



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“MONITOREO MOLECULAR DE LA LEUCEMIA
PROMIELOCÍTICA AGUDA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS, MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL,
EN EL INP”**

**TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
PRESENTA:**

Q.F.B. CÉSAR ISMAEL RODRIGUEZ RAMIREZ



MEXICO D.F.

2011



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.

Abreviaturas:

✚ Ácido trans-retinoico	ATRA
✚ Ácido Peryódico De Schiff	PAS
✚ Ácido Ribonucléico	ARN
✚ Cadena de DNA Complementario	cDNA
✚ Coagulación intravascular diseminada	CID
✚ Conteo Absoluto de Neutrófilos	CAN
✚ Enfermedad Mínima Residual	EMR
✚ Enolasa Neurona Específica	NSE
✚ Instituto Mexicano del Seguro Social	IMSS
✚ Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática	INEGI
✚ Leucemia Mieloide Aguda	LMA
✚ Leucemia Promielocítica Aguda	LPA
✚ Leucemia Promielocítica-Receptor del Ácido Retinóico α	PML-RAR α
✚ Metotrexate	MTX
✚ Microscopía Electrónica	ME
✚ Mieloxidasa Positiva	MP
✚ Organización Mundial de la Salud	OMS
✚ Remisión Completa	RC
✚ Secretaría de Salud	SSA
✚ Unidad formadora de colonias de eritrocitos	CFU-E
✚ Unidad formadora de colonias granulomonocíticas	CFU-GM
✚ Unidad formadora de colonias megacariocíticas	CFU-Mg
✚ 6-Mercaptopurina	6-MP

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: _____

VOCAL: Profesor: _____

SECRETARIO: Profesor: _____

1er. SUPLENTE: Profesor: _____

2° SUPLENTE: Profesor: _____

TRABAJO REALIZADO EN:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA-ONCOLOGÍA

ASESOR DEL TEMA:

EBC. LINA ROMERO GUZMÁN

SUSTENTANTE:

QFB. CÉSAR ISMAEL RODRÍGUEZ RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

A LA EBC LINA ROMERO GUZMÁN JEFA DEL DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS Y ESTUDIOS ESPECIALES DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ESTE TRABAJO, GRACIAS POR SU APOYO CIENTÍFICO Y PROFESIONAL.

AL DR. ROGELIO PAREDES AGUILERA, JEFE DEL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA POR PERMITIRME TRABAJAR CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS A SUS PACIENTES CON LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA Y POR SU INVALUABLE COLABORACIÓN LA CUAL HA PERMITIDO LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA QFB FABIOLA MÚJICA GUZMÁN QUIEN FORMO PARTE ACTIVA EN LA ASESORÍA DE ESTE TRABAJO, TANTO EN EL DESARROLLO EXPERIMENTAL COMO EN LA ORGANIZACIÓN Y REVISIÓN DE LA TESIS ESCRITA, GRACIAS POR SU CALIDAD HUMANA, CIENTÍFICA, PROFESIONAL Y EL DESEO DE SUPERACIÓN EN TODOS LOS ÁMBITOS.

A LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS (UNAM) Y LA FACULTAD DE QUÍMICA POR LOS PROFESORES QUE PROPORCIONARON SUS ENSEÑANZAS Y CONOCIMIENTOS Y AL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA LUGAR DE DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.

INDICE

<i>Capitulo</i>	<i>Página</i>
<i>Abreviaturas -----</i>	<i>1</i>
<i>I. Resumen -----</i>	<i>2</i>
<i>II. Introducción -----</i>	<i>3</i>
<i>2.1 Generalidades -----</i>	<i>3</i>
<i>2.1.1 Antecedentes Históricos -----</i>	<i>3</i>
<i>2.1.2 Epidemiología -----</i>	<i>6</i>
<i>2.1.2.1 Estadísticas de 2010 y 2011-----</i>	<i>7</i>
<i>2.1.3 Clasificación de las leucemias -----</i>	<i>13</i>
<i>2.2 Características de la Leucemia Promielocítica Aguda -----</i>	<i>18</i>
<i>2.2.1 Manifestaciones Clínicas de la LPA -----</i>	<i>18</i>
<i>2.3 Tratamiento -----</i>	<i>20</i>
<i>2.3.1 Fases del Esquema de Tratamiento -----</i>	<i>23</i>
<i>2.4 RT – PCR en Tiempo Real -----</i>	<i>25</i>
<i>2.4.1 Transcripción reversa en la PCR en tiempo real -----</i>	<i>25</i>
<i>III. Justificación -----</i>	<i>28</i>
<i>IV. Hipótesis -----</i>	<i>28</i>
<i>V. Objetivos -----</i>	<i>29</i>
<i>VI. Material y métodos -----</i>	<i>30</i>
<i>6.1 Características de los pacientes para tratamiento con LPA -----</i>	<i>30</i>

6.2 Estudios confirmatorios del laboratorio (Laboratorio de Hematología-Oncología) -----	30
6.3 RT-PCR en tiempo real -----	31
6.3.1 Procedimiento para la extracción de RNA con alta pureza utilizando el kit High Pure RNA Isolation cat. no.11828665001 Roche	31
6.3.2 Procedimiento para la síntesis de cDNA en el Termociclador modelo LightCycler de la casa comercial Roche -----	33
6.3.3 Procedimiento para la amplificación por RT-PCR tiempo real-----	34
VII. Resultados -----	34
VIII. Discusión de Resultados -----	37
IX. Conclusiones -----	39
X. Bibliografía -----	40

I. RESUMEN

La **Leucemia Promielocítica Aguda** (LAP) se caracteriza por la presencia de la translocación recíproca $t(15;17)$ que tiene como resultado la formación del gen híbrido PML-RAR α . La LPA tiene hoy en día un tratamiento muy específico con ácido trans-retinoico (ATRA) y es muy importante hacer un diagnóstico rápido y preciso, que en muchos casos permite salvar la vida del paciente. En la actualidad se han desarrollado métodos de RT-PCR para detectar el gen híbrido PML-RAR α . Estas técnicas moleculares han demostrado ser de mucha utilidad en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue monitorear la respuesta de los pacientes pediátricos con Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), durante el tratamiento con ATRA y hasta la remisión completa, usando como herramienta la técnica de RT-PCR Tiempo Real.

Para ello se estudiaron a 5 pacientes pediátricos en un inicio, sin embargo uno de ellos abandonó el tratamiento sin haberlo completado, por lo que solo se estudió finalmente a 4 pacientes, los cuales fueron diagnosticados citoquímica y morfológicamente como portadores de la translocación cromosómica $t(15,17)$ la se ha comprobado ampliamente da origen a la LPA.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la importancia práctica en el diagnóstico y seguimiento molecular de esta enfermedad, por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real durante cada fase del tratamiento, así se ha podido comprobar su eficacia desde el comienzo en la fase de inducción hasta la fase final de remisión, logrando un mejoramiento visible en cada uno de los cuatro pacientes (100%).

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la Leucemia, es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia. En el año 1998 en los Estados Unidos de América (EUA), 30% de la población era menor de 20 años, de los cuales, se calcula que aproximadamente en 12,400 casos se diagnosticó cáncer y 2,500 de murieron por dicha causa.¹

La Leucemia se puede definir como “La proliferación neoplásica de células hematopoyéticas, la cual surge producto de una mutación somática de una **célula madre hematopoyética**, a partir de la cual se origina un clon de células leucémicas; esta transformación puede ocurrir a nivel de una **célula madre pluripotente mieloide o linfoide** o a nivel de algunas de las células progenitoras comprometidas: unidad formadora de colonias de eritrocitos (CFU-E), unidad formadora de colonias granulomonocíticas (CFU-GM) y unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-Mg).”²

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 Antecedentes Históricos

Desde décadas atrás se descubrió el padecimiento del cáncer que ha afectado a millones de personas. Se dice que el cáncer fue reconocido por los egipcios como enfermedad, desde hace 3,000 años antes de Cristo. El papiro de Edwin Smith, es el escrito más antiguo conocido con una descripción del cáncer, en el se describen 8 casos de tumores de pecho o úlceras en Egipto, que fueron tratadas con cauterización.

Posteriormente en la Grecia antigua, Hipócrates, hoy conocido como el padre de la medicina, propuso la Teoría Humoral de la medicina, la cual establece que el







cuerpo se compone de cuatro fluidos: Sangre, Flemas, Bilis negra y Bilis amarilla. Él atribuía el Cáncer a un exceso de Bilis Negra. Hipócrates fue el primero en usar las palabras “*carcinosis*” y “*carcinoma*” para describir los tumores, y por lo tanto el término “*cáncer*” fue acuñado.

En 1915 por primera vez el Cáncer fue inducido en animales de laboratorio en la Universidad de Tokio, al aplicar carbón de hulla sobre la piel de conejos, abriendo el camino para los métodos actuales de investigación en cáncer.

La **leucemia** fue observada por primera vez por los patólogos Rudolf Virchow de Alemania y John Hughes Bennett de Inglaterra en 1845.^{3, 4} Observando un número anormalmente grande de linfocitos en una muestra de sangre de un paciente, Virchow llamó a la condición Leukäemie en alemán, la cual formó de las palabras griegas **leukos** (λευκός) que significa “blanco”, y **aima** (αίμα) que significa “sangre”. Aproximadamente diez años después de los hallazgos de Virchow y Bennett, el patólogo Alemán Franz Ernst Christian Neumann encontró que en la médula ósea de un paciente fallecido por leucemia, esta se coloreaba de un tono entre amarillo y verde sucio, opuesto al color rojo normal. Este hallazgo permitió a Neumann concluir que en la médula ósea se encontraba el problema que era responsable por la anomalía en la sangre de los pacientes con leucemia.⁵

En 1900 la leucemia fue vista como una familia de enfermedades en lugar de cómo una sola enfermedad. Para 1947 el patólogo pediatra Sydney Farber en Boston, basado en experiencias anteriores creyó que la **aminopterina** un fármaco quimioterapéutico, mimético del ácido fólico, podía potencialmente curar la leucemia en niños.⁵

Como una entidad especial, la **Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)**, fue descrita por primera vez en 1957 por el Dr. en Medicina Leif K. Hillestad en la revista Acta Médica Scandinávica de Suiza⁶. Cuando reportó a 3 pacientes caracterizados por “un curso fatal muy rápido de solo unas pocas semanas de duración” con una imagen de glóbulos blancos dominada por *promielocitos* y una severa tendencia al sangrado. Las características más detalladas de la *Leucemia Promielocítica Aguda* fueron descritas por Bernard et al.⁷ en 1959, y la diátesis de la hemorragia severa ha sido descrita como Coagulación Intravascular Diseminada (CID) o hiperfibrinólisis. En 1973 Bernard et al.⁷ demostraron que las células en la *Leucemia Aguda Promielocítica* eran relativamente sensibles a la quimioterapia, específicamente a la *daunorubicina* alcanzando la remisión completa en una tasa de 55% en 34 pacientes con *Leucemia Promielocítica Aguda*.⁸

					
Rudolph L. K. Virchow	Christian Neumann	Sydney Farber	Howard Skipper	Emil J. Fredriech, Jr.	Emil Frei III

L I N E A D E T I E M P O	1845	1850-	1900-	1940-	1950 y 1960-	1950 y 1960-	1962-	1960-
	El patólogo Rudolph L. Virchow y John Hughes Bennet son los primeros en describir la Leucemia como un desorden médico con sellos distintivos en la sangre	El patólogo Ernst Christian Neumann descubre que en la médula ósea se encuentra la anomalía en los pacientes con leucemia.	Las innovadoras manchas celulares revelan que la leucemia no es una sola enfermedad, sino una colección de al menos 4 tipos diferentes.	El patólogo Sydney Farber descubrió que un ácido fólico inactivo mimico (aminopterina) podía de forma transitoria mejorar a algunos niños con leucemia.	La investigación básica lleva al descubrimiento de varios fármacos antileucémicos, incluyendo la 6-mercaptopurina, vincristina y prednisona.	El Genetista Lloyd Law y el Farmacólogo Howard Skipper por qué la leucemia reaparece cuando los pacientes son tratados con un solo fármaco.	La primer cura para la leukemia es lograda cuando Emil J. Freireich, Jr. y Emil Frei III comenzaron a tratar los pacientes con una combinación de quimioterapia.	El Patólogo Peter Nowell y David Hungerford descubrieron que en las células blancas cancerosas de varios pacientes con leucemia mielóide crónica una porción de uno de sus cromosomas se había perdido.

Figura 1. Antecedentes Históricos de la Leucemia (Tomado y modificado por TLFBB et al. 2001¹⁰)






							
<i>Peter Nowell</i>	<i>Leonard Herzenberg</i>	<i>Janet Rowley</i>	<i>Kary Mullis</i>	<i>Brian Druker, M.D. Photo: Laura Sikes</i>			
<i>1970- El primer citómetro de flujo es desarrollado por el inmunólogo Leonard Herzenberg y su equipo.</i>	<i>1973- La Hematóloga Janet Rowley descubre que la Leucemia Mieloide Crónica se desencadena por una parte del cromosoma 22 que se rompe y se reinserta en el cromosoma 9 en el glóbulo blanco.</i>	<i>1980s- Los investigadores descubren que el gen fusionado (BCR-ABL) se forma cuando una porción del cromosoma 22 se transloca el cromosoma 9.</i>	<i>1980s and 1990s- El uso de la Citometría de Flujo revela más de una docena de diferentes subtipos de leucemia y ayuda a la detección de leucemia en células sobrevivientes al tratamiento.</i>	<i>1985- El Bioquímico Kary Mullis concibe primero la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).</i>	<i>1990s- La PCR es usada para poner a punto el diagnóstico de la leucemia y detectar las células de la leucemia que sobreviven al tratamiento.</i>	<i>1990s- El Oncólogo Brian Druker descubre como el gen BCR-ABL provoca una división excesiva de los glóbulos blancos y demuestra que el ST1571, un compuesto desarrollado por Novartis tiene actividad anti BCR-ABL en cultivos celulares.</i>	<i>2001- Después de las pruebas en humanos revelaron que el ST1571 tiene efectividad, la Administración de Alimentos y Fármacos lo aprueba bajo el nombre de Gleevec, como un fármaco para pacientes con Leucemia Mieloide Crónica.</i>

Figura 2. Antecedentes Históricos de la Leucemia (Tomado y modificado por TLFBB et al. 2001¹⁰)

2.1.2 Epidemiología

A nivel mundial el número estimado de muertes por cáncer es de alrededor de 7 millones (12% de todas las muertes) en el año 2000, solo precedido por muertes debidas a enfermedades cardiovasculares (30% de todas las muertes).⁹

En el año 2000, aproximadamente 256,000 niños y adultos alrededor del mundo desarrollaron una forma de leucemia, y 209,000 murieron por este padecimiento. Esto representa alrededor de 30% de al menos 7 millones de muertes debido al cáncer en ese año, y cerca del 0.35% de todas las muertes por alguna otra causa. De los 16 lugares separados del cuerpo comparado, la

leucemia fue el 12º tipo más común de enfermedad neoplásica, y la 11ª causa de muerte más común relacionada al cáncer.⁹

Alrededor de 245,000 personas en los Estados Unidos son afectadas por algún tipo de leucemia, incluyendo aquellos que han alcanzado la remisión o la cura. Aproximadamente 44,720 nuevos casos de leucemia fueron diagnosticados en el año 2008 en los Estados Unidos.¹¹

Esto representa el 2.9% de todos los tipos de cáncer (con exclusión de cáncer de células basales simples y células escamosas de la piel) en los Estados Unidos y 30.4% de todos los tipos de cáncer en la sangre.¹²

2.1.2.1 Estadísticas del 2010 y 2011

Nuevos casos.

Aproximadamente cada 4 minutos una persona en los Estados Unidos es diagnosticada con algún tipo de cáncer en la sangre. Se estima que un total de 137,260 personas en los Estados Unidos fueron diagnosticadas con Leucemia, Linfoma o Mieloma en el 2010. Estos nuevos casos contaron por un 9.0% de un total de 1, 529,560 nuevos casos de cáncer diagnosticados en los Estados Unidos en 2010.¹³

Incidencia

Las tasas de incidencia son el número de casos en un año determinado en el que no se cuentan los casos preexistentes. Las tasas de incidencia son usualmente presentadas como un número específico por cada 100,000 personas.¹³

Las tasas globales de incidencia por cada 100,000 personas reportadas en el 2010 para leucemia son cercanas a las mismas reportadas para el 2009 (12.3% para el 2010 vs. 12.2% para el 2009). La leucemia representa un 27.5% de los tipos de cáncer en niños en un rango de edades de 0 a 19 años.¹³

Incidencia por Género:

Las tasas de incidencia para todos los tipos de leucemia son mayores entre hombres que entre mujeres. En 2010, se estimó un conteo en hombres de más de 57% de nuevos casos de Leucemia.¹³

Incidencia en Niños

Desde el 2003 al 2007, la leucemia ha representado 28% de todos los tipos de cáncer diagnosticados en niños menores de 20 años.

✓ ***La leucemia es el tipo de cáncer más común en niños menores de 20 años de edad.***

En 2010, alrededor de 3,317 niños menores de 15 años de edad fueron diagnosticados con leucemia en los Estados Unidos. Aproximadamente 31% de los casos de cáncer en niños en un rango de edad de 0 a 14 años son de leucemia.¹³

Supervivencia

La supervivencia relativa se calcula comparando la tasa de supervivencia de una persona diagnosticada con una enfermedad contra una persona sin la enfermedad. La Figura 3 muestra las tasas de supervivencia relativa a cinco años para la leucemia, linfoma y mieloma durante 1960-1963, 1975-1977 y 1999-2006.

Debe notarse que los datos más recientes de supervivencia disponibles pueden no representar totalmente los resultados de todas las terapias actuales y, como resultado, puede sobreestimar la supervivencia en un pequeño grado.¹³

**Tasas de Supervivencia Relativa a 5 años
1960-63 vs. 1975-77 vs. 1999-2006**

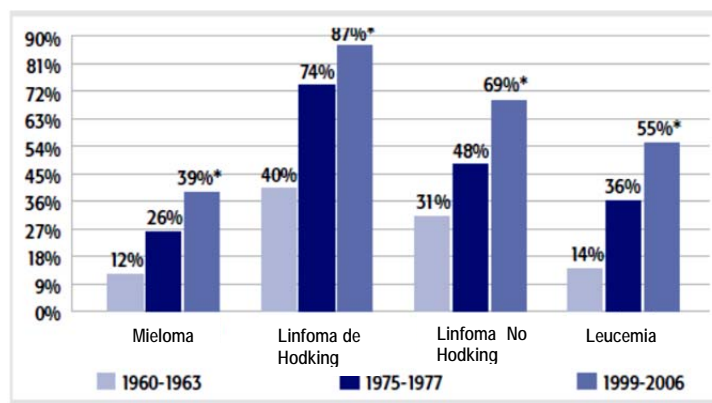


Figura 3. Fuente: SEER (Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales). * La diferencia en las tasas entre 1975-1977 y 1999-2006 son estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Tomado y modificado por TLFBB et al. 2001¹⁰)

En el año 2010 se estimó que había 259,889 personas viviendo con, o en remisión de leucemia en los Estados Unidos. En este mismo año 43,050 personas fueron diagnosticadas con leucemia y 21,840 murieron por esta enfermedad en los Estados Unidos. Aproximadamente 30% más Hombres viven con leucemia que Mujeres. Así mismo más Hombres son diagnosticados con Leucemia que mujeres y mueren más por esta enfermedad. La leucemia causa alrededor de un tercio de todas las muertes por cáncer en niños menores de 15 años de edad.¹³

Por la ausencia de un programa nacional sobre registros de cáncer en general específicamente de los niños, en México sólo existen datos sobre la incidencia de cáncer en niños del Distrito Federal y derechohabientes del IMSS, y

sobre la frecuencia de estas enfermedades en algunos estados de la República.^{14,15} Por lo tanto, se desconoce la magnitud del problema en el país y hacen falta datos de estudios prospectivos sobre la incidencia en general, pero también de la incidencia específica según los diferentes tipos de cáncer.¹⁶

En México, la información sobre incidencia de cáncer correspondiente al periodo comprendido entre 1993 y 1996 fue recopilada por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y la Secretaría de Salud (SS). En este periodo de tiempo, se diagnosticaron 106,086 personas con cáncer, principalmente mujeres (63.7%). Según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), el cáncer representa la segunda causa de muerte en nuestro país (49,916 defunciones en 1996). Las causas del cáncer no se conocen totalmente, en algunos casos se ha encontrado que ciertos factores genéticos, hereditarios y del medio ambiente aumentan la probabilidad de desarrollar esta enfermedad en algún momento de nuestra vida.¹⁶

Con respecto al cáncer infantil en nuestro país, la información más reciente corresponde a dos periodos de estudio: de 1996 a 2002 y de 1998 a 2000. Este estudio fue realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el cual se registró el número de casos de cáncer en niños, atendidos en los principales centros médicos de esta institución.¹⁶

La información correspondiente al periodo 1996-2002 comprende datos para los niños residentes en el Distrito Federal, Estado de México, Morelos, Guerrero y Chiapas. La segunda fuente de información son los datos obtenidos de un registro prospectivo de los casos de cáncer en niños atendidos durante el periodo 1998-2000 en los restantes Centros Médicos Nacionales del IMSS (CMN): Sonora

(Ciudad Obregón), Nuevo León (Monterrey), Torreón (Coahuila), Jalisco (Guadalajara), Puebla (Puebla), Veracruz (Veracruz) y Yucatán (Mérida).¹⁶

Se registraron 2,663 casos nuevos de cáncer en niños, de los cuales 1,957 (73.5 %) correspondieron al periodo 1996-2002 en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI y el Hospital General del CMN La Raza, y 706 (26.5 %) para el periodo 1998-2000 en los CMN restantes. En la Tabla I se pueden observar los diferentes tipos de neoplasias registradas en cada uno de los 11 estados.¹⁶

Los mayores números de casos nuevos correspondieron al Estado de México y al Distrito Federal, con 838 y 734, respectivamente. En relación con el tipo de neoplasias en general, los tres primeros lugares los ocuparon las leucemias (frecuencia entre 31.6 y 51.4 %, Nuevo León y Estado de México). Según el tipo específico de neoplasias, en el grupo de las leucemias predominaron las linfoblásticas agudas, la incidencia global se encontró entre 67.1 y 203.5 (Sonora y Chiapas). La incidencia por grupo de neoplasias fue más alta para las leucemias y tuvo una variación de 28.2 a 74.2 (Sonora y Chiapas).¹⁶

Tabla I

Frecuencia relativa (%) de neoplasias malignas en niños derechohabientes del IMSS residentes de 11 estados de la República Mexicana.¹⁶

Grupos de neoplasia	1996-2002					1998-2000					
	Chis n=143	DF n=734	Gro n=125	EM n=838	Mor n=117	Jal n=191	NL n=177	Pue n=114	Son n=48	Ver n=125	Yuc n=51
Leucemia	37.8	43.7	34.4	51.4	46.2	50.8	31.6	49.1	41.7	48.0	49.0*
Linfoide aguda	68.5	77.6	81.4	81.7	77.7	80.3	94.6	85.7	79.9	76.7	72.0***
Aguda no linfocítica	29.6	18.1	16.3	16.3	22.3	16.5	5.4	14.3	19.9	18.3	20.0
Mieloide crónica	1.9	2.7	2.3	1.4	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0
Otras leucemias	0.0	0.9	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Leucemias inespecíficas	0.0	0.7	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0
Linfomas***	10.5	12.0	16.8	9.0	12.9	8.9	12.4	16.7	16.7	12.8	2.0
Linfoma Hodgkin	40.0	25.8	33.3	47.8	20.2	34.8	45.2	52.7	0.0	56.3	100.0
Linfoma no Hodgkin	46.7	60.0	42.9	46.7	59.7	41.6	36.3	41.9	49.7	25.0	0.0
Linfoma de Burkitt	13.3	10.0	23.8	4.4	20.2	23.6	13.7	5.4	49.7	18.8	0.0
Linfomas inespecíficos	0.0	3.3	0.0	1.1	0.0	0.0	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0

En relación con las leucemias, debe comentarse que los datos corresponden a lo informado en la literatura, donde representan el principal grupo de cáncer y la leucemia linfoblástica aguda el caso más frecuente. Sin embargo, hay que destacar que los niños mexicanos tienen una de las frecuencias más altas del mundo (ocho estados tuvieron una frecuencia por arriba de 40 %) y, por tanto, una de las incidencias más altas (siete estados por arriba de 50), situación que comparten con niños de Canadá, hispanos y blancos de Los Ángeles, de Costa Rica y Ecuador (tasas de 50.8, 59.1, 50.9 y 57.9, 56.3 x 10⁶, respectivamente).¹⁶

Por otra parte, conocer la frecuencia e incidencia de cáncer en los niños también sirve para llevar a cabo la gestión de los servicios de salud, porque con estos datos se puede estimar el personal médico en general (médicos, enfermeras, de laboratorio, etcétera) necesario para dar atención a estos niños y los insumos que se requieren para brindarles el tratamiento idóneo.¹⁷

De ahí que para la atención que requieren los niños con cáncer residentes del Distrito Federal deberá tomarse en cuenta que una mayoría (43.7 %) tendrá leucemia (se espera tener anualmente 54.1 niños por cada millón de niños residentes en esta entidad) (Tabla II).¹⁶

Tabla II

Incidencia* de neoplasias malignas en niños derechohabientes del IMSS residentes de 11 estados de la República Mexicana.¹⁶

Grupos de neoplasia	1996-2002					1998-2000					
	Chis n=143	DF n=734	Gro n=125	EM n=838	Mor n=117	Jal n=191	NL n=177	Pue n=114	Son n=48	Ver n=125	Yuc n=51
Leucemia	74.2	55.4	58.8	60.2	66.8	42.5	32.5	72.9	28.2	54.8	50.1
Linfoide aguda	51.8	43.2	47.4	49.4	52.5	34.4	30.7	62.3	22.7	42.8	36.0
Aguda no linfocítica	21.2	9.8	10.1	9.6	14.3	6.8	1.8	10.6	5.5	9.1	10.1
Mieloide crónica	1.2	1.5	1.3	0.8	0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	2.9	0.0
Otras leucemias	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Leucemias inespecíficas	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0
Linfomas**	18.6	14.4	28.6	9.9	18.9	7.2	12.7	22.7	11.0	12.9	1.9
Linfoma Hodgkin	8.0	3.6	8.6	4.7	3.8	2.5	5.8	11.9	0.0	7.4	1.9
Linfoma no Hodgkin	8.2	8.9	12.8	4.7	11.2	3.0	4.6	9.4	5.5	3.2	0.0
Linfoma de Burkitt	2.4	1.4	7.2	0.4	3.9	1.7	1.7	1.4	5.5	2.3	0.0
Linfomas inespecíficos	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0

* Tasas por 1 millón de niños/año

2.1.3 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS

La leucemia se puede definir como “La proliferación neoplásica de células hematopoyéticas, la cual surge producto de una mutación somática de una **célula madre hematopoyética**, a partir del cual se origina un clon de células leucémicas; esta transformación puede ocurrir a nivel de una **célula madre pluripotente mieloide** o **linfoide** o a nivel de algunas de las células progenitoras comprometidas: unidad formadora de colonias de eritrocitos (CFU-E), unidad formadora de colonias granulomonocíticas (CFU-GM) y unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-Mg).”²

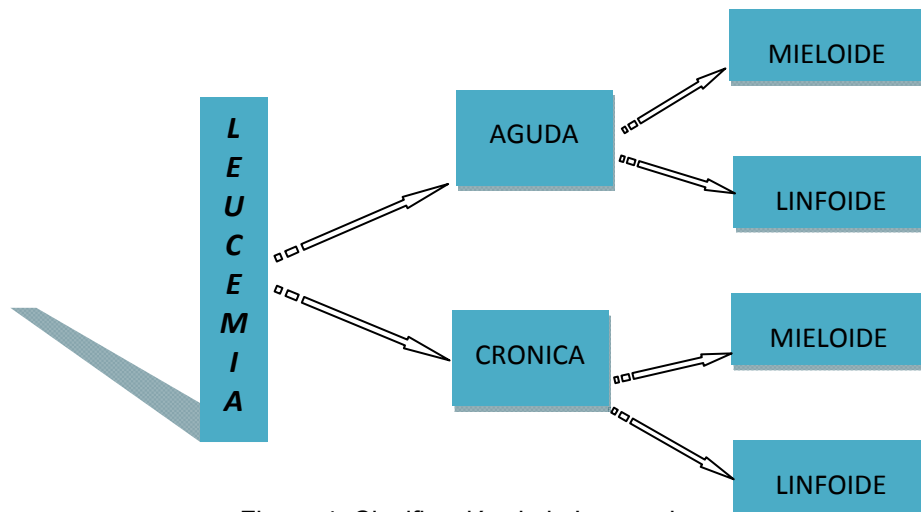


Figura 4. Clasificación de la Leucemia

Clínica y patológicamente, la **leucemia** es subdividida en una variedad de grandes grupos Figura 4 y 6. De acuerdo a la **Evolución** se clasifica en **AGUDA y CRÓNICA**.¹⁸

Leucemia Aguda: está caracterizada por un rápido incremento en el número de células sanguíneas inmaduras. El hacinamiento debido a estas células hace que la médula ósea sea incapaz de producir células sanguíneas sanas. En este tipo de leucemias se requiere un tratamiento inmediato debido a la rápida progresión y acumulación de células malignas, las cuales entonces se extienden al torrente sanguíneo y se propaga a otros órganos del cuerpo. Las formas agudas de la leucemia son las formas más comunes de **leucemia en niños**.¹⁸

Leucemia Crónica: es caracterizada por la excesiva acumulación de células sanguíneas relativamente maduras, pero aún anormales. Típicamente toma meses o años el progreso de la enfermedad, las células anormales son producidas en una tasa mucho mayor que las células normales, resultando en muchos glóbulos blancos anormales en sangre. Mientras que la leucemia aguda debe ser

tratada inmediatamente, las formas crónicas son algunas veces monitoreadas por algún tiempo antes del tratamiento para asegurar la máxima efectividad de la terapia. La leucemia crónica ocurre principalmente en gente mayor, pero teóricamente puede ocurrir en cualquier grupo de edad.¹⁸

Adicionalmente, las leucemias son subdivididas de acuerdo al tipo de célula sanguínea que se ve afectada. Esta división separa las leucemias en **Leucemias Linfoblásticas o Linfoides** y **Leucemias Mieloblásticas o Mieloides**.¹⁸

En las **Leucemias Linfoblásticas o linfoides**, el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula de la médula ósea que normalmente pasa a formar los linfocitos, los cuales son las células del sistema inmune que combaten infecciones. La mayoría de las **leucemias linfoblásticas** involucran un subtipo específico de linfocito, los linfocitos B.¹⁸

En las **Leucemias Mieloblásticas o Mieloides**, el cambio canceroso tiene lugar en un tipo de célula de la médula ósea que normalmente pasa a formar glóbulos rojos, algunos otros tipos de glóbulos blancos y plaquetas.¹⁸

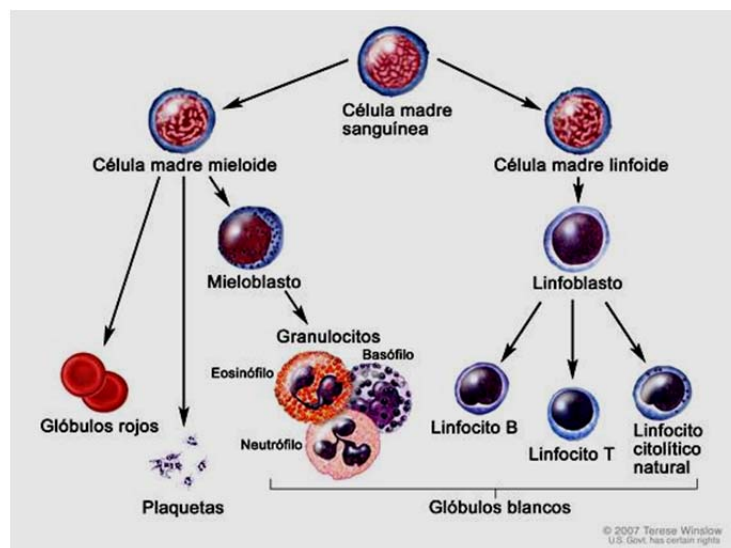


Figura 5. Esquema de desarrollo celular de la Serie Mieloide y Serie Linfóide en médula ósea. (Tomado y modificado de Taringa.net)³⁴

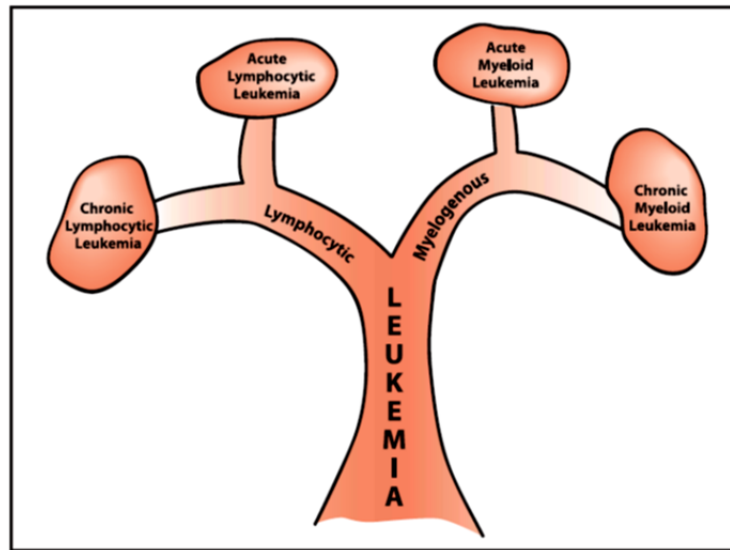


Figura 6. ÁRBOL DE LA LEUCEMIA. En 1900 la leucemia no era vista como una sola enfermedad, sino más bien parecido a un árbol con dos ramas principales que representan el tipo de serie celular: Linfoide o Mieloide, a su vez cada rama se subdivide en un tipo de leucemia dependiendo de la evolución de la misma: Crónica o Aguda. (Tomado y modificado por TLFBB et al. 2001¹⁰)

Leucemia Mieloide Aguda (LMA): También conocida como leucemia mielógena aguda y leucemia aguda no linfoblástica, es un grupo de trastornos malignos caracterizados por el reemplazo en médula ósea de células normales por células hematopoyéticas primitivas, lo cual si no se trata, evoluciona hacia la muerte, por lo regular por infección o hemorragia, o ambas. La leucemia aguda comienza en una célula progenitora hematopoyética que se transforma en una célula que es incapaz de diferenciarse normalmente; muchas de estas células no poseen la característica normal de la apoptosis o muerte celular programada, lo cual resulta en células con vida prolongada y proliferación clonal sin restricción.¹⁸

Con frecuencia, la leucemogénesis está asociada a alteraciones cromosómicas y transformaciones génicas. Hay translocaciones específicas para

algunos subtipos particulares de LAM, como es el caso de la **leucemia Promielocítica Aguda (LPA) con una translocación entre los cromosomas 15 y 17 (Tabla III)**. Debido a que las células transformadas (malignas) carecen de autorregulación en su crecimiento, esto representa una “ventaja” sobre las células hematopoyéticas normales, lo cual resulta en una acumulación de células anormales con defectos funcionales cuantitativos; una de las principales causas de morbilidad y mortalidad es la deficiencia funcional de las células hematopoyéticas maduras normales debido a la presencia de numerosas células malignas.¹⁸

Tabla III
La Clasificación Franco–Americano–Británica (FAB) divide la Leucemia Aguda Mieloblástica en 8 subtipos:¹⁹

TIPO DE CLASIFICACIÓN FAB	NOMBRE COMUN	CRITERIO PARA EL DIAGNÓSTICO	HISTOQUIMICA	<2 AÑOS	>2 AÑOS
M0	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.				
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.	Más de 90% de blastos de células no eritroides, 10% de células con granulocitos en maduración o monocitos	MP+	4 (17%)	32 (25%)
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración.	Blastos de 30 a 89% de células no eritroides mayores de 10% en granulocitos en maduración. Menos de 20% de monocitos	MP+	–	34 (27%)
M3	Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).	Más de 20% de promielocitos anormales hipergranulares, Bastoncillos de Auer comunes	MP+	–	6 (5%)
M3V	Leucemia promielocítica aguda (variante microgranular)	Citoplasma granular fino en promielocitos; el núcleo puede ser reniforme; la microscopia muestra múltiples gránulos oscuros primarios.	MP+	–	–

M4	Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).	Blastos >30% de células no eritroides; más de 20% pero menos de 80% de las células es de linaje monocítico; el conteo sanguíneo de monocitos es de más de 5×10^6 /ml, o valor alto de lisozima sérica o NSE.	MP+ NSE+	7(30%)	33(26%)
M4eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.	Eosinófilos anormales con gránulos específicos y grandes gránulos basófilos.	MP+ NSE+ Eo-PAS+	-	-
M5	Leucemia monocítica aguda (LMoA).	Más de 80% de células no eritroides se constituye por monoblastos, promielocitos o monocitos; los M5a: 80% abarca monoblastos; los M5b: 10% de los monocitos comprende monoblastos	NSE+	12(52%)	20(16%)
M6	Eritroleucemia aguda; son precursoras de glóbulos rojos.	Más de 30% de células no eritroides se conforman por blastos, pero >50% de células de la médula comprende eritroblastos.	PAS+	-	3(2%)
M7	Leucemia megacariocítica aguda.	Más de 30% de células no eritroides abarca megacarioblastos, mielofibrosis	Peroxidasa plaquetaria +ME	-	5 a 7%

MP, Mieloxidasa Positiva; NSE enolasa neurona específica; PAS, ácido periódico de Schiff; ME, microscopía electrónica

2.2 Características de la Leucemia Promielocítica Aguda

2.2.1 Manifestaciones Clínicas

El niño con LPA se puede presentar con muy pocos síntomas, o bien, el primer signo de leucemia quizá sea la infección o hemorragia que pongan en riesgo la vida. Al momento del diagnóstico, se estima que hay 1,012 células

leucémicas. Los signos y los síntomas por lo general reflejan disminución en la producción de células hematopoyéticas, lo cual conduce de modo inevitable a la anemia, infección o hemorragia, o ambas, de distintos grados.¹⁸

La infiltración extramedular por lo regular ocurre en piel y mucosas, por ejemplo, *leucemia cutis* que es una manifestación muy frecuente en el neonato.¹⁸ La coagulación intravascular diseminada (CID) puede aparecer en cualquier subtipo de LMA, pero es un dato en extremo habitual en pacientes con LPA debido a la actividad tromboplástica de los gránulos de los promielocitos. La CID se acelera cuando las células sufren lisis con el inicio de la quimioterapia y muchos investigadores recomiendan el uso de pequeñas dosis de heparina profiláctica durante la fase de inducción a la remisión en todos los pacientes con LPA.¹⁸

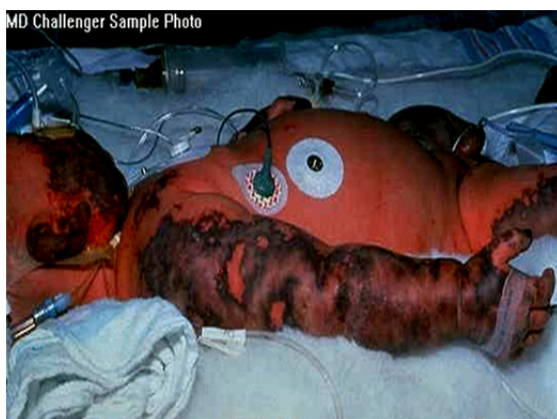


Figura 7. Paciente pediátrico con Coagulación Intravascular Diseminada (CID) (Tomada y modificada de unav.es)³⁵

El conteo absoluto de neutrófilos (CAN, que es la suma de los polimorfonucleares y los banda) de los individuos con LPA se encuentra con frecuencia reducido (menos de $1000/\text{mm}^3$) y ligado a infecciones bacterianas de pulmón, senos paranasales, encías, dientes, área perianal y piel, y quizá sea el primer signo de leucemia.¹⁸

En ocasiones, la sangre periférica contiene pocos o ningún blasto a pesar de que en la médula ósea se encuentra hipercelular con 80 a 90% de blastos. Aproximadamente una cuarta parte de niños con LPA tiene un conteo de leucocitos al momento del diagnóstico mayor de 100,000.¹⁸

La hepatomegalia o esplenomegalia ocurren en más de 50% de los niños con LPA. El crecimiento masivo de los ganglios linfáticos se observa en el momento del diagnóstico en menos de 25% de los casos, y es más frecuente con enfermos con leucemia con un componente monocítico (M4 y M5). Cloromas, mieloblastos y sarcoma granulocítico son tumores pequeños que se presentan en pacientes con LPA y que pueden aparecer con una coloración verdosa en la superficie de corte debido a la presencia de enzima mieloperoxidasa; tal vez surjan en huesos o tejidos blandos; con frecuencia se localizan en la región orbital y el área epidural.¹⁸



Figura 8. Hepatomegalia y esplenomegalia (Tomado y modificado de infectología pediátrica.com)³⁶

2.3 Tratamiento

La introducción del ácido transretinoico (ATRA) en el tratamiento de la LPA ha significado un extraordinario avance en el manejo de este tipo particular de leucemia, y su empleo, combinado con la quimioterapia, ha logrado mejorar

significativamente la sobrevida y el porcentaje de curación de estos pacientes.^{20,21,22}

El ácido transretinoico es un metabolito natural de retinol y pertenece a la clase de retinoides, incluyendo a los análogos naturales y sintéticos. Los estudios *in vivo* realizados con el ATRA han demostrado la inducción de la diferenciación y la inhibición de la proliferación celular en las líneas celulares hemopoyéticas transformadas, incluyendo las líneas celulares de leucemia mieloide humana.²³

Uno de los más importantes avances en el conocimiento de la patogénesis y del tratamiento de la LPA ha sido el aclarar la paradoja aparente de que la destrucción del RAR α provocada por la translocación PML-RAR α bloquea la diferenciación del promielocito, mientras que la administración de un ligando a dicho RAR α (ácido retinoico en forma de ácido t-retinoico o tretinoína) permite la diferenciación de las células leucémicas.^{24, 25, 26}

El receptor al ácido retinoico posee varias regiones funcionales que regulan la unión al DNA, la interacción con varios co-activadores y co-represores y los receptores para varios ligandos, entre ellos el ácido retinoico. El llamado complejo de represión transcripcional modifica la cromatina en las células normales impidiendo la transcripción, pero son suficientes concentraciones fisiológicas de ácido retinoico para desplazar dicho complejo.^{24, 25, 26}

En el caso de la LPA, los promielocitos leucémicos muestran una mayor cantidad de complejo de represión, debido a la expresión del receptor procedente de la translocación. Por lo tanto, son necesarias concentraciones farmacológicas de ácido retinoico para permitir la activación de la transcripción.^{24, 25}

La introducción del ácido all-trans-retinoico (ATRA) en la terapia inicial de la LPA, representa uno de los grandes avances en el tratamiento del cáncer en el ser humano. En la década pasada, varios estudios multicéntricos usando ATRA y combinaciones de quimioterapia basada en antraciclina, han reportado excelente respuesta que excede del 70%. Se han utilizado diferentes esquemas de tratamiento, desde monoquimioterapia hasta combinación de agentes de quimioterapia logrando buenos resultados, pero la respuesta para niños y adultos con LPA ha cambiado dramáticamente desde la introducción de la terapia con ATRA.²

Esta contribución al tratamiento fue hecha por el grupo de Shanghai en 1988, el doctor Huang Meng-er, quien con el uso del ácido ATRA logró remisión completa sin estados de comorbimortalidad grave por CID. La incorporación del ATRA como agente de diferenciación no citotóxico es valorado como el primer modelo de terapia dirigido a las alteraciones moleculares; este medicamento cambió el tratamiento, el pronóstico y el seguimiento de la LPA.²

Sobre las bases de estudios multicéntricos, las recomendaciones para el tratamiento de pacientes con LPA incluyen ATRA y quimioterapia basada en antraciclina para la inducción a la remisión, quimioterapia basada en antraciclina para la consolidación y ATRA combinada con dosis baja de quimioterapia para el mantenimiento. Otros estudios han demostrado que las antraciclinas solas son igualmente efectivas en inducir remisiones completas, en particular con idarrubicina en pacientes nuevos con LPA.²

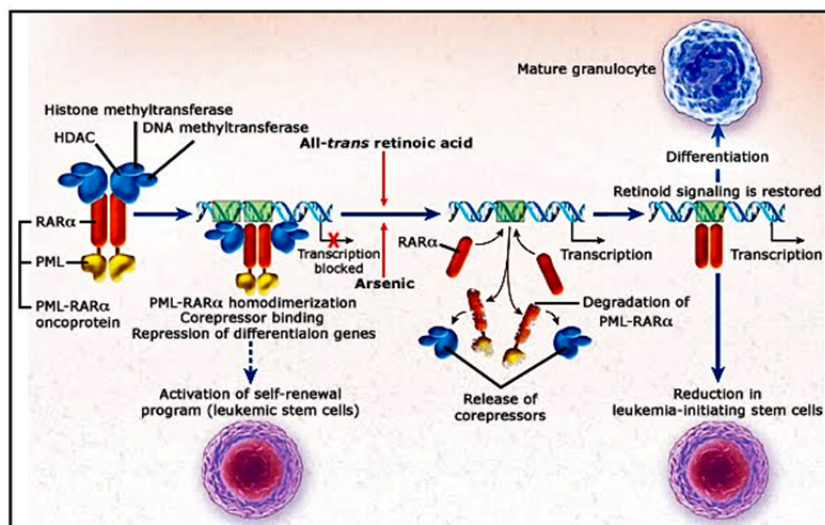


Figura 9. Mecanismo de acción del ATRA (Tomado y modificado de elrincondelamedicinainterna.blogspot.com)³⁷

2.3.1 Fases del Esquema De Tratamiento.

Tratamiento de Inducción a la remisión.

- ♦ **Ácido All-trans retinóico**, se administrará desde el día 1 por vía oral a la dosis de 25 mg/m²/día (redondeando al más próximo múltiplo de 10 por arriba) fraccionado en 2 tomas. El ATRA continuará hasta lograr la remisión completa o hasta un máximo de 90 días en caso de persistencia de promielocitos anormales en la médula ósea.
- ♦ **Idarubicina**, 12 mg/m² los días 2, 4, 6 y 8 de tratamiento por infusión intravenosa de 20 minutos.²

Tratamiento posremisión.

Consolidación.

Los pacientes que logren remisión, una vez se haya producido la recuperación hematológica (PMN > 1500/mm³ y plaquetas > 100.000/mm³),

recibirán tres ciclos sucesivos de quimioterapia de consolidación con intervalo de cuatro semanas si la recuperación hematológica entre ciclos lo permite. ²

Primer ciclo de consolidación.

- ♦ **Idarubicina:** 5 mg/m²/día en infusión intravenosa de 20 minutos los días 1, 2, 3 y 4 del ciclo.
- ♦ **ATRA:** 25 mg/m²/día fraccionado en dos tomas los días 1 a 15 del ciclo. ²

Segundo ciclo de consolidación.

- ♦ **Mitoxantrone:** 10 mg/m²/día en infusión intravenosa de 20 minutos los días 1, 2 y 3 del ciclo.
- ♦ **ATRA:** 25 mg/m²/día fraccionado en dos tomas los días 1 a 15 del ciclo. ²

Tercer ciclo de consolidación.

- ♦ **Idarubicina:** 12 mg/m²/día en infusión intravenosa de 20 minutos el día 1 del ciclo, dosis única.
- ♦ **ATRA:** 25 mg/m²/día fraccionado en dos tomas los días 1 a 15 del ciclo. ²

Mantenimiento

Se inicia cuatro semanas después del último ciclo de consolidación, previa valoración de la recuperación hematológica (PMN > 1500/mm³ y plaquetas > 100.000/mm³) y se aplicaran seis ciclos (duración total del tratamiento dos años).²

- ♦ **6-Mercaptopurina (6-MP):** 50 mg/m²/día vía oral repartir el total de la dosis en la semana.
- ♦ **Metotrexate (MTX):** 15 mg/m²/semanal, por vía oral. La dosis de 6-MP y MTX serán reducidas al 50% si la cifra de leucocitos es menor de 3.500/mm³ y suspendida si es menor a 2.500/mm³. ²

- ♦ **ATRA:** 25 mg/m²/día vía oral fraccionada en dos tomas, durante 15 días cada tres meses. El primer curso de mantenimiento con ATRA se comenzará 3 meses después de finalizar la consolidación. Durante los días de administración de ATRA se interrumpirá el tratamiento con MTX y 6-MP.²

2.4 RT – PCR en Tiempo Real

La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas como la LPA, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado.²⁷

Una característica importante de la PCR en tiempo real es su amplio rango dinámico. Esto implica que una amplia gama de ratios en los genes a estudiarse y en los genes normalizadores puede analizarse con similar sensibilidad y especificidad.²⁷

En esta prueba el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y el número de copias de ARNm o la expresión génica relativa entre varias muestras puede calcularse.²⁷

2.4.1 Transcripción reversa en la PCR en tiempo real

Una limitación de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una

manera similar. Este problema se puede superar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar cDNA a partir de una plantilla de ARN.²⁸

Hay varias transcriptasas inversas utilizadas comúnmente, entre ellas tenemos la transcriptasa inversa del virus aviar de mioblastosis y la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina, siendo la primera la más robusta de ellas. También es posible usar mezclas de transcriptasas inversas, pudiendo estas dar lugar a una mejor eficiencia de la transcripción inversa que las enzimas de componente individual.²⁸

Por esta razón la PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-PCR en tiempo real) se ha convertido en el método de elección para realizar un examen rápido y cuantitativo de la expresión de genes específicos, lo que no sería posible con anteriores metodologías.²⁸

Por último, es importante mencionar que dado que la PCR en tiempo real y la transcripción reversa se utilizan en combinación, la señal final obtenida en RT-PCR en tiempo real dependerá de la eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa.²⁸

Una de las más importantes ventajas de la PCR en tiempo real es que el proceso completo se realiza en el termociclador. Esta característica ayuda a disminuir el riesgo de posterior contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento de la prueba en tiempo real.²⁹ Para obtener estos resultados, este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR.²⁹

Hay dos clases principales de marcadores fluorescentes para la PCR en tiempo real: genéricos y específicos. Las técnicas que usan marcadores fluorescentes específicos emplean sondas de ácidos nucleídos que se unen a amplicones específicos (producto de PCR). Los métodos que utilizan sondas fluorescentes tienen la ventaja de ser muy precisos y evitar posibles artefactos o secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR.³⁰

La detección genérica se basa en la utilización de colorantes que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR (figura 10). Una vez que el colorante se une al ácido nucleído formado en la reacción, este emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real.¹⁸ Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR; esto permite que las concentraciones de ADN o ADNc puedan ser cuantificadas.³⁰

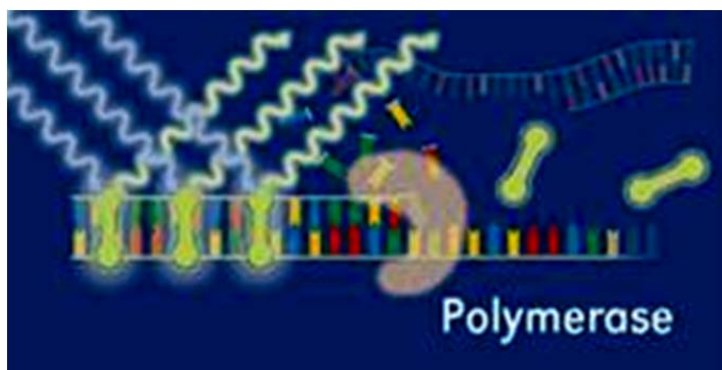


Figura 10. Los marcadores fluorescentes genéricos en la PCR en tiempo real emiten una señal luminosa para todas las secuencias de doble cadena. Esta señal luminosa puede ser medida posteriormente. (Tomado y modificado de monografias.com)³⁸

II. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la mortalidad por cáncer infantil en el ámbito mundial y en especial en México pudiera disminuirse si la prevención y la detección temprana fueran factibles de manera sistemática. Sin embargo, estos aspectos en los países en vías de desarrollo son limitados, debido a la restricción de recursos financieros, técnicos y al limitado conocimiento epidemiológico del cáncer en estas naciones.

En el presente trabajo, se pone de manifiesto la importancia de la aplicación de estudios a nivel genético como el RT-PCR en tiempo real. Esta técnica permite llevar a cabo la detección del gen híbrido PML-RAR α que está presente en todos los pacientes que padecen de **LPA**.²⁶ Esta técnica ha demostrado ser extraordinariamente útil en el diagnóstico rápido de esta enfermedad y en la detección de la enfermedad mínima residual (EMR), así como también para evaluar la efectividad durante cada fase del tratamiento, esto último es de vital importancia ya que de no haber un monitoreo de la evolución de la enfermedad en cada fase del mismo, el paciente podría entrar en recaída, lo cual una vez sucede, disminuyen enormemente las posibilidades de supervivencia para el paciente.

Por lo anterior se puede afirmar que la técnica de RT-PCR en tiempo real, permite evaluar la sobrevida del paciente y evidenciar la remisión total de la enfermedad.

III. HIPOTESIS

El monitoreo molecular del gen híbrido PML-RAR α , en pacientes pediátricos con **LAP** mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, permitirá llevar a cabo un seguimiento preciso de la enfermedad en cada fase del tratamiento así como también se podrá establecer la remisión de la enfermedad al final del mismo.

IV. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Monitorear la respuesta de los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Promielocítica (LAP), durante el tratamiento con ATRA y hasta la remisión completa, usando como herramienta la técnica de RT-PCR tiempo real.

5.2. Objetivos Particulares

5.2.1. Aplicar la técnica de RT-PCR en tiempo real para detectar la presencia del gen híbrido PML-RAR α en el seguimiento de la Leucemia Promielocítica Aguda.

5.2.2. Evaluar la respuesta al tratamiento mediante la cuantificación molecular del gen híbrido PML-RAR α durante cada fase del mismo.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron 5 pacientes pediátricos diagnosticados con LPA en 2008, 3 de género femenino y 2 de género masculino, los cuales recibieron tratamiento específico con ATRA y quimioterapia durante dos años.

6.1 Características de los pacientes para tratamiento con LPA

Criterios de Inclusión

1. Edad <18 años.
2. Diagnóstico morfológico de LPA (FAB M3 o M3 variante) t(15;17).^{Tabla III}
3. LPA con morfología atípica pero con reordenamiento PML-RAR α detectado por RT-PCR tiempo final.
5. Consentimiento informado de los padres y/o paciente de aceptación del tratamiento.

Criterios de Exclusión.

1. Tratamiento oncológico previo
2. Contraindicación para quimioterapia intensiva, principalmente al uso de antraciclinas
3. Creatinina sérica: Más de 3 veces el valor normal
4. Bilirrubinas, fosfatasa alcalina, AST, ALT más de tres veces el valor normal
5. Prueba de embarazo positiva según edad

6.2. Estudios confirmatorios de Laboratorio (Laboratorio de Hematología-Oncología)

- a) Aspirado de Médula Ósea

- b) Inmunotipificación por Citometría de Flujo
- c) Citogenética (Cariotipo)
- d) RT-PCR punto final

6.3 RT-PCR en tiempo real

Se basó en la obtención del RNAm, transcribirlo a cDNA y mediante cebadores específicos amplificar la fusión del gen PML-RAR α . El tiempo de diagnóstico osciló entre 1 y 2 días. Esta técnica tuvo la ventaja de ser altamente sensible, específica y útil para el seguimiento.

El PCR en tiempo real nos permitió cuantificar la carga tumoral útil en la detección de la enfermedad residual y seguimiento de la respuesta terapéutica.²

6.3.1 Procedimiento para la extracción de RNA con alta pureza utilizando el kit High Pure RNA Isolation cat. no.11828665001 Roche

1. Se agregó 1 ml de buffer de lisis de células rojas en un tubo estéril de 1.5ml.
2. Se agregaron 500 μ l de sangre y se mezclaron por inversión durante 10 min.
3. Se centrifugaron durante 5 minutos 500 x g.
4. Con una pipeta se removió cuidadosamente el sobrenadante
5. Se agregó 1 ml de buffer de lisis de células rojas al pellet blanco y se homogenizó hasta que el pellet estuvo resuspendido (no se utilizó vortex).
6. Se centrifugó durante 3 minutos a 500 x g.
7. Con cuidado, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet blanco en 200 μ l de PBS.
8. Se agregaron 400 μ l de buffer de unión/lisis (tapón verde) y se homogenizaron con vortex durante 15 segundos.

9. Se transfirió la muestra a un tubo para filtrarlo con alta pureza:
10. Se insertó el filtro en un tubo para coleccionar.
11. Se adicionó toda la muestra (máximo 700 μ l).
12. Se centrifugó durante 15 segundos a 8000 x g.
13. Después de centrifugar: se removi6 el filtro del tubo coleccionar, decantando el sobrenadante.
14. Se insert6 el filtro en otro tubo coleccionar.
15. Después de insertado el tubo: Se agreg6 90 μ l de buffer de incubaci6n DNAsa (tap6n blanco) en un tubo est6ril, y se agreg6 10 μ l de DNAsa I, se mezcl6 y se agreg6 la soluci6n al filtro. Se dej6 incubar durante 15 minutos a 15-25 $^{\circ}$ C.
16. Se agregaron 500 μ l de buffer de lavado 1 al filtro y se centrifug6 15s a 8000 xg.
17. Se decant6 el sobrenadante y se coloc6 nuevamente el filtro con el tubo coleccionar usado.
18. Se agregaron 500 μ l de buffer de lavado II (tap6n azul) al filtro y se centrifug6 durante 15 segundos a 8000 xg.
19. Se decant6 el sobrenadante y se coloc6 nuevamente el filtro al tubo coleccionar.
20. Se agregaron 200 μ l de buffer de lavado II (tap6n azul) al filtro y se centrifug6 durante 2 minutos a m6xima velocidad (aprox.13000 x g) para remover cualquier residuo del buffer de lavado.
21. Se decant6 el tubo coleccionar y se insert6 el filtro en un tubo est6ril de 1.5ml.
22. Se eluy6 el RNA y se agregaron de 50-100 μ l de buffer de Elusi6n al filtro.
23. Se centrifug6 durante 1 minuto a 8000 xg.
24. El tubo contuvo al RNA y se pudo utilizar directamente para RT-PCR o almacenarlo a -80° C para un an6lisis posterior.

6.3.2 Procedimiento para la síntesis de cDNA en el Termociclador modelo LightCycler de la casa comercial Roche

1. En tubos de 0.2 ml libres de RNAsas Se agregó 10 μ l del RNA, control positivo, control negativo según sea el caso más 4 μ l del primer de cDNA y se mezcló bien con pipeta automática hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
2. Se incubó a 65°C por 10 minutos.
3. Inmediatamente después se colocaron los tubos en una cama de hielo frappe.
4. Se agregaron 11 μ l de la mezcla de síntesis de cDNA la cual se preparó PREVIAMENTE
5. Se incubó a 37°C durante 90 minutos.
6. Se agregaron 25 μ l de agua libre de DNAsas y RNAsas.
7. Se dejó incubar a 95°C por 5 minutos.
8. Se corrieron las muestras en el termociclador con el siguiente programa y se colocaron en hielo.

Tabla IV. Programa de Ciclos para el Termociclador LightCycler de Roche

Paso	Temperatura y tiempo	Ciclos
1	15 minutos a 95°C	1
2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 min. 30 seg. A 72°C	25
3	Enfriar a 4 ° c	Infinito

6.3.3 Procedimiento para la amplificación por RT-PCR tiempo real

1. Realizar mezcla de reacción de acuerdo a los siguientes reactivos

Tabla V. Reactivos para mezcla de reacción para amplificación de cDNA

Buffer PCR 10X
dNTPs
HotStarTaq DNA polimerasa
H ₂ O

VII. RESULTADOS

Todos los casos fueron de diagnóstico reciente y se pudo detectar la presencia del gen híbrido PML-RAR α , así como realizar su cuantificación por RT-PCR Tiempo Real (estado basal).

Durante el monitoreo de cuantificación molecular del gen híbrido PML-RAR α en las diversas fases del tratamiento con ATRA (Figura 7) se observó que:

- 1.- Al finalizar el tratamiento de inducción se mostró un decremento considerable, en la cuantificación del gen, en 4 de los casos (80%) y un incremento en un solo caso (20%).
- 2.- De los 5 casos estudiados al finalizar la consolidación, 3 (60%) presentaron PCR-negativo en el monitoreo, 1 caso decremento su valor del gen pero aun así mantenía PCR-positivo, y 1 de los casos abandono el tratamiento.

3.- Un año después del tratamiento de consolidación y mantenimiento se analizaron molecularmente a los 4 casos (100%), todos presentando PCR-negativo, por lo que los pacientes se mantuvieron en remisión molecular y hematológica.

4.- Dos años después el estudio molecular de los 4 pacientes (100%) se presentó negativo. Los pacientes completaron su protocolo de tratamiento y el tratamiento fue suspendido para entrar en la fase de cese.

5.- Dos de los casos (50%) presentan PCR negativo después de los cuatro meses de cese del tratamiento, 2 de los pacientes (50%) están en proceso de completar los cuatro meses de cese por lo que todavía no se realiza el monitoreo.

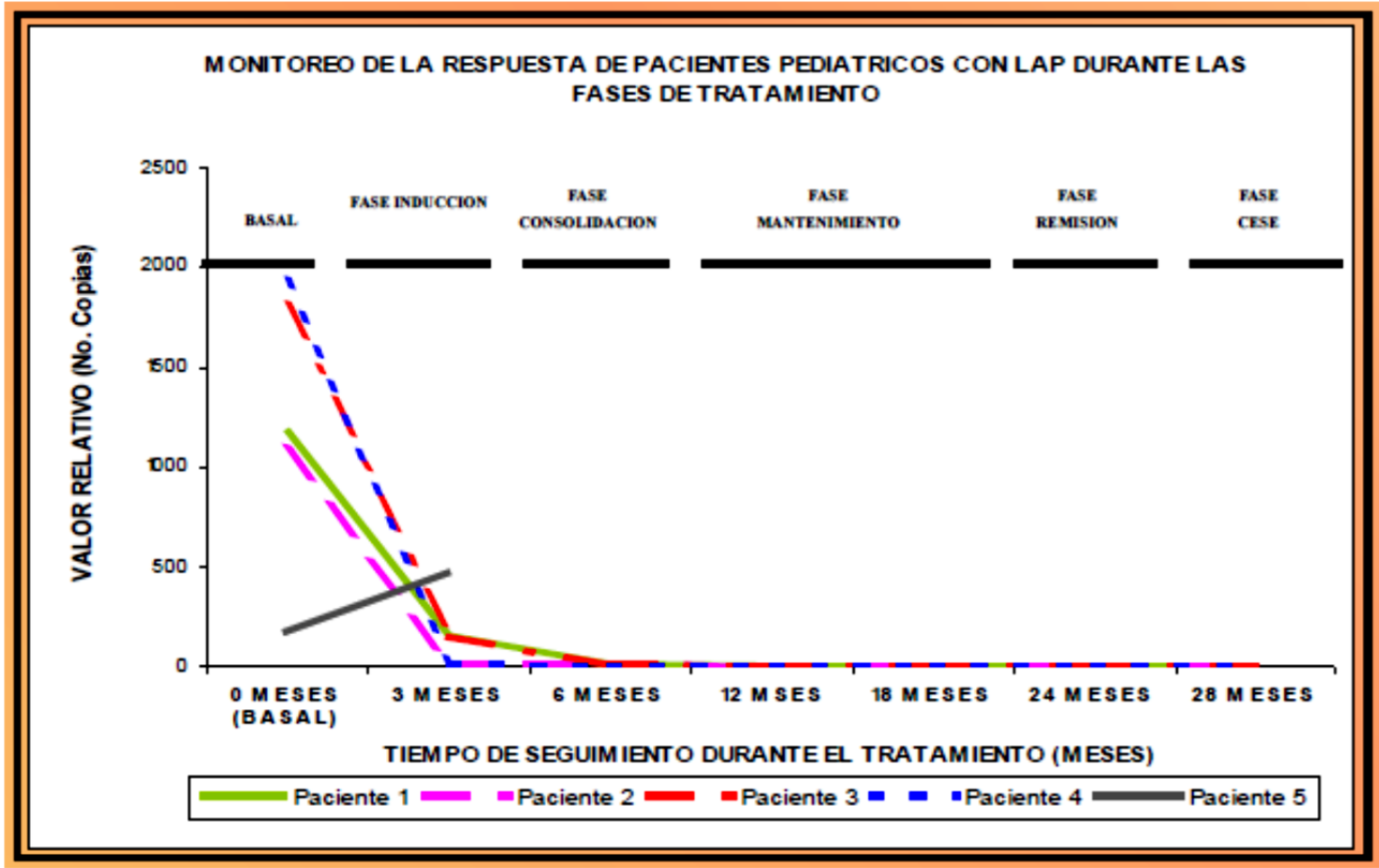


Figura 11. Gráfico del monitoreo molecular mediante la técnica de RT-PCR tiempo real de 5 casos con LAP, durante cada fase del tratamiento.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad se sabe que la LPA tiene una serie de características que hacen que se considere como una emergencia hematológica y enfatizan la necesidad de un diagnóstico rápido y preciso. Así mismo está claro que requiere de un tratamiento el cual es específico en comparación con otros tipos de LMA (Tabla III).¹⁹

Todos los estudios realizados hasta el momento demuestran la importancia de la técnica molecular RT-PCR en tiempo real, como complemento del análisis citogenético convencional, en aquellos pacientes donde se sospeche una LAP. Por otra parte, los ensayos clínicos realizados han demostrado que los pacientes con un cariotipo en los cuales se detecta molecularmente el reordenamiento PML-RAR α , tienen el mismo pronóstico favorable que aquéllos que se identifican citogenéticamente por la presencia de la translocación. Esto constituye otra razón muy importante para indicar el estudio molecular en los pacientes cuya morfología haga sospechar una LAP.^{19, 31, 33}

La técnica molecular no solo es más rápida (se puede tener el resultado en un día), sino que permite detectar siempre la presencia del gen híbrido y además contar con un marcador con una gran sensibilidad para confirmar la remisión. También permite tener una confirmación objetiva de la remisión morfológica, lo que posibilita distinguir entre la regeneración medular y la persistencia de la enfermedad, que puede ser particularmente problemática en este subtipo de LMA, por lo que resulta de vital importancia mantener un seguimiento puntual y preciso de la evolución y respuesta del paciente en cada fase del tratamiento con ATRA

(Figura 11), con el propósito de detectar oportunamente una posible recaída, que de no ser detectada a tiempo dejaría al paciente sin posibilidades de supervivencia, pues una vez que un paciente recae ya no tiene cura alguna.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la importancia práctica en el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad, en cada una de las fases de tratamiento, ya que los 4 pacientes (100%) respondieron favorablemente al tratamiento con ATRA.^{31, 33}

Se puede ver claramente en la gráfica (Figura 11), que la remisión de la enfermedad comienza a verse en 4 de los cinco pacientes iniciales, a los 3 meses de comenzado el tratamiento, específicamente en la fase de Inducción, llegando a un nivel mínimo en la fase de consolidación a los 6 meses de iniciado el tratamiento. Este mismo comportamiento se mantiene hasta la fase de remisión y de cese a los 28 meses de iniciado el tratamiento con ATRA. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura.^{31, 33}

IX. CONCLUSIONES

- ✓ El monitoreo de progresión de la enfermedad en pacientes pediátricos con LAP empleando la técnica de RT-PCR en tiempo real tiene un importante valor pronostico, ya que existe correlación entre el estado clínico del paciente y el número de copias encontradas del gen híbrido PML-RAR α en las diferentes etapas del tratamiento.
- ✓ Mediante el seguimiento molecular de la enfermedad por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real durante cada fase del tratamiento, se ha podido comprobar su eficacia desde el comienzo en la fase de inducción hasta la fase de final de remisión, logrando un mejoramiento visible en cada uno de los cuatro pacientes (100%)
- ✓ Con el monitoreo de la enfermedad por RT-PCR en tiempo real se ha podido establecer la remisión de la enfermedad hasta Enero de 2011 en cuatro de los pacientes (100%).
- ✓ La técnica de RT-PCR en tiempo real ha demostrado ser una herramienta esencial complementaria al análisis citogenético básico, para la detección de la translocación genética que es característica única y da origen a la LPA, para de esta forma poder obtener un diagnóstico rápido y preciso para el paciente, lo que permite darle tratamiento de forma oportuna.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Rizo R. Pedro, Sánchez C. Felipe, et al. Mortalidad por leucemias en menores de 20 años. México 1998–2002. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. Vol. 62, enero–febrero 2005.
2. Larquin C. José I., Diviú L. Angelina, et al. Leucemia Promielocítica Aguda. Comportamiento clínico. Revista Archivo Médico de Camagüey. Vol. 12(6) Camagüey nov.-dic. 2008.
3. Piller J. Gordon. Historical Review leukaemia - A brief historical review from ancient times to 1950. British Journal of Haematology, Vol. 112. 2001
4. Leif K.-Hillestad. Acute promyelocytic leukemia. Acta Med Scand. Vol. 159.1957
5. Piller J. Gordon. Historical Review Leukaemia - A brief historical review from ancient times to 1950. British Journal of Haematology, Vol. 112. 2001
6. Virchow R. Weisses Blut. Froriep's Notizen. Vol. 36. 1845
7. Bernard J, Weil M, et al. Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. Blood. Vol. 41. 1973
8. Wang Zhen-Yi, Chen Zhu. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to
9. Mathers D. Colin, Boschi P. Cynthia, et al. Cancer incidence, mortality and survival by site for 14 regions of the world. *Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion Paper. Vol. 13* (World Health Organization). 2001 highly curable. American Society of Hematology. Vol. 111(5). 2008
10. Margie Patlak. Targeting Leukemia: From Bench to Bedside. Breakthroughs in Bioscience. 2001

11. "Leukemia Facts & Statistics." The Leukemia & Lymphoma Society. Retrieved 2009.
12. Horner MJ, Ries LAG, et al. "SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER). Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2009
13. The Leukemia and Lymphoma Society fighting Blood Cancers, Facts 2010 – 2011.
14. Fajardo G. Arturo, Mejía A. et al. Epidemiología de las neoplasias malignas en niños residentes del Distrito Federal (1982-1991). Boletín Médico del Hospital Infantil de México 1995.
15. Fajardo G. Arturo, Navarrete M. et al. Incidence of malignant neoplasms in children attending social security hospitals in Mexico City. Medical Pediatric Oncology. 1997.
16. Fajardo G. Arturo, Juárez O. Servando, et al. Incidencia general y específica de cáncer en niños derechohabientes del IMSS. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Vol. 45 (6). 2007
17. Hayler SS, Malnar K. Data utilization. Cancer registry management. Principles & Practice. Dubuque, IA, USA: Kendall/Hunt Publishing Company. 1997
18. Rivera-Luna R. Hemato-oncología Pediátrica: Principios Generales. México: Editores de Textos Mexicanos, 2006. 558p. ISBN: 9789685610445
19. Bennet J, Catovsky D. et al. Proposals for the classification of the acute Leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br Journal Hematology. Vol. 33(4). 1976

20. F Lo Coco, C Nervi, et al. Acute promyelocytic leukemia: a curable disease. *Leukemia* Vol. 12. 1998
21. P Fenaux, MC Le Deley, et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. *Blood* Vol. 82. 1993
22. F Mandelli, D Diverio, et al. Molecular remission in PML/Retinoic acid receptor a positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* Vol. 90. 1997
23. Thompson PLM. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. PLM, 2011
24. Mandelli, F. Avvisati G. et al. Advances in the Understanding of acute Promyelocytic Leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* Vol. 6(1) 2002
25. Gupta V. Tabak D. et al. A: Acute Promyelocytic Leukemia: A case based Review. *Hematology*. Vol. 8(2) 2002
26. Raelson V. John, Nervi Clara, et al. The PML/RAR α Oncoprotein is a Direct Molecular Target of Retinoic Acid in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *The American Society of Hematology*. Vol. 88. 1996
27. Bustin Stephen, Venes Vladimir, et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. Vol. 34. 2005
28. Mark A. Valasek, Joyce J. Repa. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. Vol. 29. 2005
29. Huggett J, Dheda K, et al. Real-time RT-PCR Normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* Vol. 6. 2005

30. Ririe,K.M., Rasmussen,R.P. et al. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.*Analytical Biochemistry* Vol. 245. 1997
31. Hernandez R. Porfirio, Antuña M. Gisela. Et al. Tratamiento de la Leucemia Promielocítica con Ácido Transretinóico y quimioterapia intensiva. Evolución clínica y molecular. Rev. Cubana de Hematología e Inmunología Hemoter. Vol. 18(2) 2002.
32. Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. Br J Haematol. Vol.106. 1999
33. Martínez A. Gisela, Cayado G. Niubys, et al. Diagnóstico molecular de la Leucemia Aguda Promielocítica: Resultados Preliminares. Rev. Cubana de Hematología e Inmunología Hemoter. Vol 16(2). 2000
34. Taringa.net “Todo tipo de cáncer es dañino” [en línea]. [23 de Enero de 2012]. Disponible en la web: <http://taringa.net>
35. Unav.es [en línea]. [23 de enero de 2012]. Disponible en la web: <http://unav.es>
36. Infectologiapediatrica.com “Hepatoesplenomegalia en estudio” [en línea]. [23 de Enero de 2012]. Disponible en la web: <http://infectologiapediatrica.com>
37. Elrincondelamedicinainterna.blogspot.com “Medicina Interna” [en línea]. Mayo 2010, [23 de Enero de 2012]. Disponible en la web: <http://elrincondelamedicinainterna.blogspot.com>

38. Monografias.com “PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética” [en línea]. 2008, [23 de Enero de 2012]. Disponible en la web: <http://www.monografias.com>