fuente: van Dongen y cols. [115].

CAPÍTULO 4.

FACTORES QUE FAVORECEN LA FORMACIÓN DE TRANSLOCACIONES ASOCIADAS A LEUCEMIAS

Cuando se planteó la posibilidad de que algunas translocaciones asociadas a Leucemia podían tener su origen durante el desarrollo embrionario, surgió la interrogante sobre las causas que estuviesen promoviendo la formación de este tipo de daño. Una posible respuesta llegó con el estudio de las Leucemias secundarias, nombre que se le da a las Leucemias que se desarrollan como consecuencia de un tratamiento para un primer cáncer, o cáncer primario, con agentes quimioterapéuticos inhibidores de Topoisomerasa II (Topo-II). La evaluación citogenética de estos pacientes (adultos y niños) reveló la presencia de translocaciones similares a las encontradas en Leucemias *de novo* en infantes y niños, principalmente aquellas que involucraban al gen *MLL* [66, 67]. Esta similitud permitió plantear la posibilidad de que la exposición prenatal a agentes ambientales, que fungieran como inhibidores de Topo-II, podrían estar promoviendo eventos de translocación; este tipo de compuestos incluye metabolitos del benceno, isoflavonas, lignanos, flavonoides, algunas hierbas medicinales, laxantes con antraquinonas, resina de podofilina, antibióticos con quinolona y algunas hierbas culinarias, sustancias fenólicas y plaguicidas –que incluyen fungicidas y mosquiticidas– [41, 121].

La postura de varios compuestos, entre ellos los plaguicidas, se ve reforzada por los estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo con el fin de establecer la etiología de la Leucemia.

INCREMENTO DE RIESGO A DESARROLLAR LEUCEMIA EN INFANTES Y NIÑOS POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Desde la década de los 80's se han elaborado diversos estudios epidemiológicos que han examinado los posibles factores de riesgo de la Leucemia en infantes y niños, los cuales abarcan factores laborales, ambientales, genéticos, infecciosos o estilo de vida de los padres. Dentro de los dos primeros grupos, la radiación ionizante ha sido el único factor que ha sido significativamente ligado con ALL o AML. También se han evaluado hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos aromáticos volátiles –en donde el benceno ha sido identificado como factor de riesgo [122]– y diversos grupos de plaguicidas [123-126].

En el caso particular de los estudios epidemiológicos con plaguicidas previos al descubrimiento del origen prenatal de algunas translocaciones asociadas a Leucemia, si se considera el tiempo relativamente corto en el que se desarrolla la Leucemia –menos de 1 año de edad en Leucemias en infantes y entre los 2 y 4 años en Leucemias en niños– y los antecedentes de no ser una enfermedad constitutiva (origen en células germinales), se puede postular que la exposición está ocurriendo *in utero*, es decir, durante el desarrollo embrionario [41, 43, 66, 67, 124].

Ahora bien, con el estudio de los posibles factores causales de la Leucemia en niños y la detección de translocaciones cromosómicas asociadas a Leucemia en muestras neonatales, Kim y cols. [123] proponen un esquema en donde establecen la relación potencial entre los eventos que inducen la enfermedad, las ventanas de exposición críticas y los factores de riesgo dependientes de la exposición, por lo que si se toma en cuenta lo dicho en el párrafo anterior, se puede ubicar la formación de translocaciones en la etapa del desarrollo embrionario (Figura I-14). Esta idea es reforzada por algunos

estudios epidemiológicos que, en esta etapa, han encontrado asociaciones ante la exposición laboral o en el hogar de la madre durante la gestación con el riesgo a que sus hijos desarrollen Leucemia (Tabla I-12) [121, 127-134].

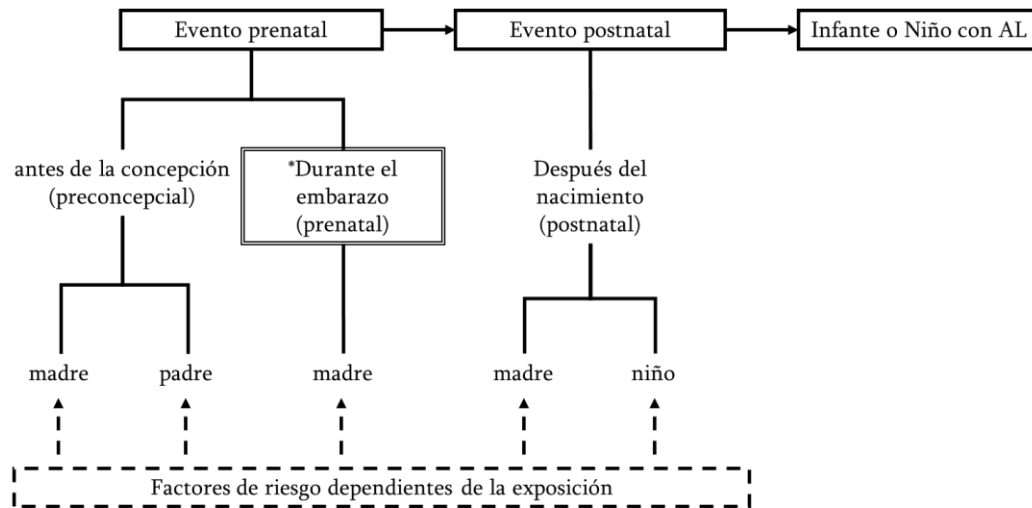


Figura I-14. Relaciones potenciales entre los eventos que inducen AL en infantes y niños (prenatales o postnatales), ventanas de exposición críticas y factores de riesgo dependientes de una exposición. Los factores de riesgo dependientes de la exposición que están asociados parentalmente antes de la concepción y/o durante el embarazo pueden estar potencialmente ligados con eventos prenatales; algunos de estos factores de riesgo u otros asociados con la leche materna y los niños después del nacimiento son fuertemente asociados a eventos postnatales. *Etapa de mayor riesgo en donde puede ocurrir eventos de translocación (marco doble). AL-Leucemia Aguda. *Modificado de Kim y cols. [124].*

PLAGUICIDAS COMO AGENTES GENOTÓXICOS

La Agencia para la Protección Ambiental de Estados Unidos, la EPA, define a los plaguicidas como “sustancias cuya intención es repeler, matar o controlar cualquier especie designada como una *plaga* incluyendo plantas, insectos, roedores, hongos, bacterias u otros organismos” [135]. El término plaguicida es el nombre genérico de agentes que se clasifican en categorías específicas en función de las características de su utilización y del organismo que destruyen [136].

Un gran número de plaguicidas sintéticos han sido introducidos al mercado desde mediados de 1940. Actualmente el manual de plaguicidas incluye 900 entradas principales y listas de cerca de 2600 productos. Constituyen un grupo heterogéneo de compuestos biológicamente activos, caracterizados por diversos grados de toxicidad también para especies no blanco incluyendo a los humanos en quienes muchas de estas sustancias son extremadamente tóxicas. Los casos de intoxicación aguda por estos compuestos son causa de una morbilidad y mortalidad significativas en el mundo, particularmente en países en desarrollo, donde los patrones de uso de plaguicidas varían según la zona [137].

Tabla I-12. Estudios epidemiológicos de caso-control: Asociación riesgo a Leucemia en infantes y niños: exposición a plaguicidas en la etapa prenatal durante el desarrollo embrionario. *Modificado de Infante-Rivard y Weichenthal* [124].

Tipo de Leucemia	No. de casos total	Exposición	Tipo o uso del plaguicida	No. de casos expuestos	Riesgo estimado	Fuente
ALL, AML	136	Materna	NE	15	ALL 2.53 (0.71, 8.97) AML 5.08 (1.84, 14.0)	Alexander y cols. [121]
			Baygon/mosquitocida	7	ALL 4.3 (0.66, 28.0) AML 7.82 (1.73, 35.3)	
ALL y ANLL	18	Exposición ocupacional materna	NE	12 7 3	General: 2.6 (0.8-9.1) ALL 3.5 (1.1-11.2) ANLL 2.4 (0.5-11.0)	Shu y cols. [127]
ANLL	90 27 8	En el hogar	NE	50	< 1 semana 1.4 (0.8-2.2)**	Buckley y cols. [128]
				12	1-2 semanas 0.9 (0.4-2.1)	
				8	Más días ---	
		Ocupacional paterna	NE	NE	1.9	
		Ocupacional materna			6.0	
leucemia	59 155 71	En el hogar	Exterminio	32	1.0 (0.6, 1.8)	Leiss y cols. [129]
			Uso en el patio	76	0.8 (0.5, 1.1)	
			Plaquitas	45	1.5 (1.0, 2.8)	
ALL	491	En el hogar	Herbicidas	118	1.84 (1.32, 2.57)	Infante-Rivard y cols. [130]
			Insecticidas para plantas	78	1.97 (1.32, 2.94)	
			Plaguicidas para árboles	63	1.70 (1.12, 2.59)	
			Repelentes/spays	49	0.70 (0.45, 1.09)	
			Productos contra babosas y caracoles	6	1.57 (0.43, 5.62)	
Leucemia	19,674*	Exposición ocupacional paterna	Fungicidas clorfenato***	11	1.0 (0.5, 1.8)	Heacock, y cols [131]
Leucemia	1184	Exposición ocupacional materna	NE	15	3.6 (1.5, 8.8)	Meinert y cols [132]
				24 ¹	2.5 (1.3, 4.7)	
			Exposición ocupacional paterna	NE	57 68 ¹	
ALL	135	En el hogar	Control profesional de plagas	20	2.3 (0.9, 5.4)	Ma y cols. [133]
			Insecticidas	68	2.3 (1.3, 4.0)	
			Productos para el control de pulgas	22	0.7 (0.4, 1.6)	
			Herbicidas	30	1.8 (0.9, 3.5)	
Leucemia	568	En el hogar	Insecticidas	92	1.8 (1.2-2.8)	Menegaux y cols. [134]
			Plaguicidas para el jardín	14	2.5 (0.8-7.2)	

* Estudio de Cohorte y de caso-control anidado. ** Tiempo de exposición antes del nacimiento. *** Empleo de plaquitas en no menos de un año antes del nacimiento del bebé. 1 Exposición antes, durante y después del embarazo. ANLL-Leucemia no Linfoblástica Aguda. NE – No especificado.

Dado los usos y propiedades de los plaguicidas, muchas personas se encuentran en contacto con ellos, ya sea mediante una exposición laboral y/o ambiental, primordialmente. La población general principalmente está en contacto con los residuos de estos compuestos, incluyendo la degradación física y biológica en aire, agua y comida. La exposición ocupacional ocurre en todos los estados de la formulación de los plaguicidas, en la manufactura y la aplicación involucrando un contacto con mezclas complejas de diferentes tipos de químicos, ingredientes activos y otros productos presentes en formulaciones técnicas [138].

El potencial genotóxico es un riesgo primario que puede tener una consecuencia negativa a largo plazo como puede ser un efecto tóxico en la reproducción, carcinogénico o en enfermedades degenerativas; por este motivo, muchos de los plaguicidas han sido evaluados utilizando una gran variedad de pruebas de mutagenicidad que abarcan mutaciones en genes, alteraciones cromosómicas y daño al DNA. Sin embargo, dado que la mayoría de los plaguicidas se encuentran en mezclas complejas, el potencial genotóxico evaluado en un solo compuesto probablemente no pueda ser extrapolado a humanos [138].

Actualmente, el biomonitoreo genotoxicológico en poblaciones humanas ha sido empleado como una herramienta para estimar el riesgo genético frente a una exposición integrada a mezclas complejas de

químicos. Aun cuando hay diversos biomarcadores disponibles para evaluar las respuestas genotóxicas temporales y permanentes, los estudios de biomonitorio en poblaciones que tienen contacto con plaguicidas han sido enfocados en daños citogenéticos puntuales como aberraciones cromosómicas (CA), micronúcleos (MN), la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (SCE) [138] y recientemente ensayo cometa [139-141]. Particularmente, en el caso de neonatos y niños, existen diversos estudios que han evaluado el daño genético por exposición a diversos contaminantes utilizando como principal biomarcador a los MN [142-144], seguido por los aductos [144, 145].

Aunado a la información anterior, la evaluación de translocaciones asociadas a Leucemia en neonatos y niños puede ser utilizada como un biomarcador de daño genotóxico. El trabajo realizado por LaFiura y cols. [146] es el primero que intenta integrar esta información. Su estudio reportó que en 8 de 39 (20.5%) niños expuestos a Propoxur, un insecticida del grupo de los carbamatos, se detectó la presencia del mRNA (Ácido Ribonucléico mensajero, por sus siglas en inglés) de la translocación AML1-ETO, asociada con AML en niños, en comparación con el grupo control (10%).

Finalmente, para concluir, se pueden postular a las translocaciones cromosómicas asociadas a Leucemia en infantes y niños como posibles marcadores de daño genotóxico por exposición a plaguicidas, esto con base en cinco puntos clave que favorecen esta idea y que se desarrollaron a lo largo de este trabajo:

- ❖ el establecimiento de algunas translocaciones cromosómicas como eventos tempranos o iniciadores del proceso leucemogénico;
- ❖ el conocimiento del origen prenatal de algunas translocaciones;
- ❖ el planteamiento de una posible exposición a agentes inductores de este tipo de daño durante el desarrollo embrionario;
- ❖ la asociación encontrada entre la exposición a plaguicidas y un incremento en el riesgo a desarrollar Leucemia;
- ❖ el reporte de que los plaguicidas pueden favorecer la formación de translocaciones.

PLANTEAMIENTO

En los últimos años, en México, como en otros países, se ha ido incrementado el uso indiscriminado de plaguicidas y, como consecuencia del incremento de sitios contaminados por este tipo de compuestos, así como por el establecimiento de corredores industriales en áreas rurales y por la concentración de vehículos automotores en las ciudades, por citar algunos ejemplos, el tema de la exposición ambiental ha ido cobrando cada vez más importancia sumándose a la exposición laboral, situación que representa una situación alarmante. Como una consecuencia de ello, las mujeres en gestación frecuentemente están expuestas a compuestos tóxicos que ponen en riesgo a sus hijos nonatos. El desarrollo embrionario es un periodo de gran susceptibilidad para la integridad del embrión debido a la activa proliferación celular y a la compleja regulación génica que tiene lugar, en relación con la formación y diferenciación de los distintos tejidos. La exposición de la madre a compuestos tóxicos y genotóxicos durante esta etapa representa un peligro real para ambos, ya que la mayoría de estos compuestos son liposolubles, de tal forma que atraviesan las membranas celulares con facilidad y alcanzan sus blancos moleculares, lo que ocasiona una serie de alteraciones que pueden ir desde malformaciones físicas hasta el mal funcionamiento de las células e incluso de órganos o tejidos. Los estudios en gemelos monocigóticos con Leucemia y en tarjetas Guthrie revelaron el origen prenatal de tres translocaciones asociadas a Leucemia en infantes (MLL-AF4) y en niños (TEL-AML1, AML1-ETO), por lo que son consideradas eventos iniciadores o tempranos del proceso leucemogénico. Esto ha llevado a plantear la posibilidad de que este tipo de daño puede ser consecuencia de una exposición a compuestos tóxicos; entre ellos, los plaguicidas. Sin embargo, no se conoce si estas translocaciones podrían tener utilidad como biomarcadores para predecir el riesgo a desarrollar Leucemia en infantes y niños como consecuencia de exposición a genotóxicos en la etapa prenatal. Para saber lo anterior, primero habría que establecer si los niños nacidos de madres expuestas a compuestos tóxicos que han sido relacionados con el riesgo a desarrollar Leucemia presentarían, al nacer, las translocaciones que han sido asociadas a este cáncer. Por todo lo anterior, en el presente estudio es de interés evaluar cómo la exposición a plaguicidas, grupo de compuestos que ha sido correlacionado con este riesgo, podría influir en la ocurrencia de tres translocaciones cromosómicas en neonatos que, a través de sus madres, estuvieron expuestos durante la gestación.

HIPÓTESIS

Neonatos expuestos prenatalmente a diversos plaguicidas organoclorados presentarán alguna de las tres translocaciones asociadas a Leucemias en infantes y niños: MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO.

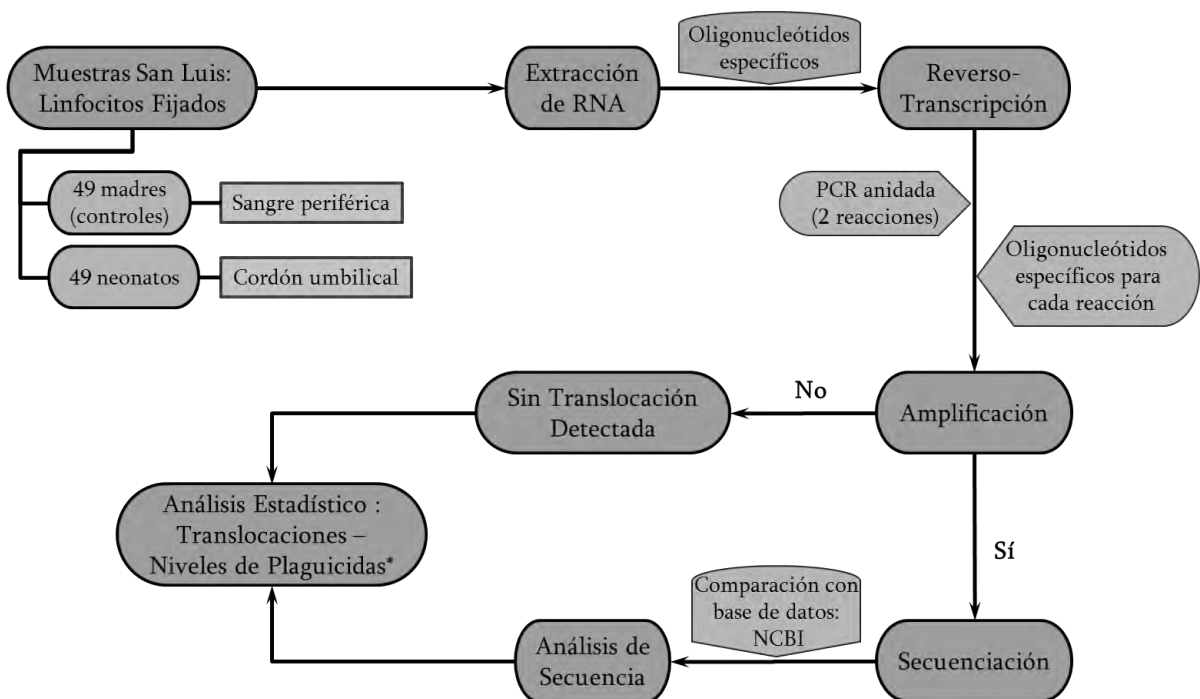
OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de los transcritos de las translocaciones MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO en neonatos expuestos prenatalmente a plaguicidas organoclorados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Montar y estandarizar la metodología para detectar los transcritos de las translocaciones MLL-AF4, TEL-AML1 y AML1-ETO en líneas celulares conocidas.
- ✓ Determinar con qué frecuencia se presentan las translocaciones estudiadas en muestras de recién nacidos y sus madres.
- ✓ Determinar si el régimen de exposición a plaguicidas puede causar la presencia de estas translocaciones asociadas con el desarrollo de Leucemia en infantes y niños.

DISEÑO EXPERIMENTAL



* Los niveles de plaguicidas en las muestras maternas y de neonatos se evaluaron en un estudio previo (*Anexo 13*) [147].

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRAS DE LOS DONANTES

Las muestras evaluadas fueron linfocitos fijados en solución de Carnoy (3:1, Metanol : Ácido Acético) de un grupo comprendido por 49 binomios madres-neonatos sanos, residentes de la región de Río Verde y San Bernardo en San Luis Potosí, expuestos a plaguicidas del grupo de los organoclorados. Los linfocitos fijados corresponden a un estudio previo en donde se realizaron de cultivos de sangre periférica materna y de sangre de cordón umbilical [147]. Las muestras maternas se utilizaron como grupo control con base en el siguiente criterio: Aun cuando se encontraban bajo una exposición crónica a plaguicidas, las mujeres no tenían diagnóstico de Leucemia al momento de tomar las muestras, por lo que no se espera detectar las translocaciones en ellas. Las características generales de la población y los datos de los niveles de plaguicidas se obtuvieron de un estudio previo (*Anexo 12*) [147].

LÍNEAS CELULARES

Como controles positivos para las translocaciones, se utilizaron 3 líneas celulares comerciales adquiridas en ATCC®: RS4;11 (Cat. No. CRL-1873™) para la translocación t(4;11)(q21;q23), Reh (Cat. No. CRL-8286™) para t(12;21)(p13-q22) y Kasumi-1 (Cat. No. CRL-2724™) para t(8;21)(q22;q22). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio completo RPMI-1640 (ATCC Cat. No. 30-2001) suplementado con 10% de suero fetal bovino (ATCC Cat. No. 30-2020) para RS4;11 y Reh, y con 20% para Kasumi-1. Una vez que se alcanzó un total de 10 millones de células, por línea celular, se prosiguió a congelarlas en nitrógeno líquido a una concentración de 1 millón de células por cada 100 µl, para su uso posterior.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Muestras de Linfocitos Fijados

Para la obtención del RNA total, se extrajo el fijador de los linfocitos y se homogenizó en 1 ml de TRIzol Reagent® (Invitrogen™) dejando reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich®) y se incubó por 3 minutos a la misma temperatura. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa de cada muestra a la cual se le adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich®) para precipitar el RNA a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el alcohol isopropílico y el botón de RNA se resuspendió en 1 ml de etanol (Sigma-Aldrich®) al 75% (v/v, agua libre de nucleasas, GIBCO BRL). Seguido a ello se centrifugó a 9,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se retiró el etanol dejando secar el botón, a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente la muestra se diluyó en 30 µl de agua libre de nucleasas.

Líneas Celulares

La muestra de cada línea celular previamente conservada en nitrógeno líquido fue descongelada a 37°C en un baño María. De cada una de ellas se tomaron 100 µl de las células de cada línea celular para

obtener el RNA. La extracción se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento empleado para los linfocitos fijados.

Cuantificación de RNA Total

La cantidad de RNA total se cuantificó utilizando un NanoDrop® ND-1000. La pureza se determinó con los valores de relación de absorbancias 260/280.

SÍNTESIS DE CDNA A PARTIR DEL RNA TOTAL (REVERSO-TRANSCRIPCIÓN, RT)

En la síntesis del cDNA se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada translocación (Tabla M-1) publicados con anterioridad [36]. Por muestra, se tomó un 1 µg de RNA total por muestra a la que se le adicionó lo siguiente: 2.5 pmoles de cada oligonucleótido específico, 0.1 mM de mezcla de dNTP's (Invitrogen™) y agua libre de nucleasas. Las muestras se calentaron a 65°C durante 5 minutos y, posteriormente, se agregaron 4 µl de Buffer First-Strand (Invitrogen™) y 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen™), incubando a 37°C por dos minutos. Se adicionó 1 µl de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen™) obteniendo así un volumen total de 25 µl; las muestras se incubaron a 37°C por 50 minutos. La reacción se detuvo calentando las muestras a 70°C durante 15 min. Para concluir, la mezcla se llevó a un volumen final de 50 µl.

PCR ANIDADA

Para la amplificación de los transcritos se realizó una PCR anidada con dos reacciones por translocación. En el caso de los transcritos de TEL-AML1 y de AML1-ETO se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (un par por reacción), mientras que para el transcrito MLL-AF4, se emplearon dos tríos de oligonucleótidos (un trío por reacción, Tabla M-1); todos reportados con anterioridad [36]. En las muestras maternas y de neonatos se realizó la evaluación de cada una de las tres translocaciones por triplicado y de forma independiente. Aunado a lo anterior y paralelamente a los triplicados, se amplificó el control positivo de cada translocación y un control negativo que consistió en una mezcla con todos los reactivos pero sin cDNA.

Primer Reacción

Se preparó una mezcla con lo siguiente: 5 µl de cDNA, 0.5 mM de cada oligonucleótido para la reacción 1, 0.5 mM de mezcla de dNTP's ((Invitrogen™)), 0.5 U de Platinum ® *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen™), 2 µl de amortiguador de reacción (1 mM de MgCl₂) y agua libre de nucleasas obteniendo un volumen final de 20 µl.

Segunda Reacción

La mezcla se preparó con lo siguiente: 2 µl de la mezcla de la reacción 1, 0.4 mM de cada oligonucleótido para la reacción 2, 0.4 mM de mezcla de dNTP's, 0.5 U de Platinum ® *Taq* DNA Polimerasa, 2 µl de amortiguador de reacción (1 mM de MgCl₂) y agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 24 µl.

Los programas para cada reacción se presentan en la Tabla M-2.

Tabla M-1. Oligonucleótidos utilizados para la (RT)-PCR de la translocaciones estudiadas. Con base en *Pallisaard y cols.* [36].

Reverso Transcripción		
Translocación (Gen fusionado)	Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'
t(4;11) (MLL-AF4)	AF4:1664L12	TTCCTTGCTGAG
T(12;21) (TEL-AML1)	AML1A:1921L12	CGG TAG CAT TTC
t(8;21) (AML1-ETO)	ETO:350L12	GTG CGA ACT CTT

PCR Anidada				
REACCIÓN 1			REACCIÓN 2	
Translocación (Gen fusionado)	Oligo*	Secuencia 5' – 3'	Oligo*	Secuencia 5' – 3'
t(4;11) (MLL-AF4)	FW- MLL	CCG CCT CAG CCA CCT ACT AC	FW-MLL	GGA CCG CCA AGA AAA GAA GT
	FW- MLL2	AGC ACT CTC TCC AAT GGC AAT AGT	FW-MLL2	AGC AGA TGG AGT CCA CAG GAT CAG
	RV-AF4	GAA TTT GAG TGA GTT TTT GAA GAT GTA TC	RV-AF4	GTT TTT GGT TTT GGG TTA CAG AAC T
T(12;21) (TEL-AML1)	FW-TEL	CAC TCC GTG GAT TTCAA A CAG TC	FW-TEL	CTCATCGGG AAG ACC TGG CTT AC
	RV-AML1A	GAT GGC ACT CTG GTC ACT GTG	RV-AML1A	TGG CTG GCA ATG ATG AAA AC
t(8;21) (AML1-ETO)	FW-AML1	GAT GGC ACT CTG GTC ACT GTG	FW-AML1	TGG CTG GCA ATG ATG AAA AC
	RV-ETO	TCT CCT ATC TCG GGT GAA ATG TC	RV-ETO	CGT TGT CCG TGT AAA TGA ACT G

* Oligo = Oligonucleótido

Tabla M-2. Programas utilizados para la amplificación por PCR anidada de las translocaciones. Modificado de *Pallisaard y cols.* [36].

Programa de PCR	
Reacción 1	Reacción 2
T°1: 94° - 2 min	T°1: 94° - 2 min
T°2: 94° - 30 s	T°2: 94° - 30 s
T°3: 58° - 30 s	T°3: 58° - 30 s
T°4: 72° - 1 min	T°4: 72° - 1 min
25 ciclos	24 ciclos
T°5: 72° - 1 min	T°5: 72° - 3 min

VISUALIZACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES

Para saber si hubo amplificación de transcritos, se tomaron 15 µl de cada mezcla de la segunda reacción y se colocaron en un gel de agarosa (BIO-RAD) al 3% (g/v); éste se corrió en una electroforesis durante 50 minutos a 85 voltios y, posteriormente, se tiñó con bromuro de etidio (Invitrogen™) (0.005%, v/v) y se expuso a luz ultravioleta utilizando un UV Transilluminator 2000, BIO-RAD. Cada imagen fue documentada con el programa Kodak 1D Image Analysis Software Version 3.6.5 K2.

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La presencia de translocaciones fue confirmada mediante la secuenciación de los fragmentos de cDNA amplificados en un equipo para secuencia Applied Biosystems modelo 310; este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las secuencias fueron comparadas con las reportadas, para cada gen, en la base de datos de la NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés) [148]. Las secuencias de los controles positivos, de cada línea celular, también fueron enviadas a secuenciar.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA

Para determinar la sensibilidad de la (RT)-PCR, se realizó por duplicado una serie de cinco diluciones 1:10, con respecto a la anterior, de las células de líneas celulares en linfocitos de un donador sano. A partir de estas diluciones y un control negativo, que comprende sólo los linfocitos del donador, se llevó a cabo la extracción de RNA, la obtención de cDNA y la amplificación de los fragmentos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la posible asociación entre la presencia/ausencia de las translocaciones evaluadas y la concentración de los niveles de 15 organoclorados, detectados en suero de sangre materna y de cordón umbilical (*Anexo 12*), se aplicó la prueba Mann-Whitney empleando el programa STATA 7.

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN

En una prueba inicial se corroboró que cada línea celular empleada como control positivo, efectivamente portara la translocación a evaluar mediante la amplificación y visualización del transcrito de interés (Imagen R-1), seguido por la secuenciación de cada uno de ellos (Figuras S-1, S-2 y S-3). Además, en este último paso se caracterizó cada uno de los eventos y se determinaron los exones involucrados en las translocaciones estudiadas, lo que sirvió como marco de referencia para las muestras estudiadas.

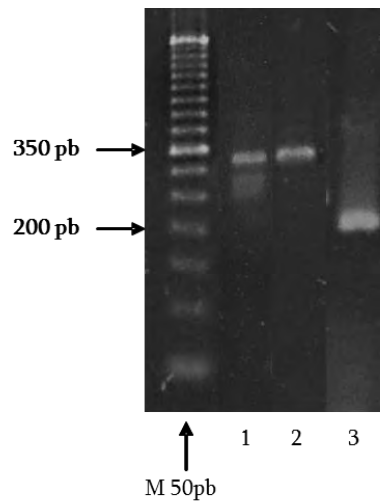


Imagen R-1. Amplificación por (RT)-PCR de los transcritos de las translocaciones TEL-AML1 (1), AML1-ETO (2) y MLL-AF4 (3) detectados en las líneas celulares Reh, Kasumi-1 y RS4;11, respectivamente. *M*: marcador, *pb*: pares de bases

TEL-AML1

El control positivo de la translocación TEL-AML1 se obtuvo de la línea celular Reh. El fragmento de este transcrito consistió en 306pb. Se encontró conformado por los últimos 76 nucleótidos del extremo 3' del exón 5 de TEL, así como del exón 3 y los primeros 186 nucleótidos del extremo 5' del exón 4b de AML1; los primeros 5 nucleótidos del extremo 5' del fragmento no coincidieron con la secuencia de TEL (Imagen R-1 y Figura S-1).

Control Positivo: Fragmento del Transcrito de la Translocación TEL-AML1

A)

```

5'          TEL
          Exón 5
AAAAA|CTGGCTTACATGAACCACATCATGGTCTCTGTCTCCCCGCTGAAGAGCAGCCA
          TEL  AML1
          Exón 5 Exón 3
TGCCCATGGGAGAATAGCAG|AATGCATACTTGAATGAATCCTTCTAGAGACGTCCACG|
          Exón 4b
|ATGCCAGCACGAGCCGCCGCTTACGCCGCCTTCCACCGCGCTGAGCCCAGGCAAGATGA

GCGAGGCGTTGCCGCTGGGCGCCCCGACGCCGGCGCTGCCCTGGCCGGCAAGCTGAGGA

GCGGCGACCGCAGCATGGTGGAGGTGCTGGCCGACCAACCGGGCGAGCTGGTGCGCACC
          AML1 3'
          Exón 4b
GACA|CCC
  
```

N|N – termina un exón e inicia otro.

N|N – nucleótido que no coincide con la base de datos.

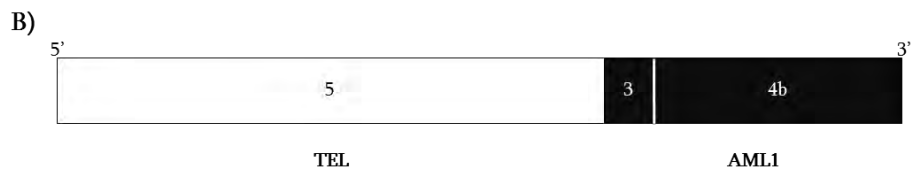


Figura S-1. Control positivo: transcrito de la translocación TEL-AML1 obtenido de la línea celular Reh. A) Secuencia del transcrito: TEL, exón 5; AML1, exones 3 y 4b. B) Reconstrucción gráfica del transcrito amplificado de la translocación: TEL en blanco, AML1 en negro.

AML1-ETO

El control positivo para la translocación AML1-ETO se obtuvo a partir de la línea celular Kasumi-1. El fragmento de este transcrito fue de 331pb. Incluyó los últimos 111 nucleótidos del extremo 3' del exón 5 y el exón 6 completo de AML1, así como los primeros 113 nucleótidos del extremo 5' del exón 4b de ETO; los últimos dos nucleótidos del extremo 3' del fragmento no coincidieron con la secuencia reportada de ETO (Imagen R-1 y Figura S-2).

Control Positivo: Fragmento del Transcrito de la Translocación AML1-ETO

A)

```

5' AML1
   Exón 5
TGGCTGGCAATGATGAAAACTACTCGGCTGAGCTGAGAAATGCTACCGCAGCCATGAAG

                                     Exón 5, Exón 6
AACCAGGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTGGTTCGAAAGTGAAGAGGGAAAAG

CTTCACTCTGACCATCACTGTCTTCAGAAACCCACCGCAAGTCGCCACCTACCAGAGAGCC

                                     AML1   ETO
                                     Exón 6, Exón 4b
ATCAAAATCACAGTGGATGGGCCCGAGAACCCTCGAAATCGTACTGAGAAGCACTCCACA

ATGCCAGACTCACCTGTGGATGTGAAGACGCAATCTAGGCTGACTCCTCCAACAATGCCA

                                     ETO   3'
                                     Exón 4b
CCTCCCCAACTACTCAAGGAGCTCCAAGACG
  
```

N – termina un exón e inicia otro.

NV – nucleótido que no coincide con la base de datos.

B)



Figura S-2. Control positivo: transcrito de la translocación AML1-ETO obtenido de la línea celular Kasumi-1. A) Secuencia del transcrito: AML1, exones 5 y 6; ETO, exón 4b. B) Reconstrucción gráfica del transcrito amplificado de la translocación: AML1 en negro, ETO en blanco.

MLL-AF4

El control positivo para la translocación MLL-AF4 se obtuvo de la línea celular RS4;11. El tamaño del fragmento de este transcrito consistió en 428pb. Estuvo integrado por los últimos 77 nucleótidos del extremo 3' del exón 7, y los exones 8 y 9 de MLL, así como por los exones 4, 5 y los primeros 12 nucleótidos del exón 6 de AF4; el primer nucleótido del extremo 5' del fragmento no coincidió con la secuencia de MLL (Imagen R-1 y Figura S-3).

Control Positivo: Fragmento del Transcrito de la Translocación MLL-AF4

A)

```

5' MLL
   Exón 7
   TGGACCGCCCTGGAAA TGAAGTTCCGAAAACCACTCCTAGTGAGCCCAAGAAAAAGCAG

                               Exón 7 Exón 8
   CCTCCACCACCAGAATCAG|GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAAGTGGCTCCCGCCC

                               Exón 8 Exón 9
   AAGTATCCCTGTCAAACAAAAACCAAAGAAAAG|GAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGC

   AGGAGAATGCAGGCACTTTGAACATCTCAGCACTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGC

                               MLL AF4
                               Exón 9 Exón 4
   AAAAAATTCTAGCAGATGGAGTCCTCAGGATCAGAGTGACTTTAAG|CAGACCTACTCCA

                               Exón 4 Exón 5
   ATGAAGTCCATTGTGTTGAAGAGATTCTGAAG|GAAATGACCCATTTCATGGCCGCCTCCTT

                                               Exón 5 Exón 6
   TGACAGCAATACATACGCCTAGTACAGCTGAGCCATCCAAGTTTCCTTTCCTACAAAG|G

   AF4 3'
   Exón 6
   ACTCTCAGCAT
  
```

N|N – termina un exón e inicia otro.

N|N – nucleótido que no coincide con la base de datos.

B)

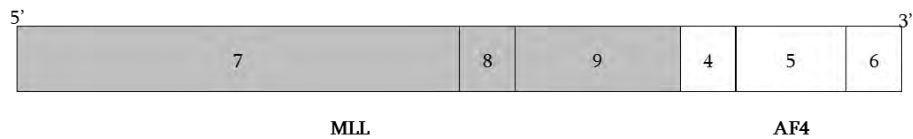


Figura S-3. Control positivo: transcrito de la translocación MLL-AF4 obtenido de la línea celular RS4;11. A) Secuencia del transcrito: MLL, exones 7-9; AF4, exones 4-6. B) Reconstrucción gráfica del transcrito amplificado de la translocación: MLL en gris, AF4 en blanco.

ESTUDIO DE LAS MUESTRAS

De los 49 binomios madre-hijo evaluados (en total 98 muestras procesadas), se encontró que 14 individuos presentaron amplificación de, por lo menos, una de las translocaciones estudiadas. Sorpresivamente, 6 de ellas correspondían a las madres (n=49), en donde la translocación con mayor frecuencia fue MLL-AF4 (6.12%), seguida de AML1-ETO (4.08%) y TEL-AML1 (2.04%) (Tabla R-1). Por otra parte, en los 8 neonatos (n=49) en quienes se detectaron estos eventos, la translocación más frecuente fue AML1-ETO (10.2%), seguida de MLL-AF4 (8.16%) y, en el caso de TEL-AML1, ésta no se detectó en el grupo (Tabla R-1). Además, los bebés que presentaron alguno de estos eventos no eran hijos de madres con translocación, es decir, no hubo concordancia entre alguno de los binomios.

Muestra	Translocación		
	MLL-AF4	TEL-AML1	AML1-ETO
Neonatos	4 (8%)	0 (0%)	5 (10%)
Mamás	3 (6%)	1 (2%)	2 (4%)

En 13 personas (6 mamás y 7 neonatos) se detectó la presencia de una translocación; un bebé, B13, presentó amplificación en dos translocaciones, MLL-AF4 y AML1-ETO. (Tabla R-2).

Muestra materna	Translocación			Muestra neonato	Translocación		
	MLL-AF4	TEL-AML1	AML1-ETO		MLL-AF4	TEL-AML1	AML1-ETO
M1	✓			B11	✓		
M4	✓			B13	✓		✓ ^b
M9			✓	B14			✓ ^b
M10			✓	B41	✓		
M16		✓ ^a		B46	✓ ^a		
M26	✓			B47			✓ ^b
				B48			✓ ^c
				B49			✓

M – mamá; B – neonato.

a. Amplificación en 2 réplicas.

b. Amplificación en 2 réplicas pero muy tenues y que no pudieron ser secuenciadas.

c. Amplificación en una réplica, muy tenue y que no pudo ser secuenciada.

SECUENCIACIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES DETECTADAS POR (RT)-PCR

TEL-AML1

Sólo una muestra materna presentó esta translocación en dos de las tres réplicas (M16), por lo que ambas se enviaron a secuenciar. Dado que ambas muestras revelaron el mismo evento, sólo se reporta una de ellas a detalle. El fragmento estuvo integrado por 326 nucleótidos e incluía los últimos 91 nucleótidos del extremo 3' del exón 5 de TEL, así como el exón 3 y los primeros 189 nucleótidos del extremo 5' del exón 4a de AML1. Los primeros 5 nucleótidos del extremo 5' y los últimos 3 del 3' del fragmento no coincidieron con las secuencias reportadas. Así, las dos secuencias revelaron la presencia del evento de translocación entre el exón 5 de TEL y el exón 3 de AML1 (Figura S-4).

Secuencias de la Muestra M16: TEL-AML1

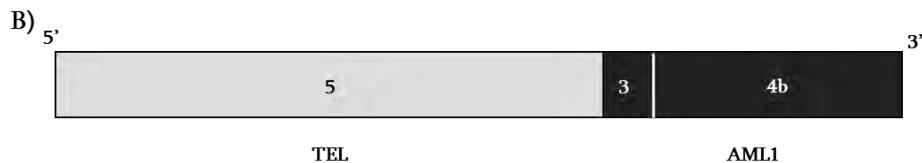
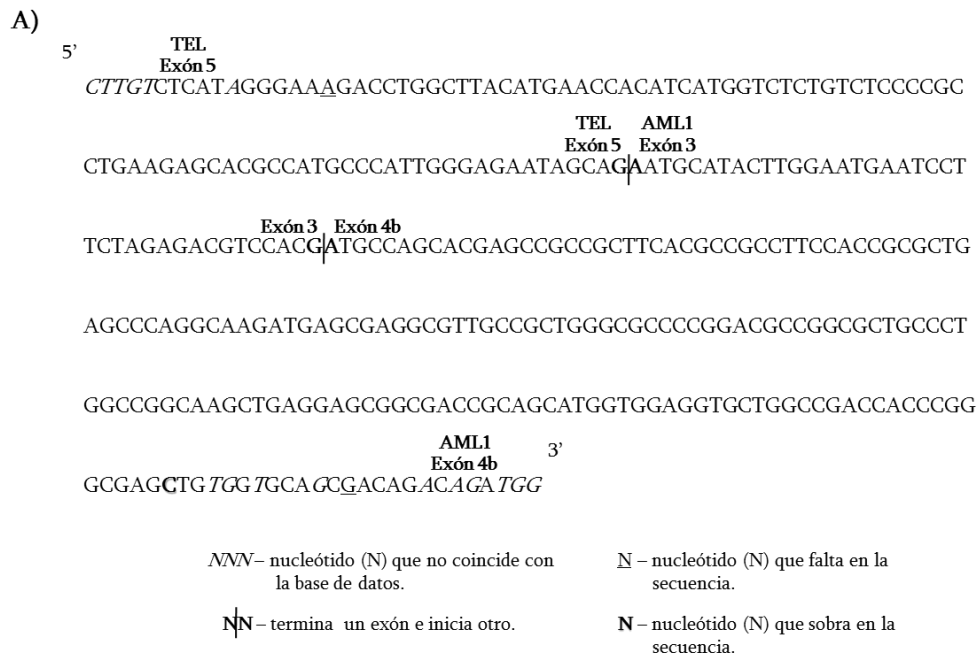


Figura S-4. Muestra M26: Translocación TEL-AML1. A) Secuencia del producto amplificado de M26: exón 5 de TEL y exones 3 y 4b de AML1. B) Reconstrucción gráfica del fragmento del transcrito amplificado (exón de TEL en blanco; exones de AML1 en negro).

AML1-ETO

Únicamente 3 de las 7 muestras (2 maternas y 1 neonato), que presentaron la amplificación de esta translocación, pudieron ser re-amplificadas para su posterior secuenciación.

Muestra materna M9. Se obtuvo un fragmento de 403 nucleótidos que correspondió a los últimos 98 nucleótidos del extremo 3' del exón 5 más el exón 6 de AML1; seguido a la secuencia de AML1, se detectó la presencia de los nucleótidos 255 al 437 del extremo 5' del exón 4a de ETO, por lo que se observó una delección de los primeros 254 nucleótidos de este exón. Los primeros 15 nucleótidos del extremo 5' y los últimos 3 nucleótidos del 3' del fragmento no correspondieron con las secuencias reportadas (Figura S-5).

Muestra materna M10. El fragmento fue de 397 nucleótidos y estuvo integrado por los últimos 111 nucleótidos del extremo 3' del exón 5 y por el exón 6 de AML1. Así mismo, se encontraron los nucleótidos 255 al 435 del extremo 5' del exón 4a de ETO por lo que, al igual que en la muestra M9, se detectó una delección de los primeros 254 nucleótidos del exón 4a (Figura S-6).

Muestra neonatal B49. La secuencia del producto contenía 335 nucleótidos y comprendió los últimos 111 nucleótidos del extremo 3' exón 5 más el exón 6 de AML1, así como los primeros 110 nucleótidos del extremo 5' del exón 4b de ETO. El primer nucleótido del extremo 5' y los últimos 7 del 3' del fragmento no coincidían con las secuencias reportadas (Figura S-7).

Así, las secuencias de las muestras maternas mostraron la participación del exón 6 de AML1 con parte del exón 4a de ETO (Figura S-5 y S-6). En el caso de la muestra del neonato que fue secuenciada, se encontró que el evento de translocación se da entre el exón 6 de AML1 y el exón 4b de ETO (Figura S-7).

De las otras 4 muestras, todas pertenecientes a los bebés, se observó lo siguiente:

Una de las muestras mostró amplificación en una de las tres réplicas (B48), mientras que en las otras 3 (B13, B14 y B47) se detectó la amplificación en dos de las tres réplicas (Tabla R-2); sin embargo, no se logró obtener la reamplificación de ninguno de los productos observados en el gel de agarosa, por lo que no se pudo caracterizar la translocación de estas muestras.

Secuencia de la Muestra M9: AML1-ETO

A)

```

5'
      AML1
      Exón 5
TTCGCTGGCAAGGGGTGAAAACACTACTCGGCTGAGCTGAGAAATGCTACCGCAGCCATGA

      Exón 5, Exón 6
AGAACCAGGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTTCGGTTCGAAGTGGAAGAGGGAAA

AGCTTCACTCTGACCATCACTGTCTTCACAAACCCACCGCAAGTCGCCACCTACCACAGA

      AML1   ETO
      Exón 6 Exón 4a
GCCATCAAAATCACAGTGGATGGGCCCCGAGAACCTCGAAAGCTCTTGCTAACATTGGCTT

CAGCTTCGAGTGCAGTTGTGCTGCTGCATATAACACTACCAAGGTAGCATCTGCCTAAGC

CAGAAAATAACAATAGGATATAATATAACCTAGTTACAAATGAGGTGCTGCCATCTGTGCT

ATACCTTCTFAAGTGGGGTTTTGGATGATAAAAATCCTGATTTAAACGTCAGTAGATAAGTG

TATTTTATFGATAGAAGATGTTGAATTTCTTCTGTTCACTTGCTTTTTAAAAAAGATAAAAC

CCACTTGAAAAACATGAGGATGCTTAAGGAGTAAAATAATATGTTCTGTTGCCATCCTC

CAGATCGTACTGAGAAGCACTCCACAATGCCAGACTCACCTGTTGGATGGCAAGACGCAA

      ETO   3'
      Exón 4a
GTCTAGGCTGACTCCTCCAACAATGCCACCTCCCCCAACTACTCAAGGAGCTCCAAGAC
    
```

NNN- nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.

N̄ - nucleótido (N) que falta en la secuencia.

⊥N - termina un exón e inicia otro.

N - nucleótido (N) que sobra en la secuencia.

NNN - ausencia de nucleótidos (N) en el exón

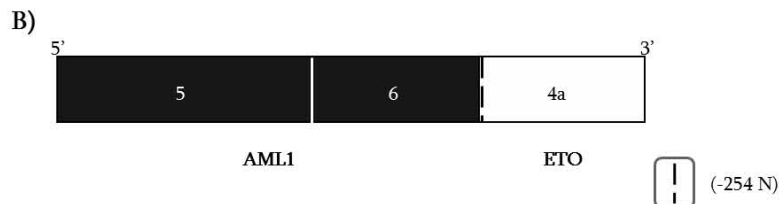


Figura S-5. Muestra M09: Translocación AML1-ETO. A) Secuencia del producto amplificado: exones 5 y 6 de AML1 y parte del exón 4a de ETO, el cual presenta una delección de 254 nucleótidos (N). B) Reconstrucción gráfica del fragmento del transcrito amplificado (exones de AML1 en negro; exón de ETO en blanco).

Secuencia de la Muestra M10: AML1-ETO

A)

5' AML1
Exón 5
TGGGTGGCAGGGATGAAAACACTACTCGGCTGAGCTGAGAAATGCTACCGCAGCCATGAAG

AACCAGGTTGCAAGATTTAATGACCTCAGGTTTGTGGTCTGAAGTGAAGAGGGAAAAAG
Exón 5, Exón 6

CTTCACTCTGACCATCACTGTCTTCACAAACCCACCGCAAGTCGCCACCTACCACAGAGC

CATCGAAATCACAGTGGATGGGCCCGAGAACCTCGAAAGCTCTTGCTAACATTGGCTTC
AML1 ETO
Exón 6, Exón 4a

AGCTTCAGTGCAGTTGTGCTGCTGCATATAAGACTAGCAAGGTAGCATCTGCCTAAGC

CAGAAATAACAATAGGATATAATATAACCTAGTTACAAATGAGGTCCTGCCATCTGTGG

TATACCTTCTTAAGTGGGTTTGGATGATAAAATCCTGATTTAAACGTCAGTAGATAAG

TGTATTTTATTGATAGAAAGATGTTGAATTTCTTCTGTTCACTTGCTTTTAAAAAAGATAA

ACCCCACTTGAAGAACTGAGGTGCTTAAGGAGTAAAATAATATGTTCCCTGGTGGCATCC

TCCAGATCGTACTGAGAAGCACTCCACAATGCCAGACTCACCTGTGGATGTGAAGACGC

AATCTAGGCTGACTCCTCCAACAATGCCACCTCCCCCACTACTCAAGGAGCTCCAAGA
ETO
Exón 4a 3'

NVN – nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.

N|N – termina un exón e inicia otro.

NNN – ausencia de nucleótidos (N) en el exón

B)



Figura S-6. Muestra M10: Translocación AML1-ETO. A) Secuencia del producto amplificado: exones 5 y 6 de AML1 y parte del exón 4a de ETO, el cual presenta una delección de 254 nucleótidos (N). B) Reconstrucción gráfica del fragmento del transcrito amplificado (exones de AML1 en negro; exón de ETO en blanco).

Secuencia de la Muestra B13: Rearreglo de MLL

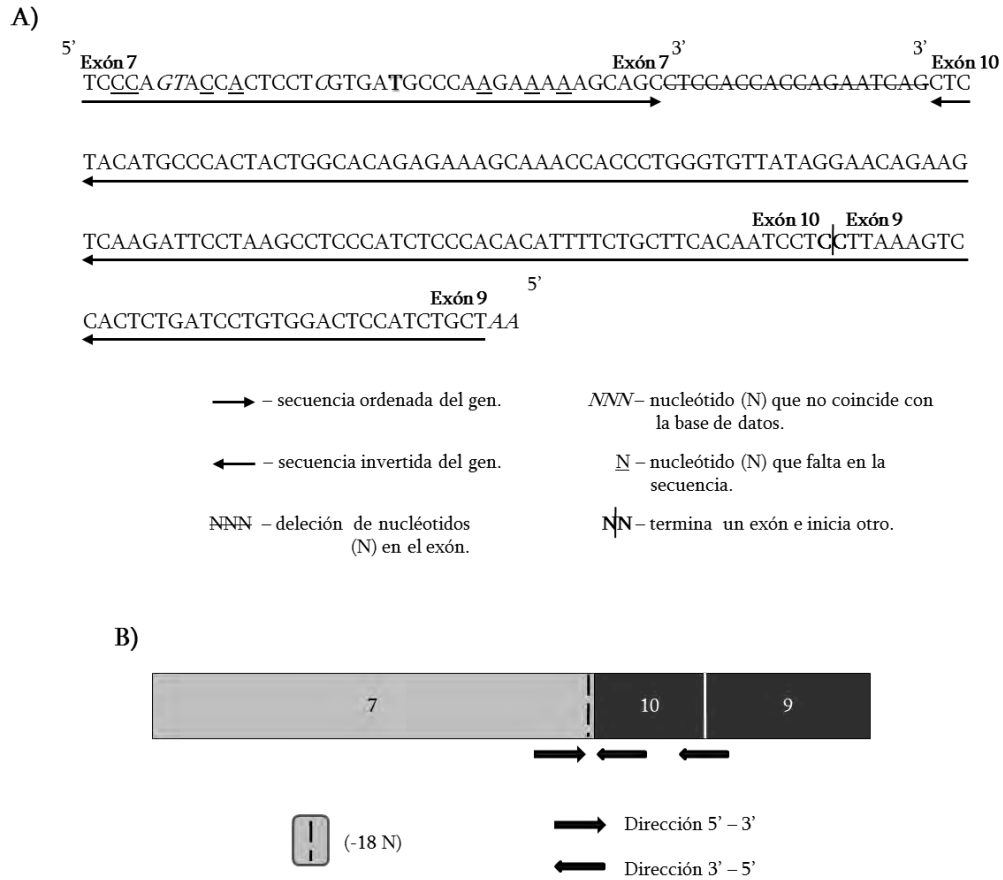
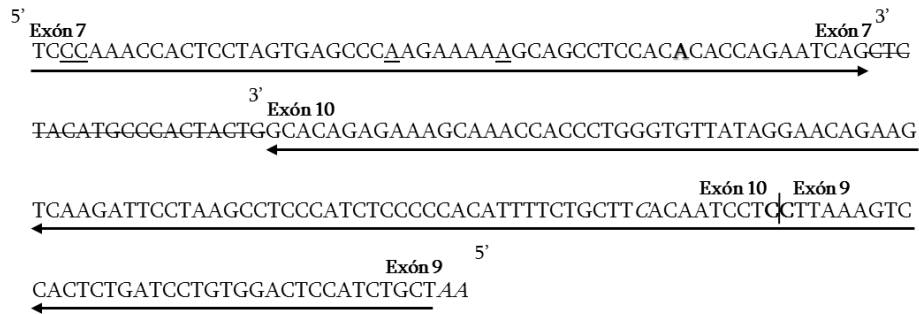


Figura S-9. Muestra B13: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado: exón 7 con dirección 5'- 3' (región ordenada), presenta una delección de 18 nucleótidos (N) en el extremo 3'; exones 9 y 10 con dirección 3'- 5' (región invertida). B) Reconstrucción gráfica del fragmento amplificado del transcrito del gen MLL.

Muestra M1 (Materna). El fragmento de este transcrito estuvo conformado por 190 nucleótidos. En él se detectó la secuencia ordenada de los últimos 55 nucleótidos del extremo 3' del exón 7, seguido de la secuencia invertida del exón 10 y de los últimos 37 nucleótidos del extremo 3' del exón 9; además, el exón 10 tenía una delección de los últimos 19 nucleótidos del extremo 3' (no se encontraron en la secuencia). Los últimos dos nucleótidos del fragmento no correspondieron con la base de datos (Figura S-10).

Muestra M1: Rearreglo de MLL

A)



- - secuencia ordenada del gen.
- ← - secuencia invertida del gen.
- NNN - delección de nucleótidos (N) en el exón.
- ~~NN~~ - termina un exón e inicia otro.
- NNN - nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.
- N - nucleótido (N) que falta en la secuencia.
- N - nucleótido (N) que sobra en la secuencia.

B)

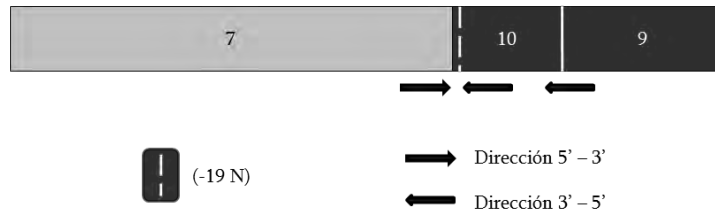


Figura S-10. Muestra M1: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado: exón 7 con dirección 5'- 3' (región ordenada), exones 9 y 10 con dirección 3'- 5' (región invertida), la secuencia del exón 10 revela una delección de 19 nucleótidos (N) en el extremo 3'. B) Reconstrucción gráfica del fragmento secuenciado del transcrito de MLL.

Muestra B46 (neonato). Esta muestra fue la única que presentó amplificación en dos de las tres réplicas. Ambos fragmentos fueron secuenciados revelando la misma secuencia, por lo que sólo se analizó uno de ellos. El tamaño del transcrito fue de 191 nucleótidos y estuvo integrado por la secuencia ordenada de los últimos 56 nucleótidos del extremo 3' del exón 7 y los primeros 50 nucleótidos del extremo 5' del exón 9; no se detectó la presencia del exón 8. La región invertida en esta muestra estuvo integrada por los primeros 45 nucleótidos del extremo 5' del exón 10 y por los últimos 37 nucleótidos del extremo 3' del exón 9. Esta fue la única inversión en donde se observó que los exones fusionados, el exón 9 ordenado y el exón 10 invertido, presentaron una delección de 82 y 64 nucleótidos respectivamente. Aunado a lo anterior, de los últimos 5 nucleótidos del exón 9 (región

lineal), cuatro de ellos presentaron homología con cuatro de los primeros 5 nucleótidos invertidos del exón (Figura S-11). Los últimos 3 nucleótidos del extremo 3' del fragmento no coincidieron con la base de datos.

Secuencia de la Muestra B46: Rearreglo de MLL

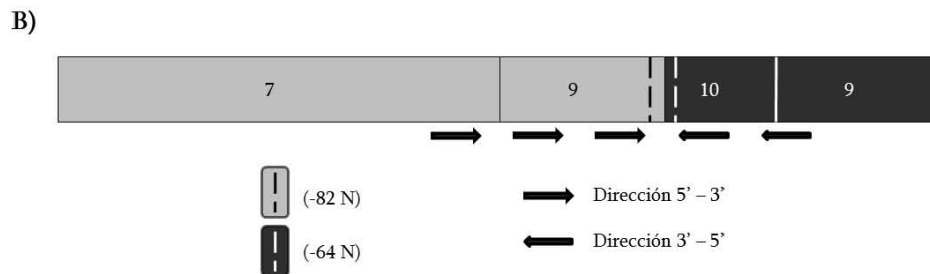
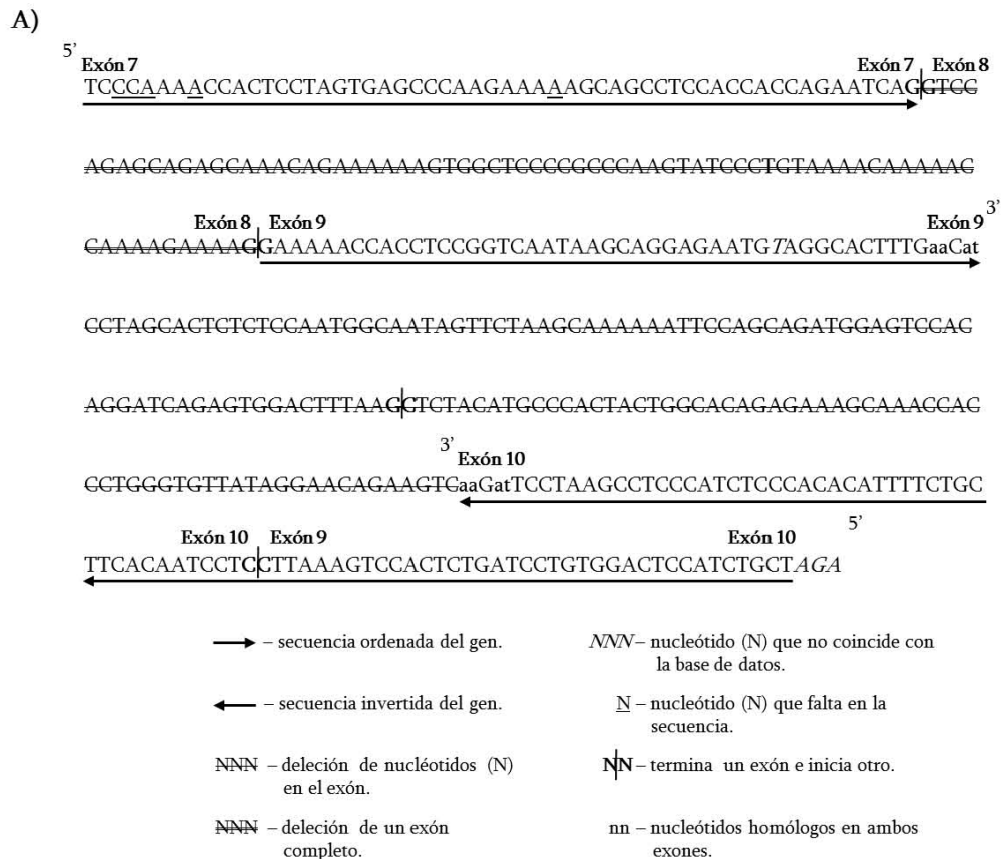
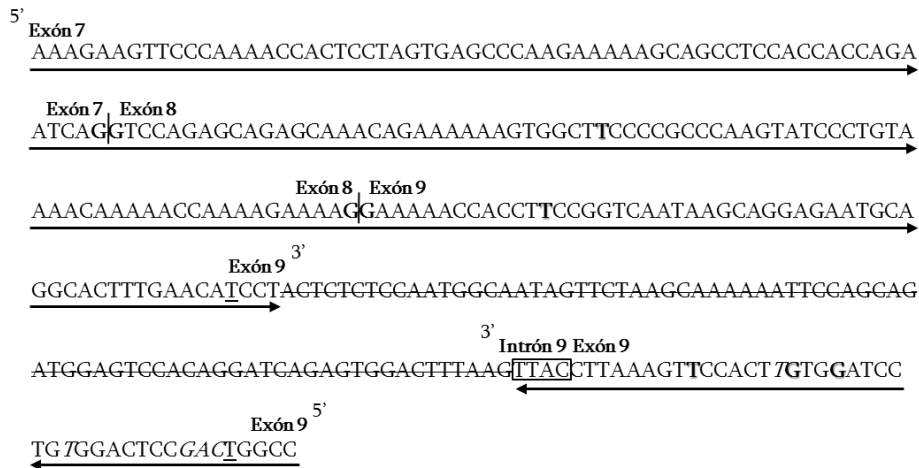


Figura S-11. Muestra B46: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado B46-1 y B46-3; ambos presentaron el mismo rearreglo. Los exones 7 y 9 con dirección 5'-3' (región ordenada); hay ausencia del exón 8 y, el exón 9, presenta una deleción de 82 nucleótidos (N) en el extremo 3'; exones 9 y 10 con dirección 3'-5' (región invertida), el exón 10 con una deleción de 64 nucleótidos (N) en el extremo 3'. El extremo 3' del exón 7 ordenado y el extremo 3' del exón 10 invertido, presentan una microhomología en 4 nucleótidos (n). B) Reconstrucción gráfica del fragmento amplificado del transcrito de MLL.

Muestras M26 (Materna) y B11 (neonato). El fragmento amplificado de M26 fue de 238 nucleótidos, mientras que el de B11 fue de 224 nucleótidos. El electroferograma de ambas muestras reveló la presencia de la secuencia ordenada los últimos nucleótidos del extremo 3' del exón 7 (64 y 55 nucleótidos respectivamente), del exón 8 y de los primeros nucleótidos del extremo 5' del exón 9 (54 y 49 nucleótidos), ya que se observó la ausencia del extremo 3' de este último (79 y 83 nucleótidos). A diferencia de las otras muestras, la secuencia invertida de M26 y B11 inició con el extremo 3' del intrón 9 (4 y 7 nucleótidos), seguido por el extremo 5' del exón 9 (41 y 37 nucleótidos) (M26: Figura S-12; B11: Figura S-13). Sólo en el extremo 3' de B11, los dos últimos nucleótidos no correspondieron con la base de datos.

Secuencia de la Muestra M26: Rearreglo de MLL

A)



- - secuencia ordenada del gen.
- ← - secuencia invertida del gen.
- NNN - delección de nucleótidos (N) en el exón.
- N|N - termina un exón e inicia otro.
- NNN - nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.
- N - nucleótido (N) que falta en la secuencia.
- N - nucleótido (N) que sobra en la secuencia.
- - nucleótidos de la región intrónica.

B)

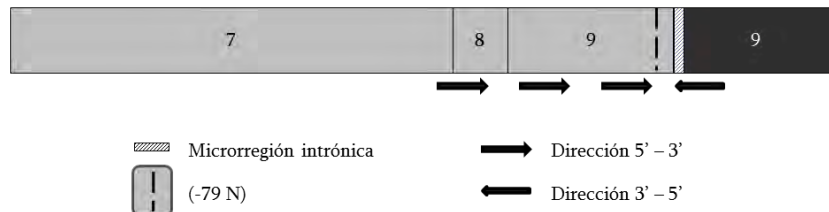
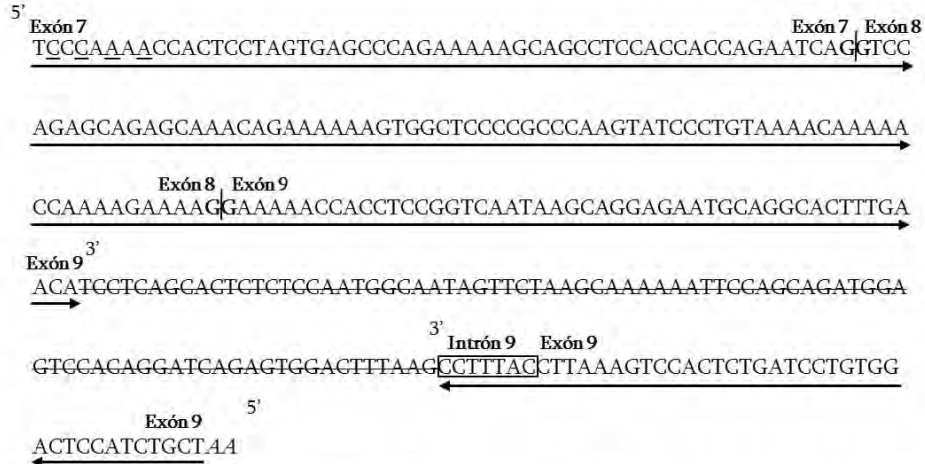


Figura S-12. Muestra M26: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado: exones 7-9, con dirección 5'- 3' (región ordenada); exón 9 presenta una delección de 79 nucleótidos (8N) en el extremo 3'; exón 9 con dirección 3'- 5' (región invertida). B) Reconstrucción gráfica del fragmento secuenciado del transcrito de MLL.

Secuencia de la Muestra B11: Rearreglo de MLL

A)



- - secuencia ordenada del gen.
- ← - secuencia invertida del gen.
- NNN - deleción de nucleótidos (N) en el exón.
- N|N - termina un exón e inicia otro.
- NNN - nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.
- N - nucleótido (N) que falta en la secuencia.
- N - nucleótido (N) que sobra en la secuencia.
- - nucleótidos de la región intrónica.

B)

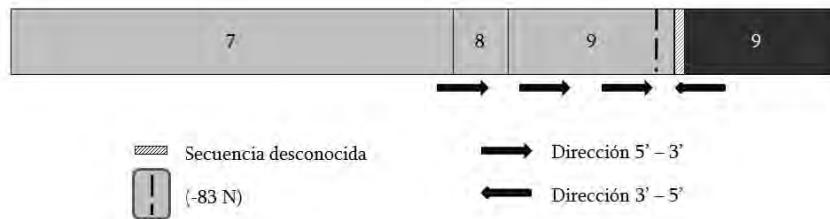


Figura S-13. Muestra B11: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado: exones 7-9 con dirección 5'-3' (región ordenada), el exón 9 presenta una deleción de 83 nucleótidos (N) en el extremo 3'; exón 9 con dirección 3'-5' (región invertida). B) Reconstrucción gráfica del fragmento amplificado del transcrito de MLL.

Muestra B41 (neonato). El fragmento fue de 259 nucleótidos. En esta muestra se encontró la secuencia ordenada de los últimos 53 nucleótidos del extremo 3' del exón 7, seguidos del exón 8 y los primeros 34 nucleótidos del exón 9, observando la ausencia de 98 nucleótidos de este exón. Sin embargo, no se puede saber si esta pérdida se debe a la presencia de una inversión o de una translocación, ya que los últimos 86 nucleótidos no coincidieron con la base de datos de MLL ni de AF4 (Figura S-13).

Secuencia de la Muestra B41: Rearreglo de MLL

A)



┆ - - ┆ - la secuencia no es determinable.

NNN- nucleótido (N) que no coincide con la base de datos.

|N- termina un exón e inicia otro.

N- nucleótido (N) que falta en la secuencia.

B)



Figura S-14. Muestra B41: Rearreglo del transcrito de MLL. A) Secuencia del producto amplificado: exones 7-9 con dirección 5'- 3' (región ordenada), el exón 9 presenta una posible delección de 98 nucleótidos (N) en el extremo 3'; sin embargo, en el electrofenograma, parte de la secuencia no es clara, por lo que no se puede determinar dicha delección, así como tampoco si hay presencia de inversión o no (región señalada con una línea punteada). B) Reconstrucción gráfica del fragmento amplificado del transcrito del gen MLL.

ASOCIACIÓN: PRESENCIA/AUSENCIA DE REARREGLOS CROMOSÓMICOS VS CONCENTRACIÓN DE ORGANOCORADOS

Características Generales de la Población

Debido a que se encontró un número pequeño de muestras con translocaciones o inversiones del gen MLL, tanto en las mamás como en los bebés, se prosiguió a trabajar con los grupos de manera independiente y formando dos subgrupos en cada uno: con rearreglo (translocación y/o inversión del gen MLL) y sin rearreglo. En el grupo de las mamás, se consideraron los siguientes parámetros poblacionales: la edad, el número de partos y el número de abortos; en el caso de los bebés, género, peso y talla. Esto con el fin de ver si alguno de ellos podría influir en la presencia de los rearreglos; sin embargo, ninguno de ellos fue significativo (Tabla R-3).

Tabla R-3. Características Generales de la Población de Estudio.

Característica	Mamás sin rearreglo ¹		Mamás con rearreglo	
	Media	DE ²	Media	DE
Edad	23.372	4.845	23.833	6.338
# partos	2.209	1.641	3.167	2.317
#abortos	0.209	0.209	0.167	0.408
Característica	Neonatos sin rearreglo		Neonatos con rearreglo	
	Media	DE	Media	DE
Peso (kg)	3.024	0.542	3.167	0.394
Talla (cm)	51.098	3.700	51.571	1.718
Sexo	N	%	N	%
Masculino	19	46.34	3	37.5
Femenino	22	53.66	5	62.5

¹Rearreglo: Translocaciones TEL-AML1, AML1-ETO o inversiones del gen MLL.
²DE: Desviación Estándar.

Aunado a lo anterior, se evaluó la posibilidad de una asociación entre estos eventos y la concentración detectada en suero de 15 organoclorados reportada en las mismas muestras de sangre materna y de cordón umbilical [147]. En cada grupo, mamás y neonatos, se aplicó la prueba de Mann-Whitney para cada plaguicida y para la sumatoria de éstos; sin embargo, no se encontró alguna diferencia significativa en ninguno de ellos (Tabla R-4).

Tabla R-4. Concentración¹ de 15 organoclorados (en ng/g de lípidos), y la sumatoria de éstos, detectada en las madres y neonatos con y sin translocaciones (t) o reaarreglos de MLL (r).

Plaguicida	Mamás con t/r Media (DE ²)	Mamás sin t/r Media (DE)	Neonatos con t/r Media (DE)	Neonatos sin t/r Media (DE)
α -HCH	5.48 x 10 ² (5.50 x 10 ²)	4.64 x 10 ² (3.32 x 10 ²)	15.28 x 10 ² (7.68 x 10 ²)	23.53 x 10 ² (36.32 x 10 ²)
HCB	0.71 x 10 ² (0.59 x 10 ²)	0.63 x 10 ² (0.22 x 10 ²)	1.63 x 10 ² (1.04 x 10 ²)	1.51 x 10 ² (0.53 x 10 ²)
β -HCH	14.39 x 10 ² (18.42 x 10 ²)	17.77 x 10 ² (12.52 x 10 ²)	30.45 x 10 ² (17.34 x 10 ²)	33.19 x 10 ² (25.83 x 10 ²)
γ -HCH	5.59 x 10 ² (5.54 x 10 ²)	4.37 x 10 ² (2.94 x 10 ²)	13.48 x 10 ² (10.69 x 10 ²)	10.75 x 10 ² (6.07 x 10 ²)
Aldrín	2.16 x 10 ² (2.42 x 10 ²)	3.94 x 10 ² (2.27 x 10 ²)	7.80 x 10 ² (5.07 x 10 ²)	16.74 x 10 ² (27.97 x 10 ²)
Heptacloro Epóxido	31.01 x 10 ² (10.03 x 10 ²)	43.61 x 10 ² (21.74 x 10 ²)	88.53 x 10 ² (58.25 x 10 ²)	89.85 x 10 ² (39.03 x 10 ²)
Oxiclordano	27.12 x 10 ² (16.30 x 10 ²)	18.98 x 10 ² (16.71 x 10 ²)	19.35 x 10 ² (21.27 x 10 ²)	18.36 x 10 ² (18.10 x 10 ²)
<i>trans</i> -clordano	0.03 x 10 ² (0.07 x 10 ²)	0.06 x 10 ² (0.08 x 10 ²)	0.27 x 10 ² (0.46 x 10 ²)	0.13 x 10 ² (0.17 x 10 ²)
<i>cis</i> -clordano	0.06 x 10 ² (0.08 x 10 ²)	0.10 x 10 ² (0.08 x 10 ²)	0.34 x 10 ² (0.48 x 10 ²)	0.21 x 10 ² (0.19 x 10 ²)
DDF	4.95 x 10 ² (4.38 x 10 ²)	9.47 x 10 ² (14.14 x 10 ²)	5.13 x 10 ² (9.22 x 10 ²)	3.72 x 10 ² (4.44 x 10 ²)
<i>cis</i> -nonaclaro	0.06 x 10 ² (0.08 x 10 ²)	0.09 x 10 ² (0.10 x 10 ²)	0.43 x 10 ² (0.46 x 10 ²)	0.27 x 10 ² (0.26 x 10 ²)
Mirex	0.13 x 10 ² (0.14 x 10 ²)	0.18 x 10 ² (0.13 x 10 ²)	0.38 x 10 ² (0.46 x 10 ²)	0.30 x 10 ² (0.24 x 10 ²)
α -endosulfán	1.22 x 10 ² (0.73 x 10 ²)	1.65 x 10 ² (1.25 x 10 ²)	4.57 x 10 ² (5.23 x 10 ²)	4.00 x 10 ² (3.30 x 10 ²)
β -endosulfán	0.57 x 10 ² (0.33 x 10 ²)	1.14 x 10 ² (1.20 x 10 ²)	5.83 x 10 ² (7.04 x 10 ²)	3.16 x 10 ² (3.58 x 10 ²)
DTT	1.16 x 10 ² (1.06 x 10 ²)	2.57 x 10 ² (2.95 x 10 ²)	2.97 x 10 ² (3.82 x 10 ²)	5.10 x 10 ² (6.50 x 10 ²)
Suma de los Organoclorados	94.66 x 10² (24.62 x 10²)	109.23 x 10² (45.21 x 10²)	169.97 x 10² (124.43 x 10²)	210.80 x 10² (78.55 x 10²)

¹ Los datos de concentración fueron obtenidos de un estudio previo [147].

² DE: Desviación Estándar.

DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha registrado un incremento en la incidencia de Leucemia en niños menores de 15 años en diversos países [149-153] incluyendo México [14]. Sumado a esto, se ha reportado que la exposición a plaguicidas durante la etapa prenatal (a través de la madre) y/o postnatal (leche materna, exposición directa) puede ser un factor de riesgo a desarrollar este tipo de cáncer [127, 130, 133, 134], asociación que también ha sido encontrada con insecticidas en nuestro país [152]. Por tal motivo, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de detectar este riesgo mediante un posible biomarcador de efecto temprano antes de que se manifieste clínicamente la enfermedad. Para ello se utilizó, como biomarcadores de riesgo temprano, la detección de los transcritos de tres translocaciones, TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4, eventos que han sido propuestos como eventos tempranos en el desarrollo de la Leucemia en infantes y niños [29, 43], en un grupo de 49 recién nacidos expuestos prenatalmente a organoclorados. Ante la imposibilidad de obtener muestras de neonatos no expuestos a estos compuestos, en condiciones socioeconómicas similares, y suponiendo que las translocaciones a evaluar son específicas de un proceso leucemogénico, se utilizaron como grupo control, muestras de las mamás de los bebés recién nacidos evaluados en el estudio, considerando que aun cuando las madres se encontraban expuestas a los plaguicidas de forma crónica, no presentaban un diagnóstico clínico de Leucemia al momento de la toma de muestra. Además, en el estudio se incluyeron sólo los partos que no presentaron complicaciones y mujeres sanas.

Para poder realizar la discusión de los resultados, se ha decidido dividirla en dos partes, la primera comprenderá el análisis de los transcritos encontrados y la segunda, su papel como biomarcadores de efecto temprano ante una exposición a organoclorados.

ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS ENCONTRADOS

Antes de iniciar esta parte de la discusión es necesario aclarar lo siguiente: Al realizar el análisis de los transcritos, la información obtenida sólo permite conocer, de forma indirecta, los intrones que están involucrados en la translocación debido a que pueden identificarse los exones de los genes fusionados en el producto amplificado, no así el punto exacto de ruptura. También es importante hacer énfasis con respecto a la estructura y nomenclatura de algunos de los genes involucrados (*TEL*, *AML1* y *ETO*), ya que con el tiempo estas características se han ido modificando como consecuencia de un constante refinamiento en el conocimiento de sus secuencias; esto a su vez, ha generado discrepancias entre las publicaciones que evalúan al mismo gen y a sus sitios de rompimiento, por lo que es importante que, al revisar esta información, se tenga en cuenta la fecha de publicación y la base de datos consultada, ya que, si bien la nomenclatura cambia, los puntos de rompimiento no.

Transcrito TEL-AML1

Actualmente se sabe que la translocación (12;21)(p13;q22), evento que genera la fusión de los genes *TEL* y *AML1*, entre el intrón 5 de *TEL* y el intrón 2 (anteriormente reportado como intrón 1) de *AML1* [28, 72-74, 85, 102, 103], con algunas excepciones en *AML1*, donde se ha reportado la participación del intrón 1 (anteriormente región -1 del gen) [102] o del intrón 3 (antes, intrón 2) [85, 103].

En el presente estudio se detectó la presencia del transcrito TEL-AML1 en una sola muestra materna, en dos de las tres reacciones. Ambas réplicas presentaron la misma secuencia por lo que, asumiendo que se trataba de una misma clona, sólo se analizó una de ellas para identificar los intrones involucrados en el evento de translocación. El transcrito está formado por el exón 5 de TEL (NM_001987.4) [148] y por los exones 3 y 4b de AML1 (NM_001754.4) [148] (*ver Resultados*, Figura S-4), lo que sugiere que en el gen *TEL*, el rompimiento se llevó a cabo en el intrón 5, mientras que en *AML1* ocurrió en el intrón 2, resultado que concuerda con el control positivo (*ver Resultados*, Figura S-1) y con otros estudios donde también se reporta la detección de la translocación mediante el uso de (RT)-PCR [72, 74, 82, 154].

Transcrito AML1-ETO

Como en el caso anterior, en la translocación (8;21)(q22;q22), causante de la fusión de los genes *AML1-ETO*, se han identificado las regiones que participan en el rearreglo. En el gen *AML1* se han reportado puntos de rompimiento a lo largo del intrón 6 (llamado anteriormente intrón 5), mientras que en *ETO* estos puntos se localizan principalmente en el intrón 2 (antes intrón 1b) [28, 89, 110], y en menor frecuencia, a lo largo del intrón 3 (antes 1a) [28, 110].

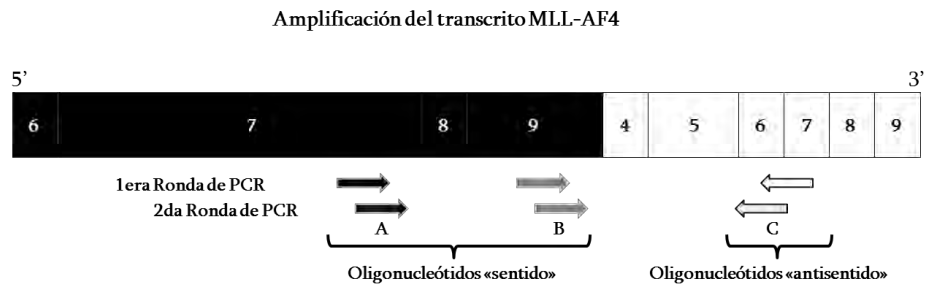
En este trabajo se detectó la amplificación del transcrito de esta translocación en, al menos, uno de los triplicados de siete muestras, dos maternas y cinco de infantes; sin embargo, sólo tres reacciones pudieron ser reamplificadas y secuenciadas, las dos muestras maternas y una de un bebé. En las madres se encontró que el transcrito estaba integrado por los exones 5 y 6 de AML1 (NM_001001890.2) [148] y por una parte del exón 4a de ETO (NM_175635.1) [148] en donde, en ambos casos, hubo una ausencia de 254 nucleótidos de este exón (*ver Resultados*, Figuras S-5 y S-6). Esta información permitió conocer que uno de los rompimientos debió presentarse en el intrón 6 de AML1 y, el segundo daño, dentro del exón 4a de ETO; esto último será discutido más adelante. Por otra parte, en el transcrito del bebé, se identificaron los exones 5 y 6 de AML1 seguidos del exón 4b de ETO (NM_175636.1) [148] (*ver Resultados*, Figura S-7), de tal modo que se puede establecer el primer rompimiento en el intrón 6 de AML1 y, el segundo, en el intrón 3 de ETO, información que coincide con los reportados en estudios con DNA [28, 110].

Con la secuenciación de diversas translocaciones asociadas a Leucemia y que conllevan la formación de genes quiméricos, se ha propuesto que el rompimiento debe de ocurrir dentro de los intrones, de tal modo que, al quedar intactos los exones, el gen fusionado se puede transcribir a una proteína quimérica [27, 43]. Este postulado se ve reforzado con lo aquí reportado, tanto para el transcrito de TEL-AML1, como para el transcrito de AML1-ETO detectado en uno de los bebés, ya que en ambos casos se determinó que los rompimientos ocurrieron en regiones intrónicas. Sin embargo, también existen excepciones a lo anterior, ya que se han registrado pares de genes fusionados y funcionales donde el punto de rompimiento en uno de los genes involucrados se localiza dentro del exón, por ejemplo las translocaciones MLL-AF15Q14, MLL-PPM1G, MLL-KIAA1239 [54, 62] y, como se reporta en el párrafo anterior, en dos de los transcritos identificados en este estudio.

Transcrito MLL-AF4

Este evento fue el más interesante dentro de nuestro estudio debido a que al realizar la (RT)-PCR se observó la amplificación del “transcrito” de esta translocación en varias muestras presentando un tamaño similar al del control positivo. Sin embargo, la secuencia de cada muestra reveló la ausencia del gen AF4 y, más aún, se encontró que el gen MLL presentaba un evento de inversión, lo que se presentó tanto en las muestras maternas (*ver Resultados*, Figuras S-8, S-10 y S-12) como en las neonatales (*ver Resultados*, Figuras S-9, S-11 y S-13), excepto en uno (*ver Resultados*, Figura S-14).

a)



b)

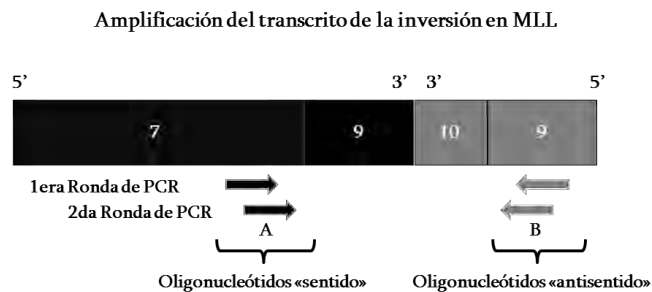


Figura D-1. Detección de rearrreglos en el transcrito de MLL: a) Para la detección del transcrito MLL-AF4 se utilizó un trío de oligonucleótidos para cada ronda de la PCR, dos para el gen MLL (uno –A– se une al exón 7 y otro –B– al exón 9) y el tercero –C– para el gen AF4. b) Si la muestra presenta un evento de inversión en el gen MLL, el oligonucleótido B se une a la hebra «antisentido» permitiendo la amplificación del fragmento. Exones de AF4 en blanco, exones de MLL en negro; exones invertidos de MLL en gris.

La inversión pudo ser detectada debido a los oligonucleótidos que se utilizaron para identificar la presencia del transcrito MLL-AF4. Siguiendo el método de Pallisgaard y cols. [36] se utilizaron dos oligonucleótidos “sentido” para la amplificación del segmento de MLL, considerando a dos de sus intrones como candidatos en la formación de la translocación. El primer oligonucleótido, que se une al exón 7, se utilizó previendo un posible rompimiento en el intrón 7 y el segundo, que se acopla al exón 9, en el caso de que este daño se produjera en el intrón 9. Así, al existir una inversión en el transcrito del gen MLL, el oligonucleótido que se une al exón 9, fungió como un cebador “anti sentido” permitiendo la amplificación (Figura D-1). En este punto, se descartó la presencia de una posible homología de cada uno de los oligonucleótidos utilizados con la secuencia anti sentido del propio gen MLL.

Además, en ninguna de las secuencias se detectó algún indicio de AF4, lo que señala que este gen no se encontraba en el transcrito. Teniendo en cuenta esto último y el hecho de que se identificaron inversiones en MLL, se sugiere que, probablemente, la inversión puede ser un paso previo a la translocación con otros genes y que, a su vez, este evento facilite la formación de este tipo de daño. Anteriormente, Teuffel y cols. [75] reportaron, en un par de gemelos con ALL y t(12;21), la presencia de una inversión de 22 nucleótidos del gen *AML1* entre la secuencia de los genes *TEL* y *AML1* (Figura D-2). Sumado a lo anterior, un estudio realizado en células del tumor de Ewing, que presenta el gen fusionado *EWS-FLI-1* como consecuencia de la t(11;22),¹ detectó la presencia de pequeñas inversiones (3-8 nucleótidos) en ambos lados de la secuencia del punto de rompimiento de la translocación, mismas que se encontraron presentes en los genes normales *EWS* y *FLI-1*. Por lo que se propone a las inversiones como eventos independientes y previos a la translocación [155].

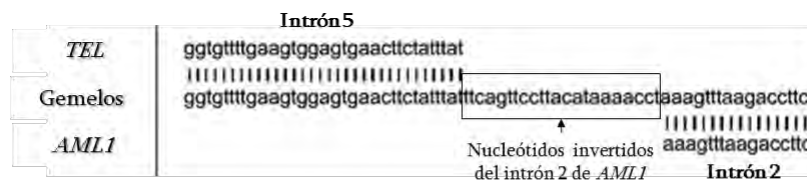


Figura D-2: Secuencia del punto de rompimiento de la translocación *TEL-AML1* detectada en un par de gemelos con ALL. La secuencia parcial del intrón 5 del gen *TEL* se muestra en la parte superior y la secuencia parcial del intrón 2 del gen *AML1* se presenta en la parte inferior. La secuencia de los puntos de rompimiento de la translocación encontrada en los pacientes se muestra en medio. Entre los puntos de rompimiento de ambos genes se detectaron 22 nucleótidos invertidos del intrón 2 de *AML1* –señalados dentro de un rectángulo–. Modificado de Tuffel y cols. [75].

Cada una de las secuencias de las inversiones detectadas en los transcritos del gen *MLL*, se revisó detalladamente con el fin de identificar las posibles regiones intrónicas y/o exónicas en donde se hayan producido los rompimientos previos a la inversión. En este punto es interesante mencionar que en una de las muestras evaluadas no se encontró el exón 8 (se detectó la secuencia ordenada del exón 7 seguida por la del exón 9), por lo que se cree que esta pérdida pudo ocurrir antes o después de la inversión o bien, a través de un evento de *splicing* alternativo en el transcrito y que ha sido reportado anteriormente en este gen [156, 157]. La revisión detallada de las inversiones puede encontrarse en el Anexo 13 de este trabajo.

Finalmente, en los estudios realizados en Leucemias, ya sea evaluando DNA o RNA mensajero, no se ha reportado la presencia de inversiones dentro del gen *MLL*. Este tipo de eventos encontrados en el presente trabajo implicaron desde una pequeña región del mismo –un exón y un intrón– hasta una

¹ Los tumores de Ewing son un grupo de neoplasias de origen neuroectodermal que porta, en el 85% de los casos, la translocación característica t(11;22) generando el transcrito fusionado *EWS/FLI-1* codificado en el cromosoma derivado 22 [155].

porción mayor del gen que incluyó a varios exones e intrones. Además, lo que más destaca es el hecho de que dichas inversiones están siendo transcritas a RNA mensajero, por lo que cabe la posibilidad de que se produzca una proteína alterada. Por ello, se requiere hacer más estudios para poder conocer las posibles implicaciones que pudiera tener este tipo de daño para el funcionamiento celular e incluso realizar estudios *in vivo* para conocer cómo están evolucionando estas inversiones, esto pensando en que pudieran ser predecesoras a eventos de translocación.

DETECCIÓN DE TRANSCRITOS DE LAS TRANSLOCACIONES TEL-AML1, AML1-ETO Y MLL-AF4 EN MADRES Y RECIÉN NACIDOS EXPUESTOS A PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS

La caracterización molecular de la Leucemia en infantes y niños ha proporcionado la oportunidad para poder investigar la historia natural de esta enfermedad más claramente, de tal forma que las anomalías genéticas y cromosómicas –que son recurrentes en subtipos específicos de Leucemia– proveen marcadores estables y únicos (clonotípicos) para realizar un seguimiento en las células leucémicas, siendo uno de estos marcadores las translocaciones cromosómicas [23, 43, 67]. Así, desde finales de los años 90's, diversos trabajos con gemelos idénticos (investigación de la relación clonal en Leucemia concordante) y estudios retrospectivos en niños unigénitos con Leucemia (a través del uso de tarjetas Guthrie) demostraron que el origen de algunas translocaciones ocurre *in utero* y sugirieron la posibilidad de que éstas pueden ser eventos iniciadores o tempranos del proceso de leucemogénesis durante la hematopoyesis fetal [43, 82]. Sumado a lo anterior, se ha propuesto que la presencia de translocaciones, del tipo que da origen a genes quiméricos o fusionados, puede ser una consecuencia de la exposición a agentes inhibidores de Topoisomerasa II –TopoII– durante el desarrollo embrionario, como flavonoides y plaguicidas [41, 43] o bien, que pueden ser ‘productos accidentales’ de la proliferación celular, el estrés apoptótico o metabólico de la propia hematopoyesis [43]. Diversos estudios epidemiológicos han obtenido una asociación positiva entre la exposición a plaguicidas, con el desarrollo de la Leucemia en infantes y niños [122, 123], reafirmando la propuesta de que este grupo de compuestos químicos puede ser uno de los promotores de la formación de translocaciones asociadas a Leucemia [41, 43].

Analizando esta información desde el punto de vista de la toxicología, se puede formular la siguiente hipótesis: “la exposición a plaguicidas durante el desarrollo embrionario promueve la formación de translocaciones asociadas a Leucemia en infantes y niños durante la hematopoyesis fetal”. Esta teoría permite plantear la posibilidad de que algunas translocaciones pueden ser utilizadas como posibles biomarcadores de daño temprano.

Para poder corroborar esta idea, en el presente trabajo se seleccionaron tres translocaciones cuyo origen prenatal ha sido confirmado: TEL-AML1 [72-75, 82, 83, 85-87], AML1-ETO [89] y MLL-AF4 [80-82]. La presencia de estos eventos se evaluó en muestras de linfocitos fijados de cultivos de sangre periférica materna y de cordón umbilical de un grupo de 49 mamás y sus neonatos, respectivamente, expuestos a plaguicidas organoclorados durante el desarrollo embrionario.

Al analizar los resultados obtenidos, se encontró que la frecuencia de los eventos evaluados fue muy baja, por lo que no se pudo aplicar alguna prueba estadística que nos permitiera corroborar nuestra hipótesis. Por ello mismo, para ver si existía alguna asociación entre el régimen de exposición a plaguicidas y la presencia de las translocaciones e inversiones de MLL, tanto en las madres como en los recién nacidos, se evaluaron ambos grupos por separado y se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Sin

embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas (*Resultados*: Tabla R-4). Esto probablemente se debió a que todos los individuos evaluados presentaron altos niveles de organoclorados, incluyendo a los neonatos. Así, a continuación se presenta un breve análisis sobre la incidencia de estos rearrreglos en la población de estudio.

Frecuencia del Transcrito de la Translocación TEL-AML1

En las muestras de linfocitos fijados de sangre de cordón umbilical, la presencia del transcrito de la translocación TEL-AML1 fue prácticamente nula; por otra parte, entre las muestras maternas inesperadamente una de ellas (2.04%) presentó este evento. Esta información da un posible indicio de que aparentemente la exposición a plaguicidas organoclorados no está influyendo en la formación de este evento. Sin embargo, esto no puede ser concluyente debido a que esta es la primera vez que se reporta la frecuencia de esta translocación en un grupo expuesto a algún tipo de plaguicida, o bien, que la exposición ambiental haya sido caracterizada, así como por otras posibles razones, punto que será retomado más adelante.

Frecuencia del Transcrito de la Translocación AML1-ETO

El transcrito de la translocación AML1-ETO se encontró con una frecuencia del 10.2% (5/49) en las muestras de los recién nacidos y del 4.08% (2/49) en las madres. Como se observa, la frecuencia en los bebés fue casi 2.5 veces más alta que en las mamás, lo que da un posible indicio de que los bebés son más susceptibles a presentar este tipo de eventos como consecuencia de una exposición a plaguicidas organoclorados. En un reporte previo, LaFiura y cols. [146] evaluaron la presencia del transcrito de esta translocación en 39 recién nacidos expuestos a propoxur (un plaguicida del grupo de los carbamatos) y 10 no expuestos; en el estudio se encontró una frecuencia del 20.5% (8/39) en el primer grupo y del 10% (1/10) en el segundo. En ambos trabajos se puede observar que la tendencia es la misma: la presencia del transcrito de la translocación en el grupo de estudio es, al menos, dos veces más frecuente que en el grupo control. Particularmente en este reporte, esto último es apoyado por el conocimiento que se tiene sobre la hematopoyesis, la cual se encuentra muy activa durante el desarrollo fetal de forma que, en esta etapa, las células sanguíneas son más susceptibles a sufrir algún daño genotóxico comparadas con las células de un adulto, como lo son las madres que fueron el grupo control del presente estudio [43].

Frecuencia del Transcrito de la Translocación MLL-AF4

A diferencia de los otros dos transcritos encontrados en la población de estudio, en una primera instancia se creyó que la translocación MLL-AF4 estaba presente en 4 neonatos (8.16%) y 3 mamás (6.12%). Sin embargo, la secuenciación de las muestras demostró que los fragmentos amplificados correspondían a inversiones de algunos exones del propio transcrito de MLL, como se explicó en la primera parte de la discusión. Al realizar la caracterización molecular de la Leucemia, tanto en infantes como en adultos, los estudios han revelado una gran variedad de alteraciones en este gen, como su participación en translocaciones cromosómicas, la presencia de duplicaciones en tándem dentro del mismo gen, inserciones cromosómicas, así como inversiones y deleciones a nivel cromosómico que provocan la fusión del gen con otro [62]. Sin embargo, específicamente las

inversiones encontradas en este trabajo no han sido reportadas, por lo que se desconoce si este tipo de eventos puede tener algún papel dentro del proceso de leucemogénesis. Lo que sí puede decirse es que la detección de las inversiones de algunos exones del gen se suma a una larga lista de alteraciones encontradas en él, por lo que se confirma el hecho de que *MLL* presenta una alta frecuencia de alteraciones que pueden ocurrir tanto en el feto en desarrollo como en el adulto, además de que se sugiere una posible intervención de los organoclorados en el proceso de formación de estos eventos.

TRANSLOCACIONES ASOCIADAS A LEUCEMIA EN INFANTES Y NIÑOS COMO MARCADORES DE GENOTOXICIDAD

Desde hace un par de décadas, el interés por el daño que pueda promover la exposición a diversos plaguicidas se ha ido incrementando con el tiempo. Actualmente existe una gran variedad de estudios que han evaluado su papel como posibles agentes genotóxicos a través de la evaluación de diversos biomarcadores, como MN, SCE y CA principalmente, en poblaciones laboralmente expuestas y, más recientemente, por una exposición ambiental [137-141]; en varios de ellos la asociación ha sido significativa; en neonatos y niños, el estudio de la evaluación de daño genotóxico no ha sido la excepción [142-145]. Por otra parte, más recientemente se ha planteado la posibilidad de evaluar diversas translocaciones como biomarcadores de genotoxicidad [146, 158], misma propuesta que se maneja en este trabajo con la primicia de que algunas de ellas han sido identificadas como marcadores de daño temprano y que están particularmente asociados a la Leucemia.

En el campo de la toxicología (1) es importante seleccionar biomarcadores que revelen una exposición o daño por un compuesto dado, (2) además de que deben de conocerse los niveles basales del biomarcador en una población sana y/o no expuesta para poder determinar el efecto del compuesto evaluado en la población expuesta. Estos dos puntos también deben de cumplirse para las translocaciones que han sido asociadas a Leucemia.

Diversos estudios han encontrado que, en algunos subtipos de Leucemia, la presencia de la translocación por sí sola no es suficiente para que se desencadene el proceso de leucemogénesis, sino que se requiere de uno o más daños genéticos; por ejemplo, en algunos casos de ALL con la fusión *TEL-AML1*, se ha observado la delección del gen normal *TEL* [72, 159-161]. Este conocimiento permite considerar el hecho de que un gran número de individuos sanos porta translocaciones en una clona pre-leucémica que, si bien puede estar expandida, se mantiene clínicamente silenciada [23]. Además, dado que la exposición a plaguicidas, durante el desarrollo embrionario, ha sido asociada con un incremento en el riesgo a desarrollar Leucemia en niños, se puede suponer que la presencia de estos eventos se verá incrementada en neonatos como resultado de una exposición a estos compuestos. En el presente trabajo se contó con los datos de los niveles de exposición a plaguicidas y con los de frecuencia de las translocaciones que fueron evaluadas, por lo que estos eventos podrían ser un biomarcador de exposición a estos compuestos, cumpliendo así el primer punto establecido en el párrafo anterior.

Lamentablemente, en lo relativo al conocimiento de las frecuencias basales en individuos sanos hay una carencia de información, pues sólo existen muy pocos reportes de la búsqueda de estos marcadores en neonatos e incluso en adultos sanos (Tabla D-1) y, en ninguno de los casos se ha realizado una continuidad de los estudios.

Utilizando la información presentada en la tabla y la obtenida en este estudio, se podría llevar a cabo una rápida comparación entre las frecuencias reportadas previamente vs las obtenidas aquí.

TEL-AML1. Anteriormente se comentó la posibilidad de que no exista una relación entre la exposición a organoclorados y la presencia de esta translocación. Tanto en los neonatos como en las madres, esta suposición se ve reforzada por lo reportado anteriormente en individuos sanos, utilizando la técnica de (RT)-PCR: mientras que en bebés, dos estudios señalan una frecuencia del 1% [162] y del 1.5% [154], en adultos sólo un estudio ha reportado una frecuencia del 4% [154].

AML1-ETO. Se planteó su posible asociación con la exposición a organoclorados, idea que es reforzada por el estudio de LaFiura y cols. [146], encontrando en ambos trabajos, el doble de la frecuencia de los transcritos a comparación con el grupo control. Aunado a esto, previamente Mori y cols. [162] reportaron que la presencia del transcrito de esta translocación, en muestras de cordón umbilical de neonatos sanos, es prácticamente nula (1/496 muestras) de modo que, considerando este trabajo, se fortalece aún más la idea de que la exposición a plaguicidas puede estar promoviendo la formación de estos eventos.

MLL-AF4. En una primera instancia, en el presente trabajo se puede concluir que, al igual que el transcrito de TEL-AML1, MLL-AF4 no tiene una aparente asociación con la exposición a organoclorados debido a que no se detectó su presencia en las muestras evaluadas. Previamente tres estudios reportaron la ausencia de este transcrito en muestras de cordón umbilical de bebés sanos [165, 166], de hígado fetal [166] y recientemente, en linfocitos de sangre periférica de adultos [167]. Sin embargo, en este estudio se detectó la presencia de transcritos correspondientes a inversiones dentro de MLL, eventos que no han sido reportados en estudios con población abierta, con algún tipo de exposición o bien, asociados a Leucemia, por lo que se desconoce a) si estos eventos puedan estar relacionados con la exposición a plaguicidas organoclorados u otro tipo de tóxicos y b) si tienen algún papel dentro del proceso de leucemogénesis.

Aun cuando la información con referencia a la evaluación de translocaciones asociadas a Leucemia en poblaciones abiertas y en poblaciones expuestas a plaguicidas es escasa, los pocos estudios que existen han permitido establecer un primer acercamiento para emplear este tipo de daño como biomarcadores de riesgo temprano al desarrollo de Leucemia Aguda en infantes y niños, principalmente la translocación AML1-ETO.

Tabla D-1. Frecuencia de translocaciones cromosómicas, en tejidos fetales, y muestras de sangre de neonatos y adultos sanos, detectadas por (RT)-PCR. *Modificado de Janz y cols. [95].*

Translocación cromosómica	Gen fusionado	Tejido	Frecuencia	Autores
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	Cordón umbilical (pacientes externos)	1/67 (1.5%)	Eguchi-Ishimae y cols. [154]
		Linfocitos de sangre periférica (<20 años)	11/99 (11%)	
		Linfocitos de sangre periférica (>20 años)	2/48 (4%)	Mori y cols. [162]
		Cordón umbilical	6/567 (1%)	
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	Cordón umbilical	1/496 (raro)	Mori y cols. [162]
		Cordón umbilical	63/156 (40%)	Basecke y cols. [163]
		Médula ósea (>22 años)	4/18 (22%)	
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	Hígado fetal	5/13 (38%)	Uckun y cols. [164]
		Médula ósea fetal	4/16 (25%)	
		Médula ósea neonatal	1/6 (17%)	
		Cordón umbilical	0/103 (0%)	Trka y cols. [165]
		Cordón umbilical	0/60 (0%)	Kim-Rouille y cols. [166]
		Hígado fetal	0/8 (0%)	
		Linfocitos de sangre periférica en adultos*	0/100 (0%)	Brassesso y cols. [167]

* Aun cuando no se detectó el transcrito, el 22% de los adultos presentó la translocación en el DNA.

Relevancia de evaluar Translocaciones Asociadas a Leucemia en Muestras Neonatales

Como punto adicional, uno de los motivos por los cuales se estudiaron las translocaciones TEL-AML1, AML1-ETO y MLL-AF4, es la importancia que tienen estos eventos dentro del riesgo a desarrollar Leucemia en un grupo de edad tan susceptible como lo son los infantes y niños. La translocación TEL-AML1 se detecta en cerca del 20-25% de todos los casos de niños con ALL, mientras que en adultos es menor al 4.4% [168-170]. Caso similar ocurre con MLL-AF4 cuya presencia es de aproximadamente el 50% de los casos de ALL; sin embargo, en niños esta frecuencia disminuye al 2% y en adultos tiene una representatividad de poco más del 7% [171]. Si se toma en cuenta lo anterior y los reportes que se han llevado a cabo en población sana en donde se han reportado en una baja frecuencia ambos transcritos, tanto en recién nacidos y niños como en adultos [154, 162, 165-167] con algunas excepciones [164], entonces se puede suponer que ante una exposición a un compuesto que promueva la formación de estos eventos, el riesgo será mayor en infantes y niños en comparación con los adultos. Esto probablemente ocurra por el papel que tienen los genes involucrados en las translocaciones durante la hematopoyesis fetal y por ello es necesario identificar los posibles agentes que favorezcan su origen.

Distinto a lo anterior, la translocación AML1-ETO tiene una representatividad similar en niños y adultos (8-10% de todos los casos de AML) [28], por lo que se esperaría que el riesgo sea similar en

ambos grupos de edad si se identifica este daño en población sana. Sin embargo, la diferencia se daría ante una exposición a compuestos que promuevan este daño, ya que a diferencia de las dos translocaciones anteriores, se ha observado que la frecuencia del transcrito en población sana es mayor ante la exposición a ciertos compuestos, específicamente a plaguicidas [146] y más aún, el presente trabajo demuestra que el daño es mayor en neonatos que en adultos, por lo que el riesgo se incrementa en el primer grupo ante una exposición a estas sustancias.

Así, mientras que la importancia del estudio de dos translocaciones (TEL-AML1 y MLL-AF4) radica en su alta representatividad dentro de todos de leucemias en infantes y niños, la significancia del estudio de la tercera (AML1-ETO) se basa en la susceptibilidad que se genera ante una exposición a agentes genotóxicos.

Finalmente, para concluir esta parte, importante señalar que, debido a que en este trabajo sólo se están evaluando linfocitos fijados, es posible que se estén subestimando los resultados aquí presentados. Esto se debe a que al analizar sólo un tipo celular particular, se están dejando de lado a los otros grupos celulares y es bien sabido que las tres translocaciones que se están estudiando, pueden estar presentes tanto en células precursoras, como en células ya diferenciadas de los distintos linajes [43, 172]. Anteriormente se comentaba la ausencia del transcrito de TEL-AML1; esta translocación es característica de la ALL cuyas células son precursoras del linaje B. Si la exposición a plaguicidas organoclorados favorece la presencia de este tipo de daño, y dicho evento se está generando en células precursoras sería difícil detectarlo en las muestras evaluadas, mas no imposible, ya que tuvimos un caso positivo, lo que reafirma la idea de que una clona portadora de una translocación puede seguir creciendo y diferenciándose sin afectar a su portador [43].

Recomendaciones para estudios posteriores.

Como se ha venido manejando a lo largo de este trabajo, la intención inicial del estudio fue plantear la posibilidad de utilizar la detección de translocaciones asociadas a Leucemia como biomarcadores de daño temprano ante una exposición a plaguicidas, específicamente organoclorados. Sin embargo, al ser al mismo tiempo el primer estudio de este tipo que se realiza en México y, el segundo a nivel internacional [146] se han detectado diversos puntos a considerar para la elaboración de futuros estudios.

- (a) Detección de translocaciones asociadas a Leucemia en una población abierta no expuesta.

La determinación de las frecuencias de translocaciones asociadas a Leucemia en infantes y niños, dentro de poblaciones abiertas no expuestas (o con bajos niveles de exposición) a compuestos que han sido relacionados con el riesgo a Leucemia en estos dos grupos, es un factor importante para poder establecer si los valores encontrados en poblaciones expuestas a plaguicidas tienen relevancia. Anteriormente, se hizo una comparación entre los reportes, en individuos sanos, de las frecuencias de las tres translocaciones evaluadas en el estudio. Sin embargo, también se encontraron estudios en donde la frecuencia de estos eventos era muy elevada: Basecke y cols. [163] reportaron una frecuencia del 40% para el transcrito AML1-ETO en muestras de cordón umbilical, mientras que Uckun y cols. [164] reportaron valores del 17 al 38% para MLL-AF4 dependiendo del tipo de muestra evaluada. En el primer caso, la frecuencia de AML1-ETO es dos y cuatro veces más elevada que la reportada por

LaFiura y cols. [146] y por este estudio, respectivamente; mientras que en el segundo caso, ningún otro estudio había detectado la presencia de MLL-AF4 incluyendo el presente. No se puede saber si los casos positivos fueron una consecuencia de algún tipo de exposición a agentes genotóxicos, ya que los autores no reportan información alguna con respecto al ambiente que rodea a los recién nacidos (estilo de vida de los padres, actividad económica, etc.). Estas diferencias tan drásticas resaltan la importancia de considerar todos los factores que puedan influir en el resultado por que si bien, en todos los estudios en población abierta se han evaluado muestras de recién nacidos sanos, la información proporcionada con respecto a factores ambientales es nula y sólo uno de los estudios hace hincapié en que algunas muestras fueron evaluadas para corroborar la ausencia de células leucémicas [164].

(b) Muestra evaluada

Todos los antecedentes previos a este trabajo han evaluado la presencia de las translocaciones en muestras de tejido, ya sea médula ósea o hígado fetal, sangre entera de cordón umbilical o linfocitos de sangre periférica. A diferencia de ello, en el presente estudio lo que se empleó fueron cultivos de linfocitos fijados en Carnoy, siendo el primero de su tipo en utilizar el RNA de este tipo de muestra para llevar a cabo una (RT)-PCR. Los resultados obtenidos aquí, nos señalan que la estabilidad del RNA se está conservando dentro de esta solución fijadora y que este tipo de muestras podría ser empleado para la búsqueda de translocaciones en muestras preservadas de estudios de epidemiología molecular.

CONCLUSIONES

- No se encontró una asociación entre la presencia del transcrito de TEL-AML1 y los niveles de organoclorados.
- Se observó que la presencia del transcrito de AML1-ETO fue dos veces mayor en recién nacidos en comparación con las madres, lo que sugiere que la exposición a plaguicidas organoclorados podría tener un efecto en la formación de esta translocación durante la hematopoyesis fetal.
- No se detectó el transcrito de MLL-AF4; sin embargo, se encontró la presencia de inversiones en MLL, daño que se encontraba principalmente en los exones 7-10. Esta es la primera vez que se reporta este tipo de rearrreglos en MLL, por lo que se desconoce su papel dentro del proceso leucemogénico.
- Se sugiere que la formación de inversiones en MLL es promovida por la formación de organoclorados, aunque se requiere investigar más a fondo.
- La presencia de translocaciones y rearrreglos de MLL en las muestras maternas, puede atribuirse a una exposición crónica a organoclorados, lo que señala que en adultos, la detección de algunas translocaciones asociadas a Leucemias en infantes y niños no es un indicativo de un incremento en el riesgo a este cáncer; sin embargo, en niños es necesario realizar un seguimiento.

ANEXO 1

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las enfermedades Hemato-oncológicas. *Fuente: WHO* [2].

Código	Nombre de la Neoplasia
C91	Leucemia Linfoide
C91.0	Leucemia Linfoblástica Aguda <i>Incluye:</i> Códigos de morfología M982, M9940-M9941 con el código de comportamiento /3 <i>Excluye:</i> Exacerbación Aguda de la Leucemia Linfocítica Crónica (C91.1)
C91.1	Leucemia Linfocítica Crónica
C91.2	Leucemia Linfocítica Sub-aguda
C91.3	Leucemia Prolinfocítica
C91.4	Leucemia de las Células “Peludas” Reticuloendoteliosis Leucémica
C91.5	Leucemia de células T en Adultos
C91.7	Otras Leucemias Linfoides
C91.9	Leucemia Linfoide, no específica
C92	Leucemia Mieloide <i>Incluye:</i> Leucemia: * granulocítica * mielógena códigos de morfología M986-M988, M9930 con código de comportamiento /3
C92.0	Leucemia Mieloide Aguda <i>Excluye:</i> Exarcebación Aguda de la Leucemia Mieloide Crónica (C92.1)
C92.1	Leucemia Mieloide Crónica
C92.2	Leucemia Mieloide Sub-aguda
C92.3	Sarcoma Mieloide Cloroma Sarcoma Granulocítico
C92.4	Leucemia Promielocítica Aguda
C92.5	Leucemia Mielomonocítica Aguda
C92.7	Otras Leucemias Mieloides
C92.9	Leucemia Mieloide, no específica
C93	Leucemia Monocítica <i>Incluye:</i> Leucemia Monocitoide Código de morfología M989 con código de comportamiento /3

(continúa)

Código	Nombre de la Neoplasia (Cont.)
C93.0	Leucemia Monocítica Aguda <i>Excluye:</i> Exacerbación Aguda de la Leucemia Monocítica Crónica (C93.1)
C93.1	Leucemia Monocítica Crónica
C93.2	Leucemia Monocítica Sub-aguda
C93.7	Otras Leucemias Monocíticas
C93.9	Leucemia Monocítica, no específica
C94	Otras leucemias de tipo celular específico <i>Incluye:</i> códigos de morfología M984, M9850, M900, M9910, M9921-M9932 con código de comportamiento /3 <i>Excluye:</i> Reticuloendoteliosis Leucémica (C91.4) Leucemia de Células de Plasma (C90.2)
C94.0	Eritranemia Aguda y Eritroleucanemia Mielocis Eritraemica Aguda Enfermedad de Di Guglielmo
C94.1	Eritraemia Crónica Enfermedad Heilmeyer-Schöner
C94.2	Leucemia Megacarioblástica Aguda Leucemia: * Megacarioblástica (aguda) * Megacariocítica (aguda)
C94.3	Leucemia de Célula Mástil
C94.4	Panmielosis Aguda
C94.5	Mielofibrosis Aguda
C94.7	Otras Leucemias Específicas Leucemia Celular Linosarcoma
C95	Leucemia de tipo celular inespecífico <i>Incluye:</i> código de morfología M980 con código de comportamiento /3
C95.0	Leucemia Aguda de tipo celular inespecífico Leucemia de Célula Mástil Leucemia de Célula Troncal <i>Excluye:</i> exarcebación aguda de la Leucemia no específica Crónica
C95.1	Leucemia Crónica de tipo celular inespecífico
C95.2	Leucemia Sub-aguda de tipo celular inespecífico
C95.7	Otras Leucemias de tipo celular inespecífico
C95.9	Leucemia, inespecífica

ANEXO 2

Reporte de casos nuevos de cáncer (en ambos sexos y en todas las edades) y, particularmente de Leucemia, a nivel mundial en 2008. *Fuente: GLOBOCAN*[5].

A. Primeros 15 tipos de cáncer con mayor número de casos nuevos reportados a nivel mundial en 2008. Se incluyen los registros de cáncer de Mama y de Próstata.

Lugar	Tipo de Cáncer	Número de casos	Lugar	Tipo de Cáncer	Número de casos
1	Pulmón	1,608,823	9	Vejiga	386,365
2	Mama	1,383,523	10	Linfoma no Hodgkin	355,844
3	Colorectal	1,233,711	11	Leucemia	351,412
4	Estómago	989,598	12	Páncreas	277,668
5	Próstata	913,770	13	Riñón	271,348
6	Hígado	748,271	14	Cavidad oral, labio	263,861
7	Cervicouterino	529,409	15	Sistema nervioso, cerebro	238,796
8	Esófago	482,239			

B. Primeros 20 países con mayor número de casos nuevos de Leucemia reportados en 2008.

Lugar	Población	Número de casos	Lugar	Población	Número de casos
1	China	70,826	11	Reino Unido	7,689
2	Estados Unidos de América	44,269	12	México	6,105
3	India	33,307	13	Pakistán	5,837
4	Alemania	11,079	14	España	4,716
5	Federación Rusa	11,028	15	Canadá	4,640
6	Indonesia	11,007	16	Vietnam	4,355
7	Japón	9,638	17	República Islámica de Irán	3,818
8	Italia	9,245	18	Ucrania	3,754
9	Francia (metropolitana)	8,434	19	República de Corea	3,664
10	Brasil	7,905	20	Turquía	3,347

C. Primeros 15 tipos de cáncer con mayor número de casos nuevos en México reportados en 2008.

Lugar	Tipo de Cáncer	Número de casos	Lugar	Tipo de Cáncer	Número de casos
1	Próstata	14,917	9	Linfoma no Hodgkin	4,276
2	Pecho	13,939	10	Páncreas	4,129
3	Cervicouterino	10,186	11	Vesícula biliar	3,790
4	Pulmón	9,148	12	Riñón	3,595
5	Estómago	7,859	13	Tiroides	3,195
6	Colorectal	6,347	14	Sistema nervioso, cerebro	2,998
7	Hígado	6,178	15	Vesícula	2,331
8	Leucemia	6,105			

ANEXO 3

Clasificación Internacional del Cáncer en Niños, tercera edición: Clasificación Principal. *Fuente: Steliarova-Foucher y cols. [15].*

Grupo Diagnóstico	Código (s) ICD-0-3	
	Morfología	Topografía
I. Leucemias, enfermedades mieloproliferativas y enfermedades mielodisplásicas		
a. Leucemias linfoides	9820, 9823, 9826, 9827, 9831-9837, 9940, 9948	
b. Leucemias mieloides agudas	9840, 9861, 9866, 9867, 9870-9874, 9891, 9895-9897, 9910, 9920, 9931	
c. Enfermedades mieloproliferativas crónicas	9863, 9875, 9876, 9950, 9960-9964	
d. Síndrome mielodisplásico y otras enfermedades mieloproliferativas	9945, 9946, 9975, 9980, 9982-9987, 9989	
e. Otras leucemias especificadas y no especificadas	9800, 9801, 9805, 9860, 9930	
II. Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales		
a. Linfomas Hodgkin	9650-9655, 9659, 9661-9665, 9667	
b. Linfomas no Hodgkin (excepto linfoma de Burkitt)	9591, 9670, 9671, 9673, 9675, 9678-9680, 9684, 9689-9601, 9695, 9698-9702, 9705, 9708, 9709, 9714, 9716-9719, 9727-9729, 9731-9734, 9760-9762, 9764-9769, 9970.	
c. Linfoma de Burkitt	9687	
d. Varias neoplasias linforreticulares	9740-9742, 9750, 9754-9758	
e. Linfomas no especificados	9590, 9596	
III. CNS y varias neoplasias intraespinales e intracraneales		
a. Ependimomas y tumores de los plexos coroideos	9383, 9390-9394 ¹	
b. Astrocitomas	9380 ^a 9384, 9400-9411, 9420, 9421-9424, 9440-9442 ²	C72.3
c. Tumores embrionarios intraespinales e intracraneales	9470-9474, 9480, 9508 ^a 9501-9504 ⁴	C70.0-C72.9
d. Otros gliomas	9380 ^a 9381, 9382, 9430, 9444, 9450, 9451, 9460 ²	C70.0-C72.2, C72.4-C72.9, C75.1, C75.3
e. Otras neoplasias intraespinales e intracraneales especificadas	8270-8281, 8300, 9350-9352, 9360-9362, 9412, 9413, 9492, 9493, 9505-9507, 9530-9539, 9582 ²	
f. Neoplasias intraespinales e intracraneales no especificados	8000-8005 ¹	C70.0-C72.9, C75.1-C75.3
IV. Neuroblastoma y otros tumores de células nerviosas periféricas		
a. Neuroblastoma y ganglioneuroblastoma	9490, 9500	

(continúa)

<i>(Cont.)</i>		Código (s) ICD-0-3	
Grupo Diagnóstico	Morfología	Topografía	
b. Otros tumores de células nerviosas periféricas	8680-8683, 8690-8693, 8700, 9520-9523 9501-9504	C00.0-C69.9, C73.9-C76.8, C80.9	
V. Retinoblastoma	9510-9514		
VI. Tumores renales			
a. Nefroblastoma y otros tumores renales no epiteliales	8959, 8960, 8964-8967 8963, 9364	C64.9	
b. Carcinomas renales	8010-8041, 8050-8075, 8082, 8120-8122, 8130-8141, 8143, 8155, 8190-8201, 8210, 8211, 8221-8231, 8240, 8241, 8244-8246, 8260-8263, 8290, 8310, 8320, 8323, 8401, 8430, 8440, 8480-8490, 8504, 8510, 8550, 8560-8576 8311, 8312, 8316-8319, 8361	C64.9	
c. Tumores renales malignos no especificados	8000-8005	C64.9	
VII. Tumores hepáticos			
a. Hepatoblastoma	8970		
b. Carcinomas hepáticos	8010-8041, 8050-8075, 8082, 8120-8122, 8140, 8141, 8143, 8155, 8190-8201, 8210, 8211, 8230, 8231, 8240, 8241, 8244-8246, 8260-8264, 8310, 8320, 8323, 8401, 8430, 8440, 8480-8490, 8504, 8510, 8550, 8560-8576 8160-8180	C22.0, C22.1	
c. Tumores hepáticos malignos no especificados	8000-8005	C22.0, C22.1	
VIII. Tumores del hueso malignos			
a. Osteosarcomas	9180-9187, 9191-9195, 9200	C40.0-C41.9, C76.0, C76.8, C80.9	
b. Condrosarcomas	9210, 9220, 9240 9221, 8230, 9241-9243	C40.0-C41.9, C76.0-C76.8, C80.9	
c. Tumor de Ewing y sarcomas relacionados de hueso	9260 9363-9365	C40.0-C41.9, C76.0-C76.8, C80.9 C40.0-C41.9	
d. Otros tumores de hueso malignos especificados	8810, 8811, 8823, 8830 8812, 9250, 9261, 9262, 9270-9275, 9280-9282, 9290, 9300-9302, 9310-9312, 9320-8322, 9330, 9340-9342, 9370-9372	C40.0-C41.9	
e. Tumores de hueso malignos no especificados	8000-8005, 8800, 8801, 8803-8805	C40.0-C41.9	
IX. Tejidos blandos y otros sarcomas extraóseos			
a. Rabdomiosarcoma	8900-8905, 8910, 8912, 8920, 8991		
b. Fibrosarcomas, tumores de la vaina del nervio periférico y otras neoplasias fibrosas	8810, 8811, 8813-8815, 8821, 8823, 8834-8835 8820, 8822, 8824-8827, 9150, 9160, 9491, 9540-9571, 9580	C00.0-C39.9, C44.0-C76.8, C90.9	
c. Sarcoma de Kaposi	9140		
d. Otros sarcomas de tejidos blandos especificados	8587, 8710-8713, 8806, 8831-8833, 8836, 8840-8842, 8850-8858, 8860-8862, 8870, 8880, 881, 8890-8898, 8921, 8982, 8990, 9040-9044, 9120-9125, 9130-9133, 9135, 9136, 9141, 9142, 9161, 9170-9175, 9231, 9251, 9252, 9373, 9581 8830 8963 9180, 9210, 9220, 9240 9260	C00.0-C39.9, C44.0-C76.8, C80.9 C00.0-C63.9, C65.9-C69.9, C73.9-C76.8, C80.9 C49.0-C49.9 C00.0-C39.9, C47.0-C75.9	

(continúa)

<i>(Cont.)</i>		Código (s) ICD-0-3	
Grupo Diagnóstico	Morfología	Topografía	
d. Otros sarcomas de tejidos blandos especificados (cont.)	9364 9365	C00.0-C39.9, C47.0-C63.9, C65.9-C69.9, C73.9-C76.8, C80.9	
e. Sarcomas de tejidos blandos no especificados	8800-8805	C00.0-C39.9, C44.0-C76.8	
X. Tumores de células germinales, tumores trofoblásticos y neoplasias de gónadas			
a. Tumores de células germinales intraespinales e intracraneales	9060-9065, 9070-9072, 9080-9085, 9100, 9101*	C70.0-C72.9, C75.1-C75.3	
b. Tumores de células germinales extragonadales y extracraneales malignos	9060-9065, 9070-9072, 9080-9085, 9100-9105	C00.0-C55.9, C57.0- C61.9, C63.0-C69.9, C73.9-C75.0, C75.4-C76.8, C80.9	
c. Tumores de células germinales gonadales malignas	9060-9065, 9070-9073, 9080-9085, 9090, 9091, 9100, 9101	C56.9, C62.0-C62.9	
d. Carcinomas en gónadas	8010-8041, 8050-8075, 8082, 8120-8122, 8130-8141, 8143, 8190-8201, 8210, 8211, 8221-8241, 8244-8246, 8260-8263, 8290, 8310, 8313, 8320, 8323, 8380-8384, 8430, 8440, 8480-8490, 8504, 8510, 8550, 8560-8573, 9000, 9014, 9015, 8441-8444, 8450, 8451, 8460-8473	C56.9, C62.0-C62.9	
e. Tumores en gónadas malignos no específicos y otros	8590-8671 8000-8005	C56.9, C62.0-C62.9	
XI. Otras neoplasias epiteliales malignas y melanomas malignos			
a. Carcinomas de la corteza suprarrenal	8370-8375		
b. Carcinomas de tiroides	8010-8041, 8050-8075, 8082, 8120-8122, 8130-8141, 8190, 8200, 8201, 8211, 8230, 8231, 8244-8246, 8260-8263, 8290, 8310, 8320, 8323, 8430, 8440, 8480, 8481, 8510, 8560-8573, 8330-8337, 8340-8347, 8350	C73.9	
c. Carcinomas nasofaríngeos	8010-8041, 8050-8075, 8082, 8083, 8120-8122, 8130-8141, 8190, 8200, 8201, 8211, 8230, 8231, 8244-8246, 8260-8253, 8290, 8310, 8320, 8323, 2430, 8440, 8480, 8481, 8500-8576	C11.0-c11.9	
d. Melanomas malignos	8720-8780, 8790		
e. Carcinomas de piel	8010-8041, 8050-8075, 8078, 8082, 8090-8110, 8140, 8143, 8147, 8190, 8200, 8240, 8246, 8247, 8260, 8310, 8320, 8323, 8390-8420, 8430, 8480, 8542, 8560, 8570-8573, 8940, 8941	C44.0-C44.9	
f. Carcinomas no especificados y otros	8010-8084, 8120-8157, 8190-8264, 8290, 8310, 8313-8315, 8320-8325, 8360, 8380-8384, 8430-8440, 8452, 8454, 8480-8586, 8588-8589, 8940, 8941, 8983, 9000, 9010-9016, 9020, 9030	C00.0-C10.9, C12.9-C21.8, C23.9-C39.9, C48.0-C48.8, C50.0-C55.9, C57.0-C61.9, C63.0-C63.9, C65.9-C72.9, C75.0-C76.8, C80.9	
XII. Neoplasias malignas no especificadas y otras			
a. Otros tumores malignos especificados	8930-8936, 8950, 8951, 8971-8981, 9050-9055, 9110, 9363	C00.0-C39.9, C47.0-C75.9	
b. Otros tumores malignos no especificados	8000-8005	C00.0-C21.8, C23.9-C39.9, C42.0-C55.9, C57.0-C61.9, C63.0-C63.9, C65.9-C69.9, C73.9-C75.0, C75.4-C80.9	

ICD-0-3 Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología, tercera edición; CNS: Sistema Nervioso Central

* Tumores con sobrevivencia no maligna están incluidos para todos los códigos de morfología en la línea

ANEXO 4

Clasificación de las Leucemias Crónicas. *Fuente: Shinton; editor [50].*

Nombre de la Neoplasia	Nombre de la Neoplasia
Desórdenes Mieloproliferativos Crónicos	Neoplasias de células NK y Células T Maduras
Leucemia Mieloide Crónica (CML)	* Leucemia Promielocítica de Células T
Leucemia Mieloide Crónica Atípica	* Leucemia Linfocítica Granular de Células T
Leucemia Neutrofílica Crónica	Grandes
Leucemia Eosinofílica Crónica / Síndrome Hipereosinofílico	* Leucemia Agresiva de Células NK
Leucemia Mielomonocítica Crónica	* Linfoma Extranodal de Células T / NK, tipo nasal
Leucemia Mielomonocítica Juvenil	* Linfoma de Células T asociado a Enteropatía
Leucemia de Mastocitos	* Linfoma Hepatoesplénico de Células T
Policitemia Vera	* Linfoma Subcutáneo de Células T simulando una Paniculitis
Mielofibrosis Idiopática Crónica	* Síndrome de Sezary y Micosis Fungoide
Trombocitemia Esencial	* Linfoma Anaplasico Cutáneo Primario de Células Grandes
Enfermedades Mielodisplásicas / Mieloproliferativas, inclasificables	* Linfoma Periférico de Células T, inespecificado
Desórdenes Linfoproliferativos Crónicos	* Linfoma Angioinmunoblástico de Células T
Neoplasias de células B maduras	* Linfoma Anaplásico de Células Grandes
* Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma Linfocítico Pequeño	Linfoma Hodgkin
* Leucemia Prolinfocítica de células B	* Linfoma Hodgkin Nodular con Predominio de Linfocitos
* Linfoma Linfoplasmocítico	* Linfoma Hodgkin Clásico
* Linfoma de la Zona Marginal Esplénica (del Bazo)	* Linfoma Hodgkin Clásico con Esclerosis Nodular
* Leucemia de Células Peludas	* Linfoma Hodgkin Clásico rico en Linfocitos
* Leucemia de Células Plasmáticas	* Linfoma Hodgkin Clásica de Celularidad Mixta
* Plasmacitoma Solitario del Hueso o Plasmacitoma Óseo Solitario	* Linfoma Hodgkin Clásica con Depleción Linfoide
* Plasmacitoma Extraóseo	
* Linfoma de Células B de la Zona Marginal Extranodal de Tejido	
Linfoide asociado a Mucosas (Linfoma MALT)	
* Linfoma de Células B de la Zona Marginal Nodal	
* Linfoma Folicular	
* Linfoma de Células del Manto	
* Linfoma Difuso de Células B grandes	
* Linfoma Mediastínico (timo) de Células B grandes	
* Linfoma Intravascular de Células B grandes	
* Linfoma de Efusión Primaria	
* Leucemia / linfoma de Burkitt	

ANEXO 5

Clasificación FAB de las Leucemias. Fuente: Shinton; editor [50].

Leucemia Linfoblástica Aguda

FAB L1

Las células son pequeños blastos homogéneos con un tamaño relativamente dos veces mayor al de linfocitos pequeños. El citoplasma es escaso y los nucléolos están ausentes o pobremente visualizados. En algunas ocasiones pueden observarse vacuolas con algunos gránulos azurófilos.

FAB L2

Las células son heterogéneas y el núcleo tiene forma irregular, a menudo plegado o endentado con nucléolos prominentes. El citoplasma varía en cantidad y ocasionalmente puede contener gránulos azurófilos.

FAB L3

Las células son largas, los blastos homogéneos con citoplasma basofílico intensamente conteniendo vacuolas bien definidas y prominentes. El núcleo es regular con nucléolos prominentes.

Leucemia Mieloide Aguda

AML M0

Su identificación se basa principalmente en el inmunofenotipo. Los blastos M0 no presentan características morfológicas distintivas, la tinción con peroxidasa o negro Sudan permanece esencialmente negativa. Inmunológicamente, los blastos expresan los marcadores asociados al linaje mielóide CD13 o CD33 en la presencia de marcadores linfoides negativos.

AML M1

La médula ósea aspirada contiene 90% o más blastos de tamaño mediano a largo con pocos gránulos citoplásmicos, bastones de Auer o vacuolas, o bien, ausencia de ellos.

AML M2 (Leucemia Promielocítica Aguda [APL])

Más del 10% de las células nucleadas han madurado a un estado promielocítico o mayor. Muchos pacientes muestran cambios displásicos puros, incluyendo asincronía núcleo-citoplásmica, apariencia pseudo-Pelger-Hüer, y anomalías en granulación, especialmente hipogranulación y gránulos gigantes. Los bastones de Auer pueden encontrarse en cualquier estado de mieloblasto a granulocito maduro. La translocación cromosómica 8;21 se encuentra en el 18% de estos pacientes. (La translocación t(15;17) ocasiona la fusión del gen del receptor del ácido retinóico α (RAR α) con el gen PML en el cromosoma 15 dando como resultado la proteína fusionada PML-RAR α , sugiriendo que la disrupción de RAR α es la causa de APL).

AML M3

Se puede identificar un tipo hipergranulado común o bien, una variante microgranulada menos usual. El tipo hipergranulado tiene en la médula ósea una población de promielocitos anormales con gránulos rojo-purpúreos gruesos que tienden a obscurecen el núcleo. Las células denominadas *faggot* contienen poleas de bastones de Auer. El núcleo es lobulado, reniforme, o bilobulado y es visualizado mejor en la variante microgranular, donde el citoplasma contiene sólo una fina capa roja de gránulos. La tinción con peroxidasa es fuertemente positiva, aun cuando hay presencia de algunos gránulos. Virtualmente todos los casos están asociados con la translocación cromosómica 15;17.

AML M4

Se observa diferenciación a lo largo de los linajes mielóide y monocítico. Los blastos de la médula ósea representan >30% de las células nucleadas, muchas presentan características monocíticas. El componente

monocítico en la sangre periférica es $>5 \times 10^9$ células/L, incluyendo monoblastos, promonocitos y monocitos. Estas células se muestran positivas para esterasa no específica (NSE, por sus siglas en inglés) y, con un procedimiento de esterasa combinado, se puede demostrar presencia de células que contengan tanto NSE como la enzima granulocítica cloroacetato esterasa. M4E es un subtipo distinto que se caracteriza por un incremento en el número de precursores de eosinófilos anormales que contienen gránulos basofílicos prominentes y anomalías asociadas (especialmente inversiones) del cromosoma 16.

AML M5

En M5a, monoblastos largos con abundante citoplasma basofílico constituyen el 80% o más del componente monocítico de la médula ósea. Estos blastos pueden contener vacuolas y/o pequeños gránulos azurófilos. El núcleo es redondo o complejo, con un nucléolo largo y la membrana celular usualmente irregular con pseudopodía. En M5b se presenta una mayor cantidad de promonocitos y monocitos anormales en médula ósea y sangre periférica. El núcleo de la mayoría de las células está plegado, con nucléolos discretos. En ambos subtipos, la tinción con peroxidasa es negativa y la reacción NSE es fuertemente positiva. Los niveles en suero y lisozima urinaria están incrementados significativamente.

AML M6

De las células eritroides nucleadas, los precursores eritroides representan más del 50% y los blastos, por arriba del 30%, presentando moderadamente características displásicas marcadas como lobulación nuclear, multinuclearidad, cariorrexis y vacuolas citoplásmicas. La técnica de PAS (ácido periódico de Schiff) es positiva en células eritroides y la incorporación de hierro se incrementa con o sin sideroblastos anillados. Hay que tener cuidado para diferenciar la M6 de la MDS (Mielodisplasia) cuando los niveles de blastos eritroides estén cercanos a $<30\%$.

AML M7

La diagnosis depende en (1) la demostración de la peroxidasa de plaquetas por ultracitoquímica o (2) por inmunofenotipo para identificar las glicoproteínas CD41+ o CD61+ en la superficie de los blastos. La morfología de los blastos es polimórfica, con algunas células que recuerdan a los linfoblastos del tipo L1 con escaso citoplasma y cromatina densa, otras células mimetizan los blastos del tipo L2 (o M0). La tinción con negro Sudan o peroxidasa es negativa, con esterasa y PAS, la positividad varía.

ANEXO 6

A. Marcadores inmunológicos en ALL y AML. Fuente: Hoffbrand y cols. [16].

Clasificación Inmunológica de ALL.						
Marcador*	Pro-B ¹	cALL	Pre-B	B-ALL	Pre-T	T-ALL
TdT (n)	+	+	+	-	+	+
CD19 (m)	+	+	+	+	-	-
CD22 (cyt)	+	+	+	+	-	-
CD79a (cyt)	+	+	+	+	-	-
CD10 (m)	-	+	+	-/+	-/+	-
μ Chain (cyt)	-	-	+	+	-	-
Smlg (m)	-	-	-	+	-	-
CD7 (m)	-	-	-	-	-	+
CD3 (cyt)	-	-	-	-	-	+
CD2 (m)	-	-	-	-	-	+
CD5 (m)	-	-	-	-	-/+	+
CD1a (m)	-	-	-	-	-	-/+

n = tinción nuclear;
m = tinción de membrana;
cyt = expresión citoplasmática
* McAb excepto para Smlg, para el cual se utilizan comunemente anticuerpos policlonales
¹ células B tempranas o, formalmente, ALL nula.

Marcadores inmunológicos en AML.					
McAb*	M0/M1	M2/M3	M4/M5	M6	M7
CD33 (m)	+	+	+	-/+	+
CD13 (m/cyt)	+	+	+	+	+
aMPO (cyt)	+	+	+	-	-
CD14 (m)	-	-	+	-	-
CD41 (m)	-	-	-	-	+
Glicoforina A (m)	-	-	-	+	-
TdT (n)	-/+*	-	-	-	-

n = tinción nuclear;
m = tinción de membrana;
cyt = expresión citoplasmática
aMPO = anticuerpo anti-mieloperoxidasa
* Análisis cuantitativos muestran una baja expresión en AML y una alta expresión en ALL (después de Farahat y cols. 1995).

B. Frecuencia de los fenotipos inmunológicos en ALL y AML. Fuente: Shinton; editor [50].

Clasificación e Incidencia de Leucemias Linfoblásticas Agudas por Inmunofenotipo.			
Clasificación	Inmunofenotipo	Frecuencia (%)	
		Niños	Adultos
ALL del linaje B			
ALL pre pre-B	Tdt, HLA-DR, <u>CD19</u> , cyCD22	5	11
ALL común	TdT, HLA-DR, <u>CD10</u> , CD19, cyCD22, CD24	63	52
ALL pre-B	TdT, HLA-DR, <u>cyIgM</u> , CD19, cyCD22, CD10, CD24	16	19
ALL de células B	HLA-DR, <u>SigM</u> , CyIgM, CD19, CD22, CD20, CD24	3	3
ALL del linaje T			
ALL pre-T	Tdt, <u>CD7</u> , cyCD3	1	6
ALL de células T	Tdt, CD7, <u>cyCD3</u> , CD2, CD5, CD4, CD8	12	18

Nota: Los antígenos subrayados son usualmente necesarios para el diagnóstico de cada uno de los subtipos individuales

Asociación de los tipos FAB con la Expresión Fenotípica en Leucemia Mieloide Aguda.					
Tipo FAB	% pacientes positivos				
	CD11b	CD13	CD14	CD33	DR
M1	35	76	8	70	70
M2	62	85	12	71	91
M3	15	76	2	94	7
M4	81	71	63	85	95
M5	89	45	57	92	92

ANEXO 7

A. Asociación de Anormalidades Cromosómicas con algunos tipos de ALL y AML.

Asociación del Inmunofenotipo con Anormalidades Cromosómicas en la Leucemia Linfoblástica Aguda. Fuente: Hoffbrand y cols. [16].

Inmunofenotipo	Citogénesis	Frecuencia (%)
Pre pre-B	t(4;11)(q21;q23)	2
Pre-B/cALL	t(1;19)(q23;p13)	12/2
	t(9;22)(q34;q11)	C-2; A-25
B madura	t(2;8)(p12;q24)	5
	t(8;14)(q24;q32)	>80
	t(8;22)(q24;q11)	10
cALL	6p-	8
	9p-	8
	t(12;21)(p13;q22)	30
	Hiperpoliploidía (60-65)	C-40; A-5
	Cerca a la haploidía (26-34)	1
T-ALL	6q-	12
	9p-	13

C – niños; A - Adultos

Asociación de los tipos FAB con Anormalidades Cromosómicas en la Leucemia Mieloide Aguda. Fuente: Shinton [50].

Tipo FAB	Citogénesis	Frecuencia (%)
M2	t(8;21)(q22;q22)	15-18
M3	t(15;17)(q22;q21)	90+
M4E	inv(16)(p13;q22)	100
M5, M4	t del(11q)	35
Todas las AML	+8	13
	-7	9
	-5 o del(5q)	6
	t(9;22)(q34;q11)	3

B. Clasificación de la WHO para Neoplasias Mieloides y Leucemias Agudas con translocaciones cromosómicas recurrentes. Fuente: Vardiman y cols. [51].

Neoplasias Mieloproliferativas (MPN)

- ✦ Leucemia Mieloide Crónica, positiva para *BCR-ABL1*

Leucemia Mieloide Aguda y neoplasias relacionadas

- ✦ AML con t(8;21)(q22;122); *AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1)*
- ✦ AML con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13,q22); *CBFB-MYH11*
- ✦ APL* (t(15;17)(q22;q12); *PML-RAR4*)
- ✦ AML con t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
- ✦ AML con t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- ✦ AML con inv(3)(q21q22.2) o t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVT1*
- ✦ AML (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*

Leucemias Agudas con linaje ambiguo

- ✦ Leucemia Aguda de linaje mixto con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
- ✦ Leucemia Aguda de linaje mixto con t(v;11q23); rearrreglos en *MLL*

Leucemia Linfoblástica B / Linfomas

- ✦ Leucemia Linfoblástica B / Linfoma con t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1*
- ✦ Leucemia Linfoblástica B / Linfoma con t(v;11q23); rearrreglos en *MLL*
- ✦ Leucemia Linfoblástica B / Linfoma con t(12;21)(p13;q22); *TEL-AML1 (ETV-RUNX1)*
- ✦ Leucemia Linfoblástica B / Linfoma con t(5;14)(q31;q32); *IL3-IGH*
- ✦ Leucemia Linfoblástica B / Linfoma con t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

*APL – Leucemia Promielocítica Aguda.

ANEXO 8

Algunos genes que, al estar involucrados en una translocación, su producto proteico se ve alterado. *Fuente: Rowley [48].*

Genes afectados por un evento de translocación.	
Clase	Gen
<i>Transductores de Señal</i>	
Tirosinas cinasas	<i>ABL, ALK, JAK2, LCK, PDGFRB</i>
Serin cinasas	<i>BCR</i>
Receptores de superficie	<i>FGFR3, TAN1</i>
Factores de crecimiento	<i>IL3</i>
<i>Factores de unión al DNA</i>	
Homeobox	<i>HOX11, HOXA9, HOXD13, PBX1, PML, PMX1</i>
Hélice-loop-hélice	<i>LYL1, MYC, TAL1, TAL2, TCF3</i>
Factores ETS	<i>ERG, ETV6, FLI1, MN1</i>
Forkhead	<i>AF6q21, AFX, FKHR</i>
Zinc finger	<i>BCL6, ETO, EV11, MLL, MOZ, PLZF, PML1, RARA</i>
LIM	<i>LMO1, LMO2</i>
Zipper de leucina	<i>AF10, AF17</i>
Otros	<i>AF4, AF9, CBP/p300, DEK, E2F, ENL, LYT10, RUNX1</i>
<i>Otros</i>	
Septinas	<i>CD10rel, MSF</i>
Nucleoporinas	<i>NUP98, NUP214</i>
Moduladores transcripcionales	<i>BCL3, CBF3, ELL, NFkB2</i>
Anti-apoptosis	<i>AP12, BCL2</i>
Unión al RNA	<i>EWS, FUS, OTT, TLS/FUS</i>

ANEXO 9

Clasificación de las translocaciones cromosómicas en Leucemia con base en su función o los genes involucrados.

Fuente: Zhang y Rowley [28].

Translocaciones cromosómicas recurrentes en leucemia y los genes involucrados.					
Translocación	Genes involucrados	Subtipos asociados	Translocación	Genes involucrados	Subtipos asociados
(1) Translocaciones asociadas a MLL					
t(X;11)(q13;q23)	<i>AFX1/MLL</i>	AML	t(10;11)(p12;q14)	<i>AF10/CALM1</i>	AML/ T-ALL
t(X;11)(q22;q23)	<i>Septin2/MLL</i>	AML	t(10;11)(q21;q23)	<i>CXXC6(TET1)/MLL</i>	AML
t(1;11)(p32;q23)	<i>AF1p/MLL</i>	ALL	t(11;11)(q21;q23)	<i>MLL/PICALM</i>	AML
t(1;11)(q21;q23)	<i>AF1q/MLL</i>	AML	t(11;11)(q23;q23)	<i>MLL/CBL</i>	AML
t(2;11)(q11;q23)	<i>AFF3(LAF4)/7MLL</i>	ALL	t(11;11)(q23;q23)	<i>MLL/ARHGEF12</i>	AML
t(3;11)(p21;q23)	<i>AF3p21 NCK1PSD/MLL</i>	t-AML/ALL	t(11;11)(q23;q24)	<i>MLL/TIRAP</i>	ANLL
t(3;11)(q21;q23)	<i>EEFSEC(SELB)/MLL</i>	ALL	t(11;12)(q23;q13)	<i>MLL/CIP29</i>	AML
t(3;11)(q25;q23)	<i>GMPS/MLL</i>	t-AML	t(11;14)(q23;q24)	<i>MLL/GPHN</i>	AML/AUL
t(3;11)(q28;q23)	<i>LPP/MLL</i>	AML	t(11;15)(q23;q14)	<i>MLL/CASC5 (AF15q14)</i>	AML/ALL
t(4;11)(p12;q23)	<i>AF4p12/MLL</i>	t-ALL	t(11;15)(q23;q14)	<i>MLL/MPFYVE</i>	T-ALL
t(4;11)(p21;q23)	<i>AF4/MLL</i>	ALL pro-B	t(11;16)(q23;p13.3)	<i>MLL/CBP</i>	AML/ALL/t-CMML
t(4;11)(q22;q23)	<i>SEPT 11/MLL</i>	aCML	t(11;17)(q23;p13)	<i>MLL/GAS7</i>	t-AML
t(5;11)(q31;q23)	<i>GRAF/MLL</i>	AML/ALL	t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL/AF17</i>	AML
ins(5;11)(q31;q13q23)	<i>AF5q31/MLL</i>	ALL	t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL/ARa</i>	AML
t(6;11)(q12;q23)	<i>SMAF1/MLL</i>	AML	t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL/ACACA</i>	AML
t(6;11)(q21;q23)	<i>AF6q21/MLL</i>	AML	t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL/LASP1</i>	AML
t(6;11)(q27;q23)	<i>AF6/MLL</i>	AML	t(11;17)(q23;q25)	<i>MLL/MSF1</i>	t-AML
t(8;16)(p11;p13)	<i>MOZ/CBP</i>	AML/t-AML	t(11;19)(q23;p13.1)	<i>MLL/ELL</i>	AML
inv(8)(p11q13)	<i>MOZ/TIF2</i>	AML	t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL/ENL</i>	AML/ALL
t(8;22)(p11;q13)	<i>MOZ/p300</i>	AML	t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL/EEN</i>	AML
t(9;11)(p22;q23)	<i>AF9/MLL</i>	AML/ALL	t(11;20)(q23;q11)	<i>MLL/MAPRE1 (EB1)</i>	ALL
t(9;11)(q34;q23)	<i>AF9q34/MLL</i>	AML	t(11;22)(q23;q11)	<i>MLL/hCDCrel</i>	AML
t(10;11)(p12;q23)	<i>AF10/MLL</i>	AML	t(11;22)(q23;q13)	<i>MLL/p300</i>	AML
t(10;11)(p11.2;q23)	<i>AB11/MLL</i>	AML			
(2) Translocaciones/inversiones asociadas a CBF(AML1/CBFA y CBFβ) y TEL/ETV6					
t(X;21)(p22;q22)	<i>PRDX4/AML1</i>	AML	t(4;12)(q11;p13)	<i>BTL/TEL</i>	AML
t(3;21)(q26;q22)	<i>EV11/MDS1/EAP/AML1</i>	t-AML/CML-ACC/BC	t(5;12)(q31;p13)	<i>ACS2/TEL</i>	AML
t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO/AML1</i>	AML	t(5;12)(q31;p13)	<i>PDGFRB/TEL</i>	CMML
t(8;21)(q23;q22)	<i>FOG2/AML1</i>	MDS	t(6;12)(q23;p13)	<i>STL/TEL</i>	ALL
t(8;21)(q24;q22)	<i>TRPS1/AML1</i>	ALL/AML	t(7;12)(q36;p13)	<i>HLXB9/TEL</i>	AML
t(16;21)(q24;q22)	<i>MTG16/AML1</i>	t-AML	t(9;12)(p24;p13)	<i>JAK2/TEL</i>	ALL, aCML
t(19;21)(q13;q22)	<i>AMP19/AML1</i>	t-AML	t(9;12)(q22;p13)	<i>SYK/TEL</i>	MDS
t(12;21)(p12;q22)	<i>TEL/AML1</i>	ALL	t(9;12)(q34;p13)	<i>ABL/TEL</i>	CMML
t(21;21)(q11;q22)	<i>UPS25/AML1</i>	MDS	t(12;13)(p13;q12)	<i>TEL/CDX2</i>	AML
inv(16)(t(16;16)(p13q22)	<i>MYH11/CBFB</i>	AML-M4	t(12;13)(p13;q14)	<i>TEL/TTL</i>	ALL
t(1;12)(p36;p13)	<i>MDS2/TEL</i>	CML/MDS	t(12;15)(p13;q25)	<i>TEL/NTRK3</i>	AML, fibrosarcoma
t(1;12)(q21;p13)	<i>ARNT/TEL</i>	AML	t(12;17)(p13;p12)	<i>TEL/PER1</i>	AML
t(1;12)(q25;p13)	<i>ARG/TEL</i>	AML	t(12;21)(p13;q11)	<i>TEL/MN1</i>	AML
t(3;12)(q26;p13)	<i>MDS1/EV1/TEL</i>	MPD	t(12;16)(q13;p11)	<i>CHOP/TLS/FUS</i>	AML
			t(16;21)(p11;q22)	<i>TLS/FUS/ERG</i>	AML, MLS

(continúa)

Translocaciones cromosómicas recurrentes en leucemia y los genes involucrados (Cont.)

Translocación	Genes involucrados	Subtipos asociados	Translocación	Genes involucrados	Subtipos asociados
(3) Translocaciones asociadas a RARA					
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML/RARA</i>	APL	t(11;17)(q13;q21)	<i>NUMA/RARA</i>	AML
t(5;17)(q32;q21)	<i>NPM/RARA</i>	AML	der(17)	<i>STAT5/RARA</i>	AML
t(11;17)(q23;q21)	<i>PLZF/RARA</i>	AML	t(3;5)(q25;q35)	<i>MLF1/NPM</i>	AML/MDS
(4) Translocaciones asociadas a E2A					
t(1;19)(q23;p13)	<i>PBX1/E2A</i>	B-ALL	t(17;19)(q23;p13)	<i>HLF/E2A</i>	B-ALL
(5) Translocaciones asociadas a Tirosinas Cinasas					
del(4)(q12q12)	<i>FIP1L1/PDGFR</i>		t(6;8)(q27;p11)	<i>FOP/FGFR1</i>	MPD
t(4;22)(q12;q11)	<i>PDGFRA/BCR</i>		t(7;8)(q32;p11)	<i>TRIM24/FGFR1</i>	MPD
t(1;5)(q23;q33)	<i>Miomegalina/PDGFRB</i>	MPD	t(8;9)(p12;q33)	<i>FGFR1/CEP110</i>	MPD
t(5;7)(q33;q11.2)	<i>PDGFRB/HIP1</i>	CMML	t(8;13)(p11;q12)	<i>FGFR1/ZNF198</i>	MPD
t(5;10)(q33;q21)	<i>PDGFRB/H4</i>	MPD	t(8;17)(p11;q11)	<i>FGFR1/MYO18A</i>	MPD
t(5;12)(q33;13)	<i>PDGFRB/TEL</i>	CMML	t(8;22)(p11;q11)	<i>FGFR1/BCR</i>	MPD
t(5;14)(q33;q32)	<i>PDGFRB/CAV14</i>	AML	t(8;19)(p11;q13.3)	<i>FGFR1/LOC113386</i>	MPD
t(5;14)(q33;q24)	<i>PDGFRB/NIN</i>	MPD	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL/BCR</i>	CML, ALL
t(5;15)(q33;q15)	<i>PDGFRB/TP53BP1</i>	MPD	t(9;12)(q34;p13)	<i>ABL/BCR</i>	CML like
t(5;17)(q33;p13)	<i>PDGFRB/RAB5</i>	CMML	t(9;22)(p24;q11)	<i>JAK2/BCR</i>	CMML
t(5;17)(q33;p11.2)	<i>PDGFRB/HCMOGT</i>	JMML	t(8;9)(p22;p24)	<i>PCM1/JAK2</i>	MPD
(6) Translocaciones asociadas a NUP98/NUP214					
t(1;11)(q23;p15)	<i>PMX1/NUP98</i>	AML	t(9;11)(p22;p15)	<i>LEDGF/NUP98</i>	AML
t(2;11)(q31;p15)	<i>HOXD13/NUP98</i>	t-AML	inv(11)(p15q22)	<i>NUP98/DDX10</i>	t-AML
t(4;11)(q21;p15)	<i>RAP1GDS1/NUP98</i>	T-ALL	t(11;20)(p15;q11)	<i>NUP98;TOP1</i>	t-MDS
t(5;11)(q35;p15)	<i>NDS/NUP98</i>	AML	t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK/NUP214(CAN)</i>	AML
t(7;11)(p15;p15)	<i>HOXA9/NUP98</i>	AML	Cariotipo normal	<i>SET/NUP214(CAN)</i>	AML
(7) Translocaciones relacionadas con el gen TCR o de la inmunoglobulina (IG)					
t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH/c-MYC</i>	ALL (Burkitt)	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11/TCRA</i>	T-ALL
t(2;8)(p12;q32)	<i>IGK/c-MYC</i>	ALL (Burkitt)	t(11;14)(p15;q11)	<i>LMO1/TCRA</i>	T-ALL
t(8;22)(q24;q11)	<i>IGL/c-MYC</i>	ALL (Burkitt)	t(11;14)(p13;q11)	<i>LMO2/TCRA</i>	T-ALL
t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3/IGH</i>	ALL pre-B	t(14;21)(q11;q22)	<i>TCRA/BHLHB1</i>	T-ALL
t(7;14)(q21;q32)	<i>IGH/CDK6</i>	B-CLL	t(7;9)(q35;q34)	<i>TCRB/TAL2</i>	T-ALL
t(14;19)(q32;p13)	<i>IGH/BCL-3</i>	B-CLL	t(7;10)(q35;q24)	<i>TCRB/HOX11</i>	T-ALL
t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL1/SCL/TCRA</i>	T-ALL	t(7;11)(q35;p13)	<i>TCRB/LM92</i>	T-ALL
t(9;14)(q21;q11)	<i>P15/p19/TCRA</i>	T-ALL	t(7;19)(q35;p13)	<i>TCRB/LYL1</i>	T-ALL

ANEXO 10

Algunas translocaciones características de las Leucemias en infantes y niños. *Fuente: Zhang y Rowley [28].*

El genotipo celular define las formas principales de leucemia en niños: Leucemias que con frecuencia resultan de la fusión de genes críticos para señales de transducción o transcripción.			
Anormalidad genética molecular	Translocación	Defecto bioquímico	Rasgo asociado
Leucemia del linaje de células B			
Fusión TEL-AML1	t(12;21) críptica	Transcripción	Buena prognosis
Fusión BCR-ABL (p185)	t(9;22)(q34;q11)	Transducción de señal	Mala prognosis
Fusión E2A-PBX1	t(1;19)(q23;p13)	Transcripción	Fenotipo pre-B, respuesta negativa a antimetabolitos
Fusión MLL-AFX1	t(x;11)(q13;q23)	Transcripción	
Fusión MLL-AF4	t(4;11)(q21;q23)	Transcripción	Linaje mixto, infantes, mala prognosis
Fusión MLL-ENL	t(11;19)(q23;p13)	Transcripción	Hiperleucocitosis
Fusión IGH-MYC	t(8;14)(q24;q32)	Transcripción	FAB L3, enfermedad extramedular
Fusión IGκ-MYC	t(8;14)(q24;q32)	Transcripción	FAB L3, enfermedad extramedular
Fusión IGλ-MYC	t(8;14)(q24;q32)	Transcripción	FAB L3, enfermedad extramedular
Hiperdiploidía	ninguna	desconocida	Buena prognosis
Leucemia del linaje de células T			
Deleción TAL1	Ninguna	Transcripción	Enfermedad extramedular, CD2+, CD10-
Fusión TCRd-TAL1	t(1;14)(p32;q11)	Transcripción	Enfermedad extramedular, CD2+, CD10-
Fusión TCRb-TAL1	t(1;7)(p32;q35)	Transcripción	Enfermedad extramedular, CD2+, CD10-
Fusión TCRA-MYC	t(8;14)(q22;q11)	Transcripción	Enfermedad extramedular
Fusión TCRd-RBTN1	t(11;14)(p15;q11)	Transcripción	Enfermedad extramedular
Fusión TCRd-RBTN2	t(11;14)(p13;q11)	Transcripción	Enfermedad extramedular
Fusión TCRd-HOX11	t(10;14)(24;q11)	Transcripción	Enfermedad extramedular
Fusión TCRb-LCK	t(1;7)(p34;q34)	Señal de transducción	Enfermedad extramedular
Leucemia Mieloide Aguda			
Fusión AML1-ETO	t(8;21)(q22;q22)	Transcripción	FAB M2
Fusión CBFb-MYH11	inv(16)(p13;q22)	Transcripción	FABM4E0
Fusión DEK-CAN	t(6;9)(p23;q34)	Transcripción	Basofilia
Fusión MLL-AF1p	t(1;11)(p32;q23)	Transcripción	
Fusión MLL-AF1q	t(1;11)(q21;q23)	Transcripción	FAB M4-M5, infantes
Fusión MLL-AF6	t(6;11)(q27;q23)	Transcripción	
Fusión MLL-AF9	t(9;11)(q21;q23)	Transcripción	FAB M4, M5, infantes
Fusión MLL-AF10	t(10;11)(p12;q23)	Transcripción	FAB M5
Fusión MLL-AF17	t(11;17)(q23;q21)	Transcripción	
Fusión MLL-CBP	t(11;16)(q23;p13)	Transcripción	FAB M4, M5, infantes
Fusión MLL-EEN	t(11;19)(q23;p13)	Transcripción	Infantes
Fusión MLL-ENL, fusión MLL-ELL	t(11;19)(q21;q23)	Transcripción	Síndrome mielodisplásico
Fusión MLL-MLL	ninguna	Transcripción	FAB M4, M5
Fusión MOZ-CBP	t(8;16)(p11;p13)	Acetilación de cromatina/transcripción	FAB M4, M5
Fusión NUP98-HOXA9	t(7;11)(p15;p15)	¿Activa HOXA9?	FAB M2, M4
Fusión NPM-MLF1	t(3;5)(q25;q34)	Tráfico anormal	Síndrome mielodisplásico
Fusión PML-RARa	t(15;17)(q22;q21)	Respuesta a ácido retinoico	FAB M3, coagulopatía

ANEXO 11

A. Función de la proteína quimérica TEL-AML1

Este nuevo gen surgido de la translocación (12;21)(p13;q22) traduce para una proteína quimérica que contiene los 333 aminoácidos residuales NH₂ de TEL, los cuales codifican para un dominio de dimerización –pero carece del dominio de unión al DNA ETS– que está unido a los residuos del 21 al 480 de AML1, los cuales incluyen el dominio de unión al DNA (Figura A11-1a) [49]. Debido a que, tanto TEL como AML1, tienen dominios de interacción mSin3A, la proteína quimérica puede unirse a múltiples represores que le confieren la capacidad de reprimir, de forma dominante, la transcripción de genes regulados por AML1 (Figura A11-1b) [104-106]; un ejemplo de ello es la inhibición de la transcripción basal del *enhancer* de TCRβ [104].

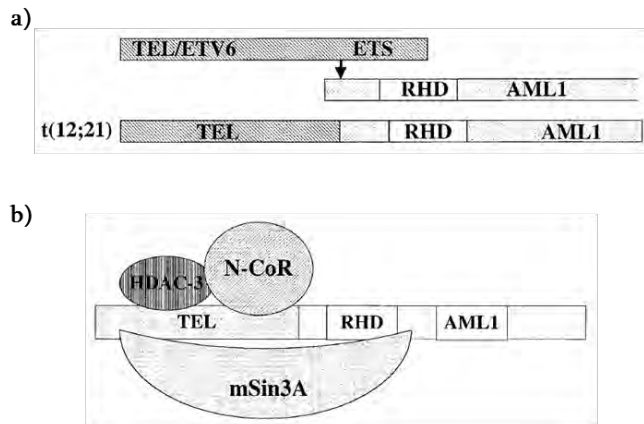


Figura A11-1. Representación esquemática de la proteína quimérica TEL-AML1. a) Diagrama de las proteínas "wild-type" y la proteína fusionada de la translocación t(12;21); *RHD*, dominio homólogo a RUNT, de AML1 es un dominio homólogo a la proteína Runt de *Drosophila*; *ETS*, dominio de unión al DNA de la proteína TEL; la flecha indica el punto de rompimiento cromosomal. b) Diagrama de la proteína fusionada y su unión con co-represores; tanto TEL como AML1 contienen dominios de interacción mSin3A que permiten una interacción estable con mSin3A (*RHD*, *HDAC*, histona desacetilasa; *N-CoR*, co-represor nuclear de hormonas). Fuente: Hiebert y cols. [106].

B. Función de la proteína quimérica AML1-ETO

La proteína quimérica del gen fusionado (8;21)(q22;22) está integrada por 177 aminoácidos N-terminal de AML1 y por 575 aminoácidos carboxilo terminal de ETO (Figura A11-2a) [111]. AML1-ETO tiene la capacidad de formar heterodímeros con CBFβ e interactuar con sitios de unión al DNA de CBF; sin embargo, a través de la secuencia de ETO puede unirse tanto a los complejos co-represores –N-CoR y mSin3– como a los miembros de la familia ETO. Esto último resulta en la represión de genes que normalmente estarían activados por AML1, lo que lleva a la inhibición de la transcripción (Figura A11-2b) [49, 106, 112] o bien, induce la expresión de genes como la survivina que bloqueen la regulación transcripcional de la diferenciación mieloide [113]. Se ha reportado que esta proteína puede activar el promotor de BCL-2, cuya sobre-expresión, se ha observado, detiene la muerte celular [114]. Por otra parte se ha observado que la proteína AML1-ETO, en colaboración con ETO, favorece la activación del receptor M-CSF en etapas tempranas de las células mieloides, lo que ha sido asociado con una proliferación aberrante [111].

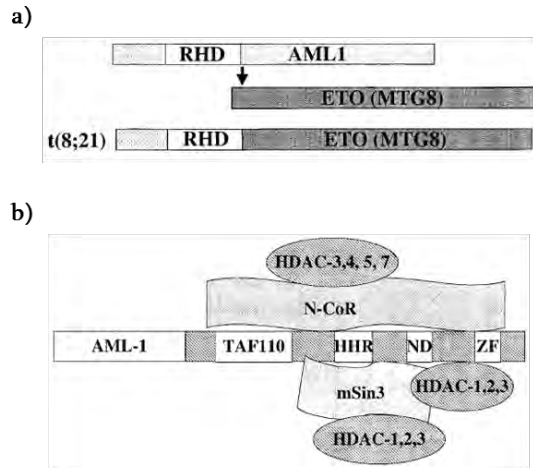


Figura A11-2. Representación esquemática de la proteína quimérica AML1-ETO. a) Diagrama de las proteínas “*wild-type*” y la proteína fusionada de la translocación t(8;21); *RHD*, dominio homólogo a RUNT, de AML1 es un dominio homólogo a la proteína Runt de *Drosophila*; la flecha indica el punto de rompimiento cromosomal. b) Diagrama de la proteína fusionada y su unión con co-represores. También se muestran los contactos entre los co-represores N-CoR y mSin3 y la histona deacetilasa. Las cajas abiertas son regiones de homología con *Nervy*, una proteína de *Drosophila* homóloga de ETO (*TAF110* es un dominio con homología a la proteína TAF110 de *Drosophila*, *HHR* repeticiones “heptad” (de 7 aminoácidos) hidrofóbicas, *ND* dominio nervy, *ZF* dedo de zinc, *HDAC* histona desacetilasa). Fuente: Hiebert y cols. [106].

C. Función de la proteína quimérica MLL-AF4

Aun cuando se ha observado que el número de exones involucrados en la translocación (4;11)(q21;q23), tanto del gen *MLL* como del gen *AF4*, varía (Figura A11-3), se ha observado que la función de su proteína quimérica es igual en todos los casos e incluso es similar a la de otras translocaciones que involucran al gen *MLL*. En todos los casos hay una pérdida del dominio *zinc finger PHD* y de los dominios distales de la proteína que son sustituidos por el extremo carboxilo terminal del compañero, en su mayoría, factores de transcripción como *AF4* (Figura A11-4) [119]. Diversas líneas de investigación han sugerido que las proteínas quiméricas que involucran a *MLL* tienen una ganancia de función que, a su vez, lleva a la pérdida de la función de mecanismos celulares, valga la redundancia, al ser el gen compañero la clave para transformar a *MLL* en un activador transcripcional potente. En el caso particular de *AF4* se sabe que es un fuerte activador de la transcripción y, aunque se desconoce su mecanismo de activación, se sabe que *AF4* y *AF9* interactúan físicamente y se co-localizan en grupos subnucleares, por lo que se sugiere que la activación de la transcripción por parte de *AF4* involucra el reclutamiento de *AF9* y SWI-SNF. Esto lleva a la hipótesis de que las proteínas quiméricas con *MLL* son componentes que forman grandes supercomplejos, muchos de los cuales pueden interactuar con complejos como SWI-SNF [119, 120].

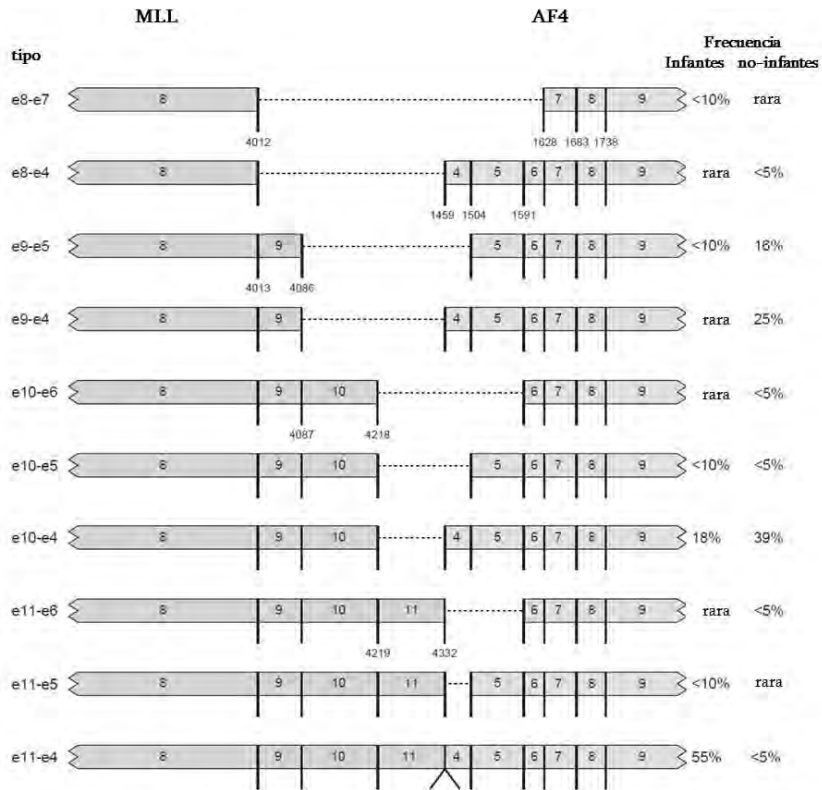


Figura A11-3. Diagrama esquemático de los diversos tipos de transcritos del gen fusionado *MLL-AF4*. Los números de bajo del transcritto fusionado hacen referencia al primer nucleótido (5') del exón involucrado, excepto cuando el último nucleótido (3') del gen río arriba esté indicado. Las frecuencias relativas de los transcritos fusionados difieren entre infantes y no infantes (niños y adultos). Fuente: van Dongen y cols. [115].

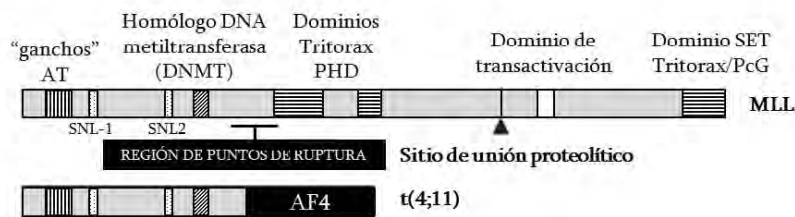


Figura A11-4. Representación de la proteína MLL y la proteína quimérica MLL-AF4. MLL es homóloga a Trithorax de *Drosophila* (*thx*) en un dominio tipo dedo homeodímero central (PHD) y en dominio SET C-terminal (cuadros con líneas horizontales). Los "ganchos" hook o AT (cuadros con líneas diagonales) y las regiones homólogas a la DNA metiltransferasa (DNMT; cuadro con líneas diagonales) se mantienen en todos los rearrreglos que involucran a MLL. La localización de los dominios subnucleares (SNL-1 y SNL-2, cuadros con puntos) están involucrados en la selección de MLL por dominios subnucleares puntuales. La región de AF4 en la proteína quimérica de t(4;11) se encuentra en negro. Fuente: Hess. [119].

ANEXO 12

Información adicional sobre la Población de Estudio. *Fuente: Alvarado-Hernández y cols. [147].*

Características de la Población de Estudio

Se colectaron muestras de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica materna pertenecientes a 49 binomios de mamás-neonatos con previo consentimiento materno. La muestra materna se tomó después del parto y la muestra del cordón umbilical se tomó inmediatamente después de que la placenta fue expulsada. Todos los partos fueron normales. Las mujeres respondieron un cuestionario individual que incluía información general, datos clínicos y ginecológicos así como sobre exposición a plaguicidas e información general del neonato (peso, medidas, estado de salud, etc.)

Caracterización de la de Exposición

Cuantificación de Lípidos. Se empleó un kit de lípidos totales (Spinreact, S.A.U.) como un método colorimétrico basado en la cantidad de iones carbonio que se forman de la reacción de los lípidos insaturados y el ácido sulfúrico. Los iones reaccionan con la fosfovainillina que da un producto coloreado en rosa proporcional a la concentración total de lípidos en la muestra. Los valores obtenidos se utilizaron para corregir los niveles de plaguicidas que se midieron en el plasma de las muestras maternas y de cordón umbilical.

Cuantificación de Plaguicidas Organoclorados. Cada muestra fue desproteïnizada con alcohol desnaturalizado y sulfato de amonio saturado. Para obtener la fase orgánica se realizaron tres extracciones con hexano líquido-líquido centrifugando cada vez a 2300 rpm durante 8 minutos. Posteriormente las muestras se pasaron a columnas de florisil previamente activadas con diclorometano y acetona. Los analitos se eluyeron con una mezcla de diclorometano-hexano (30:70) y concentrados en un volumen de 50 µL. El cambio de disolvente fue llevado a 25°C con nitrógeno. Los analitos fueron transferidos a viales cromatográficos y llevados a un volumen de 100 µL con hexano para ser separados por Espectrometría de Gases (GC) y analizados por un Detector de Captura de Electrones (ECD) o bien, por Espectrometría de Masas (MS). Los plaguicidas cuantificados por GC-ECD fueron el α -endosulfan, β -endosulfan y 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT). La determinación por GC-MS se realizó en los plaguicidas α -hexaclorociclohexano (α -HCH), β -HCH, γ -HCH, hexaclorobenceno (HCB), aldrín, epóxido heptacloro, oxiclordano, 1,1-dicloro-2,2-bis (4-clorofenil)etileno (DDE), *trans*-clordano, *cis*-clordano, *cis*-nonacloro y mirex. Para conocer las condiciones particulares de cada análisis se puede consultar el trabajo de Alvarado-Hernández y cols. [147]. La concentración de los plaguicidas se reportó en ng/g de Lípido.

ANEXO 13

Análisis de las inversiones de *MLL* identificadas en las muestras maternas y neonatales.

El objetivo del análisis de las inversiones encontradas en este trabajo fue identificar los posibles intrones y/o exones en donde hayan ocurrido los rompimientos previos a la inversión. La información fue obtenida del punto de unión entre la secuencia ordenada y la secuencia invertida; el último nucleótido de la secuencia ordenada señala el primer rompimiento y, el primer nucleótido de la secuencia invertida, indica el segundo. En total, se encontraron tres pares de rompimiento:

1. Exón-intrón: cuando el primer rompimiento ocurrió dentro de un exón y el segundo, en un intrón.
2. Intrón-exón: cuando el primer rompimiento se generó dentro de un intrón y el segundo, dentro de un exón.
3. Exón-exón: cuando ambos rompimientos ocurrieron dentro de un exón.

Con base en lo anterior y en otras observaciones, en la Tabla A13-1 se resumen las características de las inversiones encontradas y, a continuación, se presenta una breve descripción de como pudieron formarse las inversiones y la estructura teórica de las mismas.

Tabla A13-1. Clasificación de las inversiones detectadas en los transcritos del gen <i>MLL</i> en las muestras maternas (M) y de neonatos (B).				
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4
Muestras	M4 y B13	M1	B46	M26 y B11
Características	* (a)	* (b)	* (c)	* (d)
Exones invertidos	9 y 10	9 y 10	9 y 10	9 (parcial)
Deleción de nucleótidos (N) en exones no invertidos	Exón 7: -15 N en dirección 3'	No	Exón 9: -82 N	Exón 9: -79 N (S-10) Exón 9: -83 N (S-11)
Deleción de nucleótidos (N) en exones invertidos	---	Exón 10: -18 N en dirección 3'	Exón 10: -64 N	---
Exón no detectado en el transcrito	Exón 8	Exón 8	Exón 8	---
Intrón invertido detectado en el transcrito	---	---	---	Intrón 9: 4 N del extremo 5' (S-10) Intrón 9: 7 N del extremo 5' (S-11)
No. Total de exones involucrados en la inversión	4: exones 7-10	3: exones 8-10	2: exón 9 y 10	1: exón 9
No. Total de intrones involucrados en la inversión	4: intrones 7-10	4: intrones 7-10	1: intrón 9	1: intrón 9

1. *Muestras M4 –materna– y B13 –neonato–* (ver *Resultados*, Figuras S-8 y S-9 respectivamente). El par de rompimientos encontrados fue exón-intrón y el daño encontrado pudo ocurrir de la siguiente manera:

- (a) Rompimiento en el exón: se cree que uno de los puntos de ruptura pudo haberse generado dentro del exón 7 (Figura A13-1.1), ya que la secuencia del transcrito reveló una delección de 15 nucleótidos en el extremo 3' del exón de su secuencia ordenada.
- (b) Rompimiento en el intrón: se propone que el segundo rompimiento pudo ocurrir en algún punto del intrón 10 (Figura A13-1.1) por dos razones; la primera de ellas es que el primer exón invertido fue el 10 y, la segunda, que la secuencia del mismo estaba completa.

Por otra parte, en el transcrito no se detectó la secuencia del exón 8 (ordenado o invertido), pero, tomando en cuenta los puntos de ruptura, se puede suponer que este exón también se encontraba invertido junto con el extremo 3' del exón 7 donde se llevó a cabo uno de los rompimientos quedando fuera del área amplificada (Figura A13-1.2). Así, este evento involucró parte del exón 7 y los exones 8, 9 y 10, así como a los intrones 7, 8, 9 y 10.

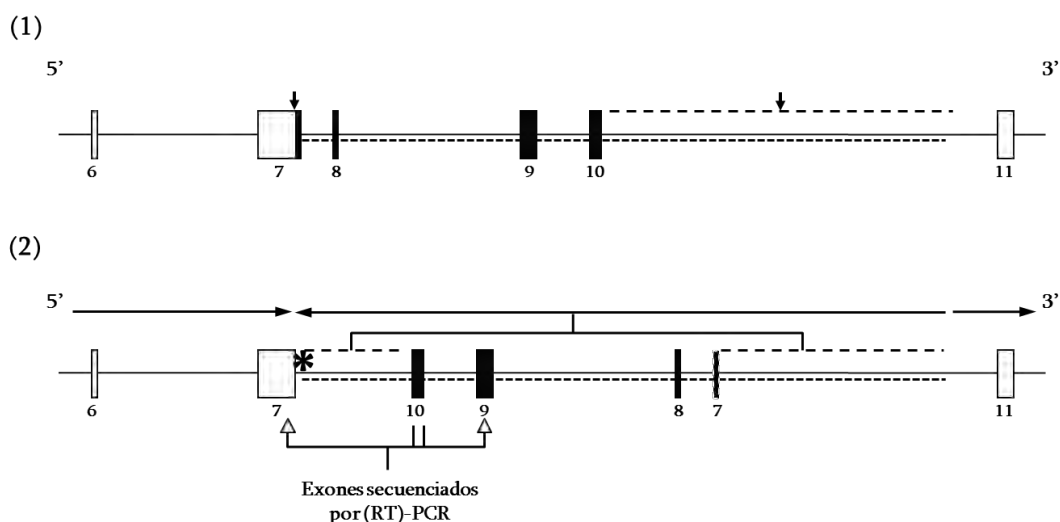


Figura A13-1. Esquema para representar la posible formación de las inversiones detectadas en las muestras M4 (materna) y B13 (neonato) que involucran a los exones 7, 8, 9 y 10 con sus respectivos intrones. Los exones se encuentran representados por cajas, los intrones por una línea horizontal. Los exones (o una parte de ellos) que participan en la inversión están en negro, los intrones involucrados en este evento se señalan con una línea paralela punteada. (1) El punto de ruptura es indicado por una flecha hacia abajo; cuando se desconoce en qué punto preciso se da el rompimiento, la flecha se acompaña con una línea horizontal punteada. (2) La secuencia ordenada se indica con una flecha apuntando a la derecha; la secuencia invertida es señalada por una flecha hacia la izquierda, es apoyada por un corchete y una línea punteada al desconocer qué región del intrón está involucrada en la inversión; el asterisco indica que una parte del exón no está presente en la secuencia; dicha región se representa con una caja cuya orilla está punteada mostrando su posible ubicación dentro de la inversión. En la parte inferior se indican los exones secuenciados del transcrito amplificado; las regiones donde se unieron los oligonucleótidos en la (RT)-PCR están señalados por triángulos blancos.

2. *Muestra M1 –materna–* (ver *Resultados*, Figura S-10). En esta inversión el par de rompimientos fue intrón-exón, daño que se cree se presentó de la siguiente forma:

- (a) Rompimiento en el intrón: se propone que uno de los rompimientos se produjo en algún punto del intrón 7 (Figura A13-2.1), considerando dos observaciones. La primera de ellas fue que el extremo 3' del exón 7 se encontró intacto (es decir, no había pérdida de nucleótidos), cuya secuencia estaba ordenada; la segunda fue que, inmediatamente después del exón 7, se encontraba el exón 10 invertido y no se detectó la presencia del exón 8.
- (b) Rompimiento en el exón: la secuencia del transcrito permitió deducir que el segundo rompimiento pudo ocurrir dentro del exón 10 (Figura A13-2.1), puesto que había una ausencia de 19 nucleótidos en el extremo 3' del mismo –si se considera la secuencia ordenada del exón–, nucleótidos que se cree pudieron localizarse después de la región invertida del gen (Figura A13-2.2).

Aunado a lo anterior, e igual que en la inversión encontrada en las muestras M4 y B13 no se detectó la secuencia del exón 8 (ordenada o invertida); sin embargo, al conocer los puntos de ruptura, se puede suponer que este exón también se encuentra invertido (Figura A13-2.2). Con todo lo anterior, se propone que este tipo de inversión involucró a los exones 8, 9 y parte del 10, así como a los intrones 7, 8 y 9.

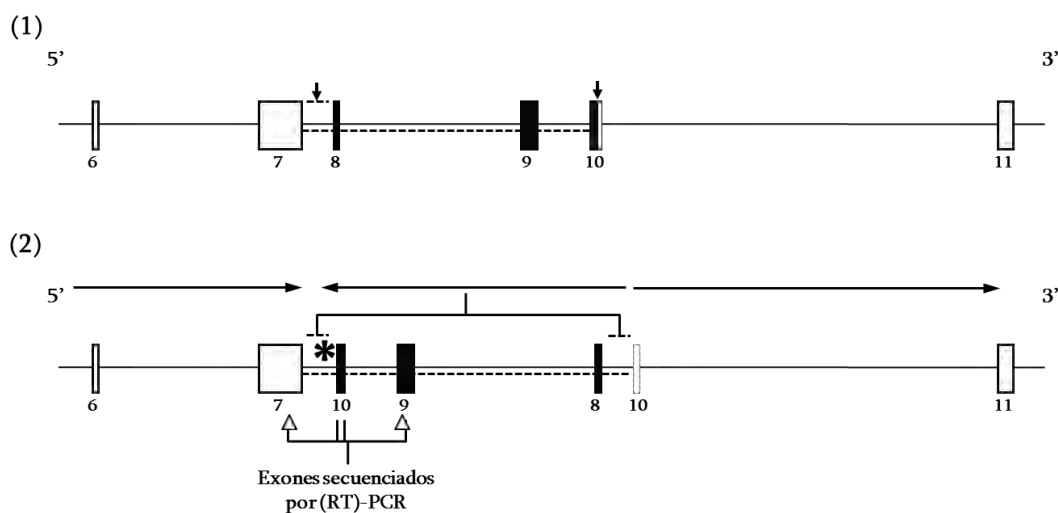


Figura A13-2. Esquema para representar la posible formación de la inversión en la muestra M1 (materna) que involucra a los exones 8, 9 y 10 y a los intrones 7, 8 y 9. Los exones se encuentran representados por cajas, los intrones por una línea horizontal. Los exones (o una parte de ellos) que participan en la inversión están en negro, los intrones involucrados en éste evento se señalan con una línea paralela punteada. (1) El punto de ruptura es indicado por una flecha hacia abajo; cuando se desconoce en qué punto preciso se da el rompimiento, la flecha se acompaña con una línea horizontal punteada. (2) La secuencia ordenada se indica con una flecha apuntando a la derecha; la secuencia invertida es señalada por una flecha hacia la izquierda, es apoyada por un corchete y una línea punteada al desconocer la región del intrón que está involucrada en la inversión; el asterisco indica que una parte del exón no está presente en la secuencia, dicha región se representa con una caja cuya orilla está punteada mostrando su posible ubicación dentro de la secuencia ordenada (es decir, no participa en la inversión). En la parte inferior se indican los exones secuenciados del transcrito amplificado; las regiones donde se unieron los oligonucleótidos en la (RT)-PCR están señalados por triángulos blancos.

3. *Muestra B46 –neonato–* (ver *Resultados*, Figura S-11). El tipo de inversión detectada en esta muestra involucró un par de rompimientos dentro de exones como se explica a continuación:

- (a) Rompimiento en el primer exón: Igual que en la inversión explicada en el inciso 1, se propone que uno de los puntos de ruptura se generó dentro de un exón (Figura A14-3 A.3 y B.1), ya que se detectó la pérdida de nucleótidos en el extremo 3' de la secuencia ordenada del primer exón involucrado (e identificado en el transcrito), en este caso de 82 nucleótidos en el exón 9.
- (b) Rompimiento en el segundo exón: De forma similar a la inversión del inciso 2, se cree que el segundo rompimiento pudo ocurrir dentro del exón 10 (Figura A14-3 A.3 y B.1), debido a que se observó la ausencia de 64 nucleótidos en el extremo 3', si se considera la secuencia ordenada, del exón invertido.

En lo anterior, cabe destacar que, a comparación de las inversiones previamente explicadas, en donde la pérdida de nucleótidos se limitaba a sólo unos cuantos (19 y 15 nucleótidos respectivamente), en esta inversión, los nucleótidos ausentes era de tres a cuatro veces más (64 y 82 nucleótidos).

Por otra parte, en esta inversión también se observó la ausencia del exón 8 en el transcrito; sin embargo, a diferencia de las dos anteriores, aquí los puntos de rompimiento se identificaron en los exones 9 y 10, por lo que se descarta que el exón 8 también se encuentre invertido.

Tomando en cuenta los puntos anteriores, se propone que la pérdida del exón 8 es un evento independiente de la inversión. Analizando todas las posibilidades se cree que dicha pérdida pudo ocurrir antes de que se generara la inversión (Figura A14-3 A.1 y A.2), después del evento de inversión (Figura A14-3 B.3 y B.4), o bien, en el transcrito mediante un evento de *splicing* alternativo (Figura A14-3 B.3). En todos los casos, lo conveniente sería amplificar y secuenciar la región dentro del DNA para poder corroborar o descartar dichas propuestas; lamentablemente, no se contó con el material para llevar a cabo esto último. Sin embargo, ya se ha reportado con anterioridad la posibilidad de que el exón 8 puede perderse tanto a nivel del DNA como a nivel del RNA mensajero mediante un *splicing* alternativo [156], evento que también se ha visto puede involucrar al exón 11 del mismo gen [157].

Así, de este análisis se pueden concluir dos cosas: (1) la inversión involucró a los exones 9 y 10, junto con el intrón 9 y (2) hubo un evento de delección del exón 8 independiente a la inversión, ya que la inversión está limitada a los exones y al intrón previamente mencionados.

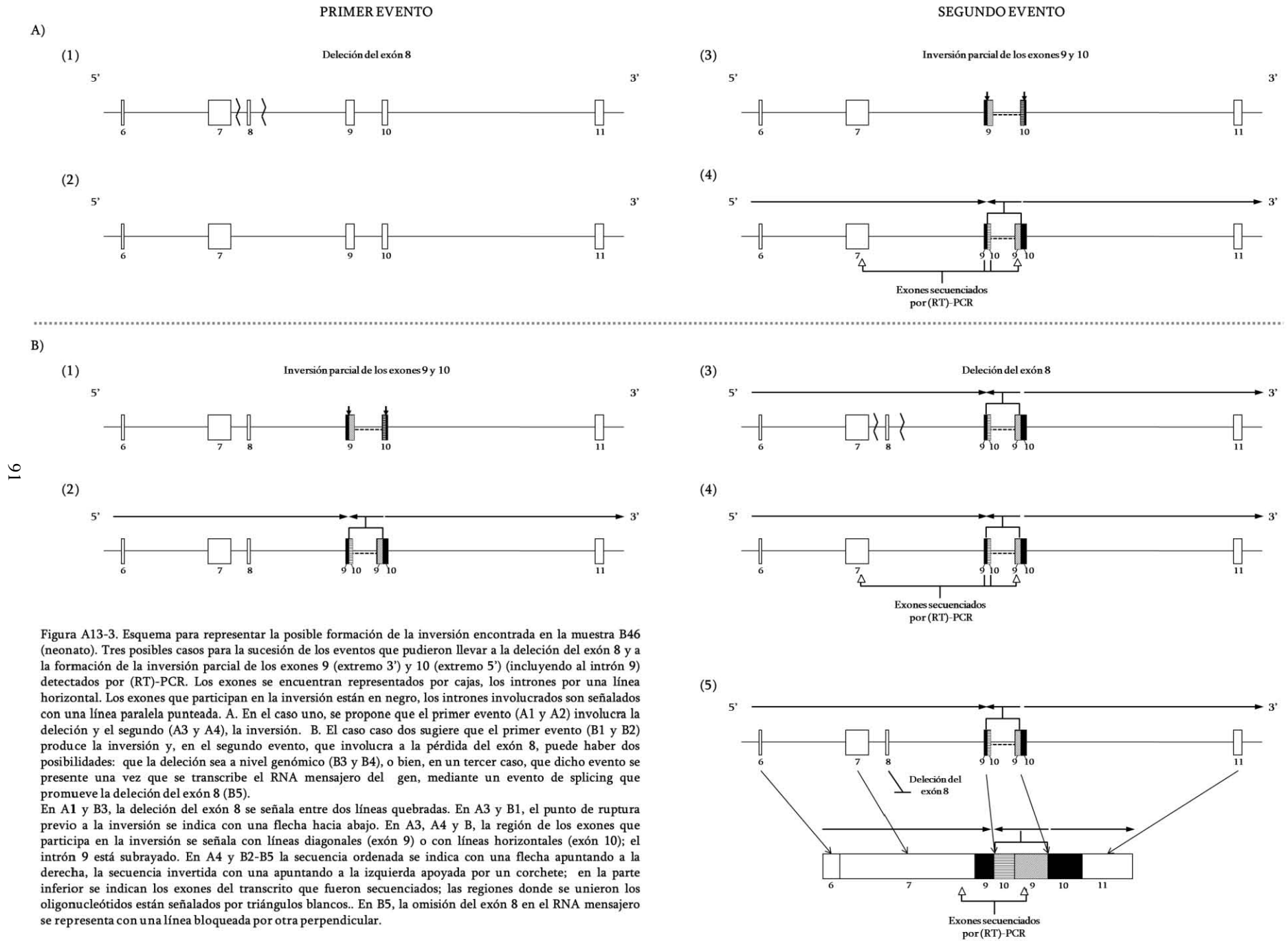


Figura A13-3. Esquema para representar la posible formación de la inversión encontrada en la muestra B46 (neonato). Tres posibles casos para la sucesión de los eventos que pudieron llevar a la delección del exón 8 y a la formación de la inversión parcial de los exones 9 (extremo 3') y 10 (extremo 5') (incluyendo al intrón 9) detectados por (RT)-PCR. Los exones se encuentran representados por cajas, los intrones por una línea horizontal. Los exones que participan en la inversión están en negro, los intrones involucrados son señalados con una línea paralela punteada. A. En el caso uno, se propone que el primer evento (A1 y A2) involucra la delección y el segundo (A3 y A4), la inversión. B. El caso caso dos sugiere que el primer evento (B1 y B2) produce la inversión y, en el segundo evento, que involucra a la pérdida del exón 8, puede haber dos posibilidades: que la delección sea a nivel genómico (B3 y B4), o bien, en un tercer caso, que dicho evento se presente una vez que se transcribe el RNA mensajero del gen, mediante un evento de splicing que promueve la delección del exón 8 (B5).

En A1 y B3, la delección del exón 8 se señala entre dos líneas quebradas. En A3 y B1, el punto de ruptura previo a la inversión se indica con una flecha hacia abajo. En A3, A4 y B, la región de los exones que participa en la inversión se señala con líneas diagonales (exón 9) o con líneas horizontales (exón 10); el intrón 9 está subrayado. En A4 y B2-B5 la secuencia ordenada se indica con una flecha apuntando a la derecha, la secuencia invertida con una apuntando a la izquierda apoyada por un corchete; en la parte inferior se indican los exones del transcrito que fueron secuenciados; las regiones donde se unieron los oligonucleótidos están señalados por triángulos blancos. En B5, la omisión del exón 8 en el RNA mensajero se representa con una línea bloqueada por otra perpendicular.

4. *Muestras M26 –materna– y B11 –neonato–* (ver *Resultados*, Figuras S-12 y S-13 respectivamente). Estas dos muestras tuvieron un par de rompimientos similar al que se presentó en las muestras del inciso 1 (M4 y B13), es decir, del tipo exón-intrón, aunque este daño ocurrió en una región diferente del gen:

- (a) Rompimiento en el exón: con el análisis del transcrito, se pudo deducir que uno de los puntos de ruptura se localizó en el extremo 3' del exón 9 ordenado (Figura A14-4.1), pues se detectó la ausencia de 79 y 89 nucleótidos en el exón.
- (b) Rompimiento en el intrón: en este tipo de inversión, se concluyó que el segundo rompimiento se presentó dentro del intrón 9 (Figura A14-4.1), ya que en la secuencia de los transcritos se encontró la presencia de 4 y 7 nucleótidos invertidos que corresponden al extremo 3' del intrón 9, considerando la secuencia ordenada del gen, seguidos del exón 9, también invertido (Figura A14-4.2).

La identificación de los puntos de rompimiento en esta inversión permitió llegar a la conclusión de que el evento involucró sólo al exón 9 y al intrón 9 (Figura A14-4.2), siendo así, el daño más pequeño –en cuanto a pares de bases de refiere – de todos los detectados en este trabajo.

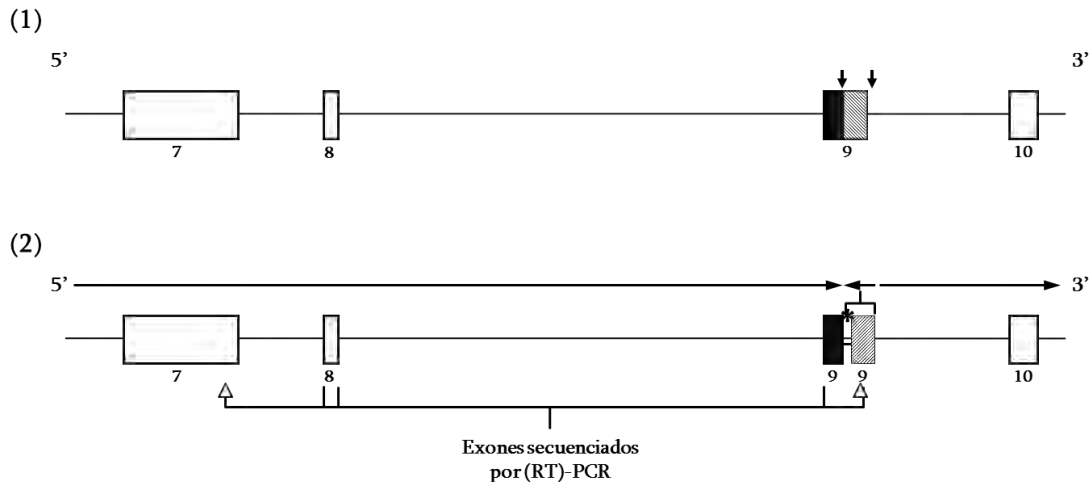


Figura A13-4. Esquema para representar la posible formación de la inversión encontrada en las muestras M26 (materna) y B11 (neonato) del transcrito del gen *MLL* que involucran al exón 9 y al intrón 9. Los exones se encuentran representados por cajas; los intrones, por una línea horizontal. (1) El primer punto de rompimiento se produce dentro del exón 9 (en negro) y el segundo a lo largo de los primeros nucleótidos del intrón 9, de forma que (2) sólo una parte del exón 9 y del intrón 9 quedan invertidos. La región invertida del exón 9 se indica con líneas diagonales y la del intrón 9 con una línea paralela. La secuencia ordenada se indica con una flecha apuntando a la derecha, la secuencia invertida con una apuntando a la izquierda, apoyada por un corchete; la interrupción en la secuencia ordenada del exón 9 se señala con un asterisco. En la parte inferior se marcan los exones del transcrito que fueron secuenciados, incluyendo la región del intrón que también se invirtió; las regiones donde se unieron los oligonucleótidos están señalados por triángulos blancos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tirado-Gomez LL, Betancourt AM. *Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas*. *Cancerología*, 2007; 2: 109-120.
2. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*. 10th Revision. Version for 2007. Disponible en:
<http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/> (página consultada el 10 de agosto de 2010).
3. Howard MR, Hamilton PJ. *Haematology: An Illustrated Colour Text*. Nueva York. Churchill Livingstone. 1997; 110 pp.
4. Crans HN, Sakamoto KM. *Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2001; 15: 313-331.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en:
<http://globocan.iarc.fr> (página consultada el 11 de agosto de 2010).
6. *The Global Burden of Disease. 2004 Update*. World Health Organization. Suiza, 2008. 146pp.
7. Boyle P, Levin B. (eds). *World Cancer Report, 2008*. International Agency for Research Cancer. World Health Organization. Lion, 2008. 512 pp.
8. Cavdar AO, Kutluk T. *Chapter 15. Childhood Cancer*. En: L. S. Freedman, B. K. Edwards, L. A. G. Ries, J. L. Young (eds). *Cancer Incidence in Four Member Countries (Cyprus, Egypt, Israel, and Jordan) of the Middle East Cancer Consortium (MECC) Compared with US SEER*. National Cancer Institute. NIH Pub. No. 06-5873. Bethesda, MD. 150 pp. Disponible en:
<http://seer.cancer.gov>
9. Automated Childhood Cancer Information System. [Internet]. Disponible en:
<http://www-dep.iarc.fr/accis.htm> (página consultada el 19 de agosto de 2010).
10. Blade PD, Youlden DR, Valery PC, Hassall T, Ward L, Green AC, Aiken JF. *Trends in Incidence of Childhood Cancer in Australia, 1983-2006*. *British Journal of Cancer*, 2010; 102: 620-626.
11. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. *Incidence of Childhood Cancer in France: National Children Cancer Registres, 2000-2004*. *European Journal of Cancer Prevention*, 2010; 19 (3): 173-181.
12. Torres P, Galán Y, Lence J, Garcia M, Lezcano M, Fernández L. *Childhood Cancer in Cuba, 2001-2003*. *MEDICC Review*, 2010; 12 (2): 19-25.
13. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Ortega-Alvárez MC, Mejía-Arangure JM. *Incidence of cáncer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study)*. *BMC Cancer*, 2007; 4:68. doi:10.1186/1471-2407-7-68.
14. Rivera R. *Hemato-oncología Pediátrica. Principios Generales*. Editores de Textos Mexicanos. México. 2006. 557pp.
15. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. *International Classification of Childhood Cancer, Third Edition*. *Cancer*, 2005; 103 (7): 1457-1467.

16. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD (Editores). *Postgraduate Haematology*. 4ta. edición. Butterworth Heinemann. Italia. 1999. 722 pp.
17. The Leukemia & Lymphoma Society. *La Leucemia*. PS77. 25 p. Disponible en:
<http://www.leukemia-lymphoma.org>
18. Moneypenny CG, Shao J, Song Y, Gallagher EP. *MLL rearrangements are induced by low doses of etoposide in human fetal hematopoietic stem cells*. *Carcinogenesis*, 2006; 27(4): 274-881.
19. The Leukemia & Lymphoma Society. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. PS34. 45 p. Disponible en:
<http://www.leukemia-lymphoma.org>
20. The Leukemia & Lymphoma Society. *Chronic Myelogenous Leukemia*. PS31. 45 p. Disponible en:
<http://www.leukemia-lymphoma.org>
21. The Leukemia & Lymphoma Society. *Acute Lymphocytic Leukemia*. PS33. 45 p. Disponible en:
<http://www.leukemia-lymphoma.org>
22. The Leukemia & Lymphoma Society. *Acute Myeloid Leukemia*. PS32. 53 p. Disponible en:
<http://www.leukemia-lymphoma.org>
23. Greaves M. *Molecular Genetics, Natural History and the Demise of Childhood Leukemia*. *European Journal of Cancer*, 1999; 35(14): 1941-1953.
24. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Söderhäll S, Kolmannskog S, Vettenranta K, Kristinsson J, Clausen N, Melbye M, Hjalgrim H, Gustafsson G. *Age- and Sex-Specific Incidence of Childhood Leukemia by Immunophenotype in the Nordic Countries*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2003; 95(20): 1539-1544.
25. United States Cancer Statistics (USCS). *Childhood Cancer (detailed by ICCC* group)*. [Internet]. National Program of Cancer Registries. Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en:
<http://apps.nccd.cdc.gov/uscs/index.aspx> (página consultada el 25 de agosto de 2010)
26. Rivera R. *Oncología pediátrica. Conceptos básicos y Clínicos*. Intersistemas. México. 2002. 396pp.
27. Burmeister T, Thiel E. *Molecular genetics in acute and chronic leukemias*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2001; 127: 80-90.
28. Zhang Y, Rowley JD. *Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia*. *DNA Repair*. 2006; 5: 1282-1297.
29. Greaves M. *Science, medicine, and the future: Childhood leukaemia*. *British Medical Journal*. 2002; 324: 283-287.
30. Hartl DL, Jones EW. *Genetics: Analysis of genes and genomes*. Estados Unidos de América. Jones and Bartlett. 7ma. edición. 2009. 763 p. Hartl DL, Jones EW. *Genetics: Analysis of genes and genomes*. Estados Unidos de América. Jones and Bartlett. 7ma. edición. 2009. 763 p.
31. Kersey JH. *Fifty Years of Studies of the Biology and Therapy of Childhood Leukemia*. *Blood*, 1997; 90(11): 4243-4251.
32. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Introduction to Genetic Analysis*. Estados Unidos de América. W. H. Freeman and Company. 9na edición. 2008. 838 p.
33. Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrózek K, Arthur DC, Herzig GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AMW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD. *Partial Tandem Duplication of ALL as a Recurrent Molecular Defect In Acute Myeloid Leukemia with Trisomy 11*. *Cancer Research*, 1996; 56: 1418-1425.

34. Basecke J, Whelan JT, Griesinger F, Bertrand FE. *The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia*. British Journal of Haematology, 2006; 135: 438-449.
35. Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Kim CS, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. *Phanhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment-related leukemias*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997; 94: 11583-11588.
36. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, and Jorgensen P. *Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia*. Blood, 1998; 92 (2): 574-588.
37. Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W, Chen YC, Wang CH, Shen MC, Lin DT, Lin KH, Tien HF. *Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23*. Leukemia, 2002; 16: 196-202.
38. Shih LY, Liang DC, Fu JF, Wu JH, Wang PN, Lin TL, Dunn P, Kuo MC, Tang TC, Lin TH, Lai CL. *Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement*. Leukemia, 2006; 20: 218-223.
39. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. *Tandem Duplications of MLL and FLT3 Are Correlated With Poor Prognoses in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group*. Pediatric Blood & Cancer, 2008; 50: 264-269.
40. Yamamoto S, Nishi M, Taniguchi K, Imayoshi M, Ogata Y, Iwanaga M, Sekai N, Hamasaki Y, Ishii E. *Partial Tandem Duplication of MLL Gene in Acute Myeloid Leukemia With Translocation (11;17)(q23;q12-21)*. American Journal of Hematology, 2005; 80: 46-49.
41. Pui CH, Relling MV, Downing JR. *MECHANISMS OF DISEASE: Acute Lymphoblastic Leukemia*. The New England Journal of Medicine, 2004; 350(15): 1535-1548.
42. Raimondi SC, Chang MN, Ravindranath Y, Behm FG, Gresik MV, Steuber CP, Weinstein HJ, Carroll AJ. *Chromosomal Abnormalities in 478 Children With Acute Myeloid Leukemia: Clinical Characteristics and Treatment Outcome in a Cooperative Pediatric Oncology Group Study –POG 8821*. Blood, 1999; 94 (11): 3707-3716.
43. Greaves MF, Wiemels J. *Origins of chromosome translocations in childhood leukemia*. Nature Reviews. Cancer, 2003; 3(9): 639-649.
44. Aplan PD. *Causes of oncogenic chromosomal translocation*. Trends in Genetics, 2006; 22(1): 46-55.
45. Rowley JD. *The critical role of chromosome translocations in human leukemias*. Annual Review of Genetics, 1998; 32: 495-519.
46. Look AT. *Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias*. Science, 1997; 278: 1059-1064.
47. Rabbitts TH. *Chromosomal translocation master genes, mouse models and experimental therapeutics*. Oncogene, 2001, 20: 5763-5777.
48. Rowley JD. *Chromosome translocations: dangerous liaison revisited*. Nature Reviews Cancer. 2001(1): 245-250.
49. Crans HN, Sakamoto KM. *Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia*. Leukemia, 1991; 15: 313-331.
50. Shinton NK (Editor). *Desk Reference for Hematology*. 2da. Edición. CRC Press, Taylor & Francis Group. Estados Unidos. 2008. 993pp.

51. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstöm-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.* Blood, 2009; 114: 937-951.
52. Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM, Cossman J, Bertness VL, Kirsch IR. *Disruption of the Human SCL Locus by "Illegitimate" V-(D)-J Recombinase Activity.* Science, 1990; 250: 1426-1429.
53. Aplan PD, Lombardi DP, Reaman GH, Sather HN, Hammond GD, Kirsch IR. *Involvement of the Putative Hematopoietic Transcription Factor SCL in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.* Blood, 1992; 79(5): 1327-1333.
54. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M, Delabesse E, de Oliveira MP, Cavé H, Clappier E, van Dongen JJM, Balgobind BV, van den Heuvel-Eibrink MM, Beverloo HB, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schrappe M, Alonso CN, Schäfer BW, Krauter J, Lee DA, zurStadt U, Te Kronnie G, Sutton R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Lo Nigro L, Tsaour G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkenstin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. *New insights to the MLL recombinome of acute leukemias.* Leukemia, 2009; 23: 1490-1499.
55. Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, Carroll AJ, Hakami N, Frankel LS, Pullen DJ, Cleary ML. *Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study.* Blood, 1994; 84: 570-573.
56. Greaves MF. *Aetiology of acute leukemia.* The Lancet, 1997; 349: 344-349.
57. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayasi H, der Poel SZ, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, Chaganti RSK, Larson RA, Le Beau MM, Díaz MO, Rowley JD. *Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.* Blood, 1993; 329 (13): 909-914.
58. Heerema NA, Arthur DC, Sather H, Albo V, Feusner J, Lange BJ, Steinherz PG, Zelter P, Hammond D, Reaman H. *Cytogenetic Features of Infants Less Than 12 Months of Age at Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia: Impact of the 11q23 Breakpoint on Outcome: A Report of the Childrens Cancer Group.* Blood, 1994; 83(8): 2274-2284.
59. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM, Carroll A, Eden OB, Evans WE, Gardner H, Harbott J, Harms DO, Harrison CJ, Harrison PL, Heerema N, Janka-Schaub G, Kamps W, Masera G, Pullen J, Raimondi SC, Richards S, Riehm H, Sallan S, Sather H, Shuster J, Silverman LB, Valsecchi MG, Vilmer E, Zhou Y, Gaynon PS, Schrappe M. *Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements.* Leukemia, 2003; 17: 700-706.
60. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. *Biological and therapeutic aspects of infant leukemia.* Blood, 2000; 96(1): 24-33.
61. Forestier E, Heim S, Blennow E, Borgström E, Borgström G, Holmgren G, Heinonen K, Johannsson J, Kerndrup G, Andersen MK, Lundin C, Nordgren A, Rosenquist R, Swolin B, Johansson B. *Cytogenetic abnormalities in childhood acute myeloid leukemia: a Nordic series comprising all children enrolled in the NOPHO-93-AML trial between 1993 and 2001.* British Journal of Haematology, 2003; 121: 566-577.
62. Meyer C, Schneider B, Jakob S, Strehl S, Attarbaschi A, Schnittger S, Schoch C, Jansen MWJC, van Dongen JJM, den Boer ML, Pieters R, Ennas M-G, Angelucci E, Koehl U, Greil J, Griesinger F, zurStadt U, Eckert C, Szczepanski T, Niggli FK, Schäfer BW, Kempfski H, Brady HJM, Zuna J, Trka J, Nigro LL, Biondi A, Delabesse E, Macintyre E, Stanulla M, Schrappe M, Haas OA, Burmeister T, Dingermann T,

- Klingebl T and Marschalek R. *The MLL recombinome of acute leukemias*. *Leukemia*, 2006; 20: 777-784.
63. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard O. *High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 1995; 86: 4263-4269.
 64. Raimondi SC, Shurtleff SA, Downing JR, Rubnitz J, Mathew S, Hancock M, Pui CH, Rivera GK, Grosveld GC, Behm FG. *12p Abnormalities and the TEL Gene (ETV6) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Blood*, 1997; 90: 4559-4566.
 65. Sandae JE, Arceci RJ, Lampkin C. *Congenital and Neonatal Leukemia*. *Seminars in Perinatology*, 1999; 23(4): 274-285.
 66. Greaves M. *In utero origins of childhood leukaemia*. *Early Human Development*, 2005; 81: 123-129.
 67. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. *Leukemia in twins: lessons in natural history*. *Blood*, 2003; 102(7): 2321-2333.
 68. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC, Greaves M. *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukemias*. *Nature*, 1993; 363: 358-360.
 69. Gill-Super HJ, Rothberg PG, Kobayashi H, Freeman AI, Diaz MO, Rowley JD. *Clonal, Nonconstitutional Rearrangements of the MLL Gene in Infants Twins With Acute Lymphoblastic Leukemia: In Utero Chromosome Rearrangement of 11q23*. *Blood*, 1994; 83 (3): 641-644.
 70. Mahmoud HH, Ridge SA, Behm FG, Pui CH, Ford AM, Raimondi SC, Greaves MF. *Intrauterine Monoclonal Origin of Neonatal Concordant Acute Lymphoblastic Leukemia in Monozygotic Twins*. *Medical and Pediatric Oncology*, 1995; 24: 77-81.
 71. Megonigal MD, Rappaport EF, Jones DH, Williams TM, Lovett BD, Kelly KM, Lerou PH, Moulton T, Budarf ML, Felix CA. *t(11;22) (q23;q11.2) in acute myeloid leukemia of infants twins fuses MLL with hCDCrel, a cell division cycle gene in the genomic region of deletion in DiGeorge and velocardiofacial syndromes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95: 6413-6418.
 72. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, Van Wering ER, Greaves M. *Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998; 95: 4584-4588.
 73. Wiemels JL, Ford AM, Van Wering ER, Postma A, Greaves M. *Protracted and Variable Latency of Acute Lymphoblastic Leukemia After TEL-AML1 Gene Fusion in Utero*. *Blood*, 1999; 94 (3): 1057-1062.
 74. Maia AT, Ford AM, Jalali GR, Harrison CJ, Taylor GM, Eden OB, Greaves MF. *Molecular tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy*. *Blood*, 2001; 98: 478-782.
 75. Teuffel O, Betts DR, Dettling M, Schaub R, Schäfer BW, Niggli FK. *Prenatal origin of separate evolution of leukemia in identical twins*. *Leukemia*, 2004; 18: 1624-1629.
 76. Ford AM, Pompo de Oliveira MS, McCarthy KP, MacLean JM, Carrico KC, Vincent RF, Greaves M. *Monoclonal Origin of Concordant T-Cell Malignancy in Identical Twins*. *Blood*, 1997; 89: 281-285.
 77. Zuna J, Muzikova K, Ford AM, Maia AT, Krejci O, Tousovska K, Oravkinova I, Greaves M, Trka J. *Prenatal, Clonal Origin of Acute Lymphoblastic Leukemia in Triplets*. *Leukemia & Lymphoma*, 2003; 44 (12): 2099-2102.

78. Maia AT, van der Velden VHJ, Harrison CJ, Szczepanski T, Williams MD, Griffiths MJ, van Dongen JJM, Greaves MF. *Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins*. *Leukemia*, 2003; 17: 2202-2206.
79. Kempinski H, Mensa-Bonsu KA, Kearney L, Jalali GR, Hann I, Khurshid M, Greaves M. *Prenatal Chromosomal Diversification of Leukemia in Monozygotic Twins*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2003; 37: 406-411.
80. Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. *Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997; 94: 13950-13954.
81. Fasching K, Panzer S, Haas OA, Marschalek R, Gadner H, Panzer-Grümayer R. *Presence of clone-specific antigen receptor gene rearrangements at birth indicates an in utero origin of diverse types of early childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2000; 95 (8): 2722-2724.
82. Maia AT, Koechling J, Corbett R, Metzler M, Wiemels JL, Greaves M. *Protracted Postnatal Natural Histories in Childhood Leukemia*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2004; 39: 335-340.
83. Burjanivova T, Madzo J, Muzikova K, Meyer C, Schneider B, Votava F, Marschalek R, Stary J, Trka J, Zuna J. *Prenatal origin of childhood AML occurs less frequently than in childhood ALL*. *BMC Cancer*, 2006; 6:100 doi: 10.1186/1471-2407-6-100. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/6/100>
84. Jones LK, Neat MJ, van Delft FW, Mitchell MP, Adamaki M, Stoneham SJ, Patel N, Saha V. *Cryptic rearrangement involving MLL and AF10 occurring in utero*. *Leukemia*, 2003; 17: 1667-1669.
85. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukemia in children*. *Lancet*, 1999; 354: 1499-1503.
86. Hjalgrim LL, Madsen HO, Melbye M, Jorgensen P, Christiansen M, Andersen MT, Pallisgaard N, Hokland P, Clausen N, Ryder LP, Schmiegelow K, Hjalgrim H. *Presence of clone-specific markers at birth in children with acute lymphoblastic leukemia*. *British Journal of Cancer*, 2002; 87: 994-999.
87. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Guo W, Loh ML, Smith MT. *Prenatal Origin of TEL-AML1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Children Born in California*. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2003; 37: 36-43.
88. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, Segal MR, Hunger SP, Smith MT, Crouse V, Ma X, Buffler PA, Pine SR. *Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 2002; 99 (23): 15101-15106.
89. Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, Smith MT, Zhang L, Feuser J, Wiencke J, Pritchard-Jones K, Kempinski H, Greaves M. *In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2002; 99: 3801-3805.
90. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Feuser J, Matthay K, Dahl G, Smith MT. *Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16)*. *Blood*, 2003; 101 (11): 4640-4641.
91. Yagi T, Hibi S, Tabata Y, Kuriyama K, Teramura T, Hashida T, Shimizu Y, Takimoto T, Todo S, Sawada T, Imashuku S. *Detection of clonotypic IGH and TCR rearrangements in the neonatal blood spots of infants and children with B-cel precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2000; 96 (1): 264-268.

92. Panzer-Grümayer ER, Fasching K, Panzer S, Hettinger K, Schmitt K, Stöckler-Ipsiroglu S, Haas OA. *Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis*. Blood, 2002; 100: 347-349.
93. Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Schott JS, Matherly LH, Ravindranath Y. *High frequency of leukemic clones in newborn screening blood samples of children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2002; 99: 2992-2996.
94. Rowley JD. *The critical role of chromosome translocations in human leukemias*. Annual Reviews of Genetics, 1998; 32: 495-519.
95. Janz S, Potter M, Rabkin CS. *Lymphoma- and Leukemia-Associated Chromosomal Translocations in Healthy Individuals*. Genes, Chromosomes & Cancer, 2003; 36: 211-223.
96. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. *t(12;21): A New Recurrent Translocation in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Genes, Chromosomes & Cancer, 1994; 9: 186-191.
97. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. *TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis*. Leukemia, 1995; 9 (12): 1985-9.
98. *ETV6 (ETS variant gene 6 (TEL oncogene))*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Genes/ETV6ID38.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
99. *RUNX (runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogen))*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Genes/AML1.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
100. *t(12;21)(p13;q22)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t1221.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
101. Romana SP, Mauchauffé M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. *The t(12;21) of Acute Lymphoblastic Leukemia Results in a tel-AML1 Gene Fusion*. Blood, 1995; 85 (12): 3662-3670.
102. Wiemels JL and Greaves M. *Structure and Possible Mechanisms of TEL-AML1 Gene Fusions in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cancer Research. 1999; 59: 4075-4082.
103. Wiemels JL, Alexander FE, Cazzaniga G, Biondi A, Mayer SP, and Greaves M. *Microclustering of TEL-AML1 Translocation Breakpoints in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. Genes, Chromosomes & Cancer, 2000; 29: 219-228.
104. Hiebert SW, Sun W, Davis JN, Golub T, Shurtleff S, Buijs A, Downing JR, Grosveld G, Roussel MF, Gilliland DG, Lenny N, Meyers S. *The t(12;21) Translocation Converts AML-1B from an Activator to a Repressor of Transcription*. Molecular and Cellular Biology, 1996; 16 (4): 1349-1355.
105. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B, Wang L, Westerndorf JJ, Downing JR, Hiebert SW. *Both TEL and AML-1 Contribute Repression Domains to the t(12;21) Fusion Protein*. Molecular and Cellular Biology, 1999; 19 (10): 6566-6574.
106. Hiebert SW, Lutterbach B, Durst K, Wang L, Linggi B, Wu S, Wood L, Amann J, King D, Hou Y. *Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2001; 48 (suplemento 1): S31-S34.
107. Davis JN, McGhee L, Meyers S. *The ETO (MTG8) gene family*. Gene, 2003; 303: 1-10.

108. *RUNX1T1 (runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related))*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Genes/ETO.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
109. *t(8;21)(q22;q22)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0821.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
110. Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith MT, Segal MR, Dicks BM, Wiencke JK, Wiemels JL. *Molecular characterization of genomic AML1-ETO fusions in childhood leukemia*. Leukemia, 2001; 15: 1906-1913.
111. Rhoades KL, Hetherington CJ, Rowley JD, Hiebert SW, Nucifora G, Tenen DG, Zhang DE. *Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996; 93: 11895-11900.
112. Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW. *ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors*. Molecular and Cellular Biology, 1998; 18 (12): 7176-7184.
113. Balkhi MY, Christopheit M, Chen Y, Geletu M, Behre G. *AML1/ETO-induced survivin expression inhibits transcriptional regulation of myeloid differentiation*. Experimental Hematology, 2008; 36: 1449-1460.
114. Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. *The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996; 93: 14059-14064.
115. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, González Díaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF, Biondi A. *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease*. Leukemia, 1999; 13: 1901-1928.
116. Burmeister T. *MLL: exploring the methylome*. Blood, 2010; 115: 4627-4628.
117. *MLL (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Genes/MLL.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
118. *AF4 (ALL fused gene from chromosome 4)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. Disponible en: atlasgeneticsoncology.org/Genes/AF4.html (página consultada el 20 de junio de 2012).
119. Hess JL. *MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia*. TRENDS in Molecular Medicine, 2004; 10 (10): 500-507.
120. Daser A, Rabbitts TH. *The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis*. Seminars in Cancer Biology, 2005; 15: 175-188.
121. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, Brandalise S, Cabrera ME, Chan LC, Chen Z, Cimino G, Cordoba JC, Gu LJ, Hussein H, Ishii E, Kamel AM, Labra S, Magalhaes IQ, Mizutani S, Petridou E, de Oliveira MP, Yuen P, Wiemels JL, Greaves M. *Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion*. Cancer Research, 2001; 51: 2542-2546.
122. Belson M, Kingsley B, Holmes A. *Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review*. Environmental Health Perspectives, 2007; 115 (1): 138-145.

123. Kim AS, Eastmond DA, Preston RJ. *Childhood acute lymphoblastic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures*. Mutation Research, 2006; 613: 138-160.
124. Infante-Rivard C, Weichenthal S. *Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review*. Journal of Toxicology and Environmental Health, part B, 2007; 10:81-99.
125. Wile DT, Turner MC, Krewski D. *A Systematic Review and Meta-analysis of Childhood Leukemia and Parental Occupational Pesticide Exposure*. Environmental Health Perspectives, 2009; 117 (10): 1505-1513.
126. Rudant J, Clavel J, Infante-Rivard. *Selection bias in case-control studies on household exposure to pesticides and childhood acute leukemia*. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, 2010; 20: 299-309.
127. Shu XO, Gao YT, Brinton LA, Linet MS, Tu JT, Zheng W, Fraumeni JF. *A Population-Based Case-Control Study of Childhood Leukemia in Shanghai*. Cancer, 1988; 62: 635-644.
128. Buckley JD, Robinson LL, Swotinsky R, Garabrant DH, LeBeau M, Manchester P, Nesbit ME, Odom L, Peters JM, Woods WG, Hammond GD. *Occupational Exposures of Parents of Children with Acute Nonlymphocytic Leukemia: A report from the Childrens Cancer Study Group*. Cancer Research, 1989; 49: 4030-4037.
129. Leiss JK, Savitz DA. *Home Pesticide Use and Childhood Cancer: A Case-Control Study*. American Journal of Public Health, 1995; 85 (2); 249-252.
130. Infante-Rivard C, Labuda D, Krajcinovic M, Sinnet D. *Risk of Childhood Leukemia Associated with Exposure to Pesticides and with Gene Polymorphism*. Epidemiology, 1999; 10 (5): 481-487.
131. Heacock, H. Hertzman C, Demers PA, Gallagher R, Hogg RS, Tschke K, Hershler R, Bajdik CD, Dimish-Ward H, Marion SA, Ostry A, Kelly S. 2000. *Childhood cancer in the offspring of male sawmill workers occupationally exposed to chlorophenate fungicides*. Environmental Health Perspectives, 2000; 108: 499-503.
132. Meinert R, Schüz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. *Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Exposure to Pesticides: Results of a Register-based Case-Control Study in Germany*. American Journal of Epidemiology, 2000; 151 (7): 639-646.
133. Ma X, Buffler PA, Gunier RB, Dahl G, Smith MT, Reinier K, Reynolds P. *Critical Windows of Exposure to Household Pesticides and Risk of Childhood Leukemia*. Environmental Health Perspectives, 2002; 110 (9): 955-960.
134. Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hémon D, Clavel J. *Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukemia*. Occupational & Environmental Medicine, 2006; 63: 131-134.
135. United States Environmental Protection Agency, EPA. Disponible en: www.epa.gov, (página consultada el 24 de junio de 2012).
136. Ecobichon DJ. *Capítulo 22: Efectos tóxicos de los Pesticidas*. En: Klaasen CD y Watkins III JB. *Cassarett y Doull. Fundamentos de Toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México, 2006; 536pp.
137. Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. *Micronuclei and pesticide exposure*. Mutagenesis, 2011; 26(1): 19-26.
138. Bolognesi C. *Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies*. Mutation Research, 2003; 543: 251-272.

139. Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. *Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review*. *Mutagenesis*, 2006; 21 (2): 93-103.
140. Carballo MA, Simoniolo MF, Kleinsorge EC. *Agrochemicals: Horticulture Use Conditions Determine Genotoxic Effects and Oxidative Damage in Rural Populations in Santa Fe, Argentina*. En: *Pesticides – The Impacts of Pesticides Exposure*. Prof. Margarita Stoytcheva (Ed). 2011. ISBN: 978-953-307-531-0, In Tech, 2011. Disponible en:
<http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticides-exposure/agrochemicals-horticulture-use-conditions-determine-genotoxic-effects-and-oxidativedamage-in-rural->
141. Gomez-Arroyo S, Martínez-Valenzuela C, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S. *Pesticides: Genotoxic Risk of Occupational Exposure*. En: *Pesticides – The impacts of Pesticides Exposure*, Prof. Margarita Stoythcheva (Ed.) ISBN: 978-953-531-0, In Tech, 2011. Disponible en:
<http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticides-exposure/pesticides-genotoxic-risk-ofoccupational-exposure>
142. Levario-Carrillo M, Sordo M, Rocha R, González-Horta C, Amato D, Ostrosky-Wegman. *Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes*. *Mutation Research*, 2005; 586: 68-75.
143. Milosevic-Djordjevic O, Grujicic D, Arsenijevic S, Marinkovic D. *Monitoring of Lymphocyte Micronuclei among Newborns from Kragujevac in Central Serbia before and after Environmental Contamination*. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2005; 205: 1-9.
144. Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R, Kirsh-Volders. *Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables*. *Mutagenesis*, 2011; 26 (1): 51-56.
145. Tang D, Li T, Liu JJ, Chen Y, Qu L, Perera F. *PAH-DNA Adducts in Cord Blood and Fetal and Child Development in a Chinese Cohort*. *Environmental Health Perspectives*, 2006; 114 (8): 1297-1300.
146. LaFiura KM, Bielawski DM, Posecion Jr. NC, Ostrea Jr. EM, Matherly LH, Taub JW and Ge Yubin. *Association Between Prenatal Pesticide Exposures and the Generation of Leukemia-Associate t(8;21)*. *Pediatric Blood Cancer*, 2007; 49: 624-628.
147. Alvarado-Hernández DL, Montero-Montoya R, Arellano-Aguilar O, Jasso-Pineda Y, Yáñez-Estrada L. *Assessment of exposure to organochlorine pesticides and levels of DNA damage in mother-child pairs of an agrarian community*. En proceso de impresión.
148. National Center for Biotechnology Information. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, (página consultada el 24 de abril de 2009).
 MLL: NCBI Reference Sequence: NM_005933.2
 AF4: NCBI Reference Sequence: NM_005935.2
 TEL: NCBI Reference Sequence: NM_001987.4
 AML1: NCBI Reference Sequence: NM_001754.4 y NM_001001890.2
 ETO: NCBI Reference Sequence: NM_175635.1 y NM_175636.1
149. Cotterill SJ, Parker L, Malcom AJ, Reid M, More L, Craft AW. *Incidence and survival for cancer in children and young adults in the North of England, 1968-1995; a report from the Northern Region Young Person's Malignant Disease Registry*. *British Journal of Cancer*, 2000; 83 (3): 397-403.
150. Xie Y, Davies SM, Roblson LL, Ross JA. *Trends in Leukemia Incidence and Survival in the United States (1973-1998)*. *American Cancer Society*, 2003; 97 (9): 2229-2235.

151. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Kaatsch P, Berrino F, Coebergh JW, Lacour B, Parkin M. *Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project); an epidemiological study*. Lancet, 2004; 364: 2097-2105.
152. Linabery AM, Ross JA. *Trends in Childhood Cancer Incidence in the U.S. (1992-2004)*. Cancer, 2008; 112 (2): 416-432.
153. Fajardo-Gutiérrez A, Garduño-Espinosa J, Yamamoto-Kimura L, Hernández-Hernández DM, Mejía-Aranguré M, Gómez-Delgado A, Farfán-Canto JM, Ortíz-Fernández A, Martínez-García MC. Risk factors associated with the development of leukemia in children. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 1993; 50 (4): 248-257.
154. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Miyazaki S, Ueda K, Kamada N, Mizutani S. *Breakage and fusión of the TEL (ETV6) gene in immature B lymphocytes induced by apoptogenic signals*. Blood, 2001; 97: 737-743.
155. Zucman-Rossi J, Legoix P, Vitor JM, Lopez B, and Thomas G. *Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998; 95: 11786-11791.
156. Löchner K, Siegler G, Führer M, Greil J, Beck JD, Fey GH, and Marschalek R. *A Specific Deletion in the Breakpoint Cluster Region of the ALL-1 Gene Is Associated with Acute Lymphoblastic T-Cell Leukemias*. Cancer Research, 1996; 56: 2171-2177.
157. Meyer C, Burmeister T, Strehl S, Scheider B, Hubert D, Zach O, Haas O, Klingebiel T, Dingermann T, Marschalek R. *Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric MLL-MLLT1 transcripts in t(11;19)(q23;p13.3) leukemia*. Leukemia, 2007; 21: 588-590.
158. Chiu B C-H, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD. *Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2006; 108 (4): 1363-1369.
159. Raynaud S, Cave H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Guidal-Giroux C, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. *The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 1996; 87: 2891-2899.
160. Romana SP, Le Coniat M, Poirel H, Marynen P, Bernard O, Berger R. *Deletion of the short arm of chromosome 12 is a secondary event in acute lymphoblastic leukemia with t(12;21)*. Leukemia, 1996; 10(1): 167-170.
161. Ford AM, Fasching K, Panzer-Grümayer ER, Koenig M, Haas OA, Greaves MF. *Origins of "late" relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes*. Blood, 2001; 98: 558-564.
162. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. *Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002; 99(12): 8242-8247.
163. Bausecke J, Cepek L, Mannhalter C, Kruter J, Hildenhausen S, Brittinger G, Trumper L, Griesinger F. *Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia*. Blood, 2002; 100: 2267-2268.
164. Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty ML, Sensel MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis B, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N. *Clinical Significance of MLL-AF4 Fusion*

- Transcript Expression in the Absence of a Cytogenetically Detectable t(4;11)(q21;q23) Chromosomal Translocation.* Blood, 1998; 92: 810-821.
165. Trka J, Zuna J, Hrusák O, Michalová K, Muzíková K, Kalinová M, Starý J. *No Evidence of MLL/AF4 Expression in Normal Cord Blood Samples.* Blood, 1999; 93(3): 1106-1107.
166. Kim-Rouille MH, MacGregor A, Wiedemann LM. *MLL-AF4 Gene Fusions in Normal Newborns.* Blood, 1999; 93(3): 1107-1108.
167. Brassesco MS, Montaldi AP, Gras DE, Gomes de Paula Queiroz R, Martinez-Rossi NM, Gonzaga Tone L, Sakamoto-Hojo ET. *MLL leukemia-associated rearrangements in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals.* Genetics and Molecular Biology, 2009; 32(2): 234-241.
168. Kwong YL, Wong KF. *Low frequency of TEL/AML1 in adult acute lymphoblastic leukemia.* Cancer Genetics and Cytogenetics, 1997; 98: 137-138.
169. Jabbar Al-Obaidi MS, Martineau M, Bennett CF, Franklin IM, Goldstone AH, Harewood L, Jalali GR, Prentice HG, Richards SM, Roberts K, Harrison CJ. *ETV6/AML1 fusion by FISH in adult acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 2002; 16: 669-674.
170. Cuneo A, Agostini P, Vitale A, Foà R, Castoldi G. *Frequency of ETV6/AML1 fusion in adult acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 2003; 17: 476-477.
171. Pui CH, Campana D. *Age-related differences in leukemia biology and prognosis: the paradigm of MLL-AF4-positive acute lymphoblastic leukemia.* Leukemia, 2007; 21: 593-594.
172. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. *AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000; 97 (13): 7521-7526.