



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

*FRECUENCIA DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS
DIAGNOSTICADAS POR RT-PCR EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA AGUDA*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A

DRA. MARÍA LETICIA LEZAMA VÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS : DRA BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ.

ASESOR DE TESIS: DRA MARTA ZAPATA TARRES.



Febrero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

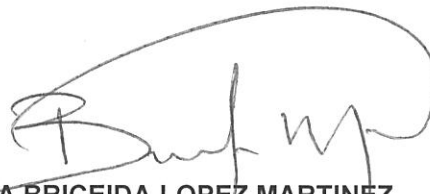
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

FIRMAS

**DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Briceida Lopez Martinez', with a large, sweeping loop at the top.

**DRA BRICEIDA LOPEZ MARTINEZ
SUBDIRECTORA DE SERVICIOS AUXILIARES Y DE DIAGNOSTICO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marta Zapata Tarres', with a large, sweeping loop at the top.

**DRA MARTA ZAPATA TARRES.
MEDICO ADSCRITO DEL SERVICIO DE ONCOLOGIA**

Agradecimientos:

A mi madre. . .

quien es mi brújula, mi orgullo, mi ejemplo de vida.

A toda mi familia. . .

*Porque son mi cimiento, mi fortaleza espiritual,
y gracias a ellos soy la persona que soy.*

A mis amigos, de hoy y de siempre.

Gracias por la sonrisa, por el hombro, el abrazo, el buen consejo.

A mi asesora, participe y guía de este trabajo...

cuya contribución a este fue invaluable Muchas gracias.

ÍNDICE.

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Marco teórico.....	8
Antecedentes.....	15
Planteamiento del Problema.....	21
Pregunta de Investigación.....	21
Justificación.....	21
Objetivos.....	22
Hipótesis.....	25
Material y Métodos.....	25
Plan de Análisis Estadístico.....	26
Metodología.....	27
Descripción de Variables.....	28
Ética.....	28
Resultados.....	29
Discusión.....	32
Conclusión.....	35
Cronograma de actividades.....	36
Referencias Bibliográficas.....	37
Limitación del estudio.....	41
Anexos.....	42
Gráficos resultados.....	42
Tabla resultados.....	44
Recolección de Datos (Anexo 1).....	45
Técnica e interpretación de RT-PCR (Anexo 2).....	46
Cronograma de actividades (Anexo 3).....	64

FRECUENCIA DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS DIAGNOSTICADAS POR RT-PCR EN PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA AGUDA

RESUMEN

ANTECEDENTES: Las leucemias agudas (LA) representan la neoplasia maligna más frecuente en los niños. Su clasificación inmunológica y citogenética ha impactado en su pronóstico. En México, hemos logrado generalizar la clasificación inmunológica, sin embargo, la clasificación citogenética se ha limitado a la búsqueda de tres o cuatro traslocaciones de alto riesgo en leucemias linfoblásticas agudas (LLA) e igualmente de tres o cuatro en leucemias mieloides agudas (LMA).

JUSTIFICACION: Considerando que el conocimiento de las alteraciones citogenéticas de los pacientes con LA son indispensables para realizar su clasificación y definición del tratamiento se realizó un tamizaje de 28 translocaciones asociadas a estos padecimientos con pacientes mexicanos.

OBJETIVOS : Describir la frecuencia de los siguientes rearrreglos cromosómicos por RT-PCR : t(1;11)(p32;q23), t(1;11)(q21;q23), t(1;19), t(3;5), t(3;21), t(4;11), t(5;12), t(5;17), t(6;9), t(6;11), t(8;21), t(9;9), t(9;11), t(9;12), t(9;22), t(10;11), t(11;17), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;21), t(12;22), t(15;17), t(16;21), t(17;19), t(X;11) ; la inv(16), y en la secuencia del gen TAL1 en pacientes con LA.

MATERIAL Y METODOS: Se trata de un estudio descriptivo, transversal, prospectivo y prolectivo. Se incluyeron niños menores de 18 años, con diagnóstico morfológico de leucemia aguda, sin tratamiento previo. Se buscarán las siguientes alteraciones cromosómicas: t(1;11)(p32;q23), t(1;11)(q21;q23), t(1;19), t(3;5), t(3;21), t(4;11), t(5;12), t(5;17), t(6;9), t(6;11), t(8;21), t(9;9), t(9;11), t(9;12), t(9;22), t(10;11), t(11;17), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;21), t(12;22), t(15;17), t(16;21), t(17;19), t(X;11) ; la inv(16), y en la secuencia del gen TAL1 con técnica RT-PCR.

RESULTADOS: Se estudiaron 100 pacientes con diagnóstico de LA de inicio, 13 se excluyeron por no cumplir con la cantidad de DNA necesario para el proceso del perfil de alteraciones genéticas, se obtuvo una muestra de 87 pacientes (52 varones, 34 mujeres) El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de 2 a 3 años con 20 (22.9%) pacientes. De los 87 pacientes estudiados, 22 (25.2%) presentaron alguna alteración genética, mientras que 65 (74.7%) obtuvieron un resultado negativo, siendo la alteración genética mas frecuentemente encontrada las traslocaciones t(12;21)(p13q22) y t(9;22)(q34q11), relacionándose esta ultima con un mal pronostico en los pacientes portadores por lo cual su identificación es de suma importancia.

CONCLUSIÓN: Con la realización de este trabajo podemos concluir que las alteraciones genéticas mas frecuentes en los pacientes con Leucemia aguda que acuden al Hospital Infantil de México son la traslocación t(12;21)(p13q22), y t(9;22)(q34q11), lo cual es similar a lo reportado en la literatura.

INTRODUCCIÓN:

Las leucemias agudas son un grupo heterogéneo de padecimientos que suponen la proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. Desde un punto de vista morfológico se han dividido en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA).¹

Constituyen la entidad neoplásica maligna más frecuente de la edad pediátrica. La LLA representa cerca del 75% de las leucemias agudas pediátricas. La incidencia de LLA en Estados Unidos es de aproximadamente 3.4 casos por 100,000 individuos menores de 15 años. El pico de incidencia ocurre entre las edades de 3 y 4 años, con un predominio de los pacientes del sexo masculino sobre el femenino.²

Factores de riesgo.

La exposición a radiación ionizante se ha establecido como un factor ambiental que predispone al desarrollo de leucemia, en especial LMA. El riesgo de LLA es significativamente más alto entre niños cuyos padres tienen mayor edad (madres mayores de 35 años, padres mayores de 40 años). El rol de un factor infeccioso también se ha estudiado dando origen a hipótesis como la “infección retrasada” que sugiere que la LLA es causada por una falta de exposición a infecciones y una falla de la modulación del sistema inmunológico. Más tarde, una respuesta inmunológica anormal ocurre hacia una o más infecciones virales o bacterianas comunes la cual desencadena los eventos que conducen al desarrollo de LLA.³

Fisiopatología.

El desarrollo de LLA, al igual que otras hemopatías malignas, involucra la transformación de una sola célula progenitora que tiene capacidad para la expansión monoclonal indefinida. El evento leucemógeno puede ocurrir en células linfoides con linaje de precursores B o T, o bien, en precursores más tempranos, lo que da origen a los diferentes subtipos de LLA basado en la etapa de diferenciación de las células linfoides en las que ocurre el evento.²

Las manifestaciones clínicas se relacionan con la infiltración de los blastos en la médula ósea, el sistema linfático y/o sitios extramedulares, como el sistema nervioso central. Estas manifestaciones dependen no solo de la naturaleza del clon leucémico sino del crecimiento que ha tenido hasta el momento en que los síntomas son reconocidos, se hace el diagnóstico correcto y se inicia el tratamiento.¹

Diagnóstico.

El diagnóstico definitivo de Leucemia se basa en la demostración de una blastosis medular que iguale o supere el 25% de la totalidad celular², el estudio morfológico, citoquímico, inmunológico y citogenético detallado es fundamental para etiquetar el tipo de Leucemia aguda.

MARCO TEORICO.

El cáncer es un problema de salud mundial y nacional dado que representa la segunda causa de mortalidad infantil, solo después de los accidentes en los pacientes pediátricos de 4 a 18 años de edad.⁴

El cáncer en menores de 18 años difiere significativamente del que se presenta en la edad adulta. De acuerdo a estadísticas recientes de Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, la tasa de sobrevivencia a 5 años de los niños diagnosticados con cáncer ha llegado al 77%.⁵

En la población pediátrica los principales tipos de cáncer son las leucemias, los tumores de sistema nervioso central (SNC) y los linfomas.⁶ A nivel mundial se habla de una incidencia de cáncer en la edad pediátrica de 100 a 180 por cada 1,000,000 de niños por año, con variantes en cada país.^{1,2}

Las leucemias agudas son enfermedades monoclonales que se originan en la médula ósea, caracterizadas por crecimiento incontrolado de formas celulares inmaduras de componentes sanguíneos llamados blastos. En México la tasa de incidencia se ha incrementado de 7.75 a 44.9 casos por millón de niños en los últimos años, representando de las mayores tasas de incidencia.⁷

Desde un punto de vista morfológico se han dividido en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Constituyen la entidad neoplásica maligna más frecuente en la edad pediátrica.⁸

En México, las leucemias agudas representan alrededor de 40% de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre 30 y 34%.

1.- Leucemias Linfoblásticas Agudas

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se define como una alteración genética que tiene como consecuencia la proliferación monoclonal de células precursoras de células de serie linfóide o de los glóbulos blancos. Es el cáncer más frecuente en la edad pediátrica con una incidencia entre 3 y 4 pacientes por cada 100,000 por año. Cada año se diagnostican alrededor de 2500 a 3000 niños. El pico de presentación es alrededor de los cuatro años. En México, los datos reportados son similares a lo descrito en la literatura.⁹

En pediatría la edad más frecuente de presentación es dentro del grupo de edad de 3 a 5 años. Aproximadamente 2,400 niños y adolescentes menores de 20 años son diagnosticados con LLA cada año en los Estados Unidos, existiendo un aumento gradual de su incidencia en los últimos 25 años.¹⁰

Existen algunas enfermedades en las cuales la incidencia de ésta enfermedad es mayor (síndrome de Down, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, síndrome de ataxia-telangiectasia)^{11,12,13}. Así mismo están descritos algunos factores que se han considerado predisponentes como son la exposición a insecticidas o el ser producto de madre fumadora durante el embarazo.⁵ El cuadro clínico es variable

sin embargo los signos y síntomas más comunes son la palidez de tegumentos, la presencia de hematomas, petequias y hepatomegalia. En los estudios de laboratorio se observan alteraciones en la biometría hemática (anemia, trombocitopenia, leucopenia o leucocitosis).¹⁴

La sospecha diagnóstica de LLA se basa en la identificación de síndromes sugestivos como síndrome infiltrativo, hemorrágico, anémico y síndrome febril,

El diagnóstico se hace con base en las manifestaciones clínicas, exploración física y hallazgos de laboratorio. El estándar de oro para el diagnóstico es el aspirado de médula ósea, donde se deben realizar estudios de morfología, inmunocitoquímica, fenotipo y de biología molecular. Y se establece al encontrar más del 25% de blastos de características linfoides en la médula ósea, se clasifica con base en los siguientes aspectos:

Morfológico: la clasificación se hará en base a los criterios internacionales.

Inmunológico: las LLA serán clasificadas desde este punto de vista en precursor de células B (80-85%), (pre B tempranas, pre B y pre B transicional); B maduras, células T, de acuerdo al porcentaje de positividad de los anticuerpos monoclonales. Genética: alteraciones numéricas las leucemias serán clasificadas en grupos de ploidía y las alteraciones estructurales cromosómicas se dividirán en traslocaciones (que son las más frecuentes), deleciones, inversiones, etc.¹⁵

Tomando en cuenta indicadores clínicos y paraclínicos los casos serán clasificados en dos grupos de riesgo lo que servirá para determinar el tipo de tratamiento a recibir (Tabla 1).^{16,17,18}

TABLA 1.- Clasificación de la LLA por riesgo.

RIESGO	ESTANDAR	ALTO
EDAD	> 1 AÑO < 10 AÑOS	< 1 AÑO > 10 AÑOS
RESPUESTA A PREDNISONA	NO BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA EL DIA 7	PRESENCIA DE BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA EL DIA 7
RESPUESTA A LA INDUCCION	RESPONDEDOR TEMPRANO	RESPONDEDOR LENTO
CUENTA DE LEUCOCITOS	< 50,000	> 50,000
INMUNOFENOTIPO	PRO B, PRE B Y PRE B TRANSICIONAL	
CITOGENETICA	HIPERDIPLOIDIA t(12;21)	t(1;19) t(4;11) (> 1 AÑO) t(9;22) t(4;11) U OTRO REARREGLO MLL EN PAC. < 1 AÑO
SNC STATUS	SNC 1	SNC2, SNC3
ENFERMEDAD EXTRAMEDULAR	AUSENTE	SNC TESTICULAR MEDIASINAL

El tratamiento de las LLA se divide en tres fases principales: la inducción a la remisión, la consolidación y el mantenimiento. La inducción a la remisión y la consolidación son comunes en los dos esquemas de tratamiento (riesgo habitual y alto riesgo), diferenciándose estas en el mantenimiento. La supervivencia de estos pacientes ha aumentado de manera muy significativa en los últimos 30 años siendo actualmente superior del 70% hasta 85% en algunos grupos.¹⁹

2. - Leucemias Mieloides Agudas

Las Leucemias Agudas Mieloides (LMA) se definen como la proliferación maligna de blastos con diferenciación mieloide, diagnosticándose cuando existen más de 20% de mieloblastos en la médula ósea de acuerdo a la Organización mundial de la Salud (OMS). La LMA representa el 15-20% del total de leucemias en la infancia.²⁰

Esta leucemia (LMA) ha sido clasificada en 8 subtipos por el grupo cooperativo francés, americano y británico (FAB), basándose en la morfología y en la tinción histoquímica, lo que ha mejorado el conocimiento de esta enfermedad, de sus bases moleculares y su biología, desarrollándose mejores estrategias terapéuticas(Tabla 2).^{21,22,23}.

TABLA 2. Clasificación FAB para LMA.

TIPO	NOMBRE	MORFOLOGÍA	HISTOQUÍMICA
MO	Indiferenciada	Blastos grandes, agranulares, indiferenciados. >90% blastos	MP- SN B -^b
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	Indiferenciada, >90% blastos, <10% promielocitos/monocitos	MP+, SN+, PAS-
M2	Mieloblástica aguda con maduración	> 30% y < 89% blastos; >10% promielocitos, mielocitos; <20% monocitos	MP+, SN+, PAS-
M3	Aguda promielocítica hipergranular	>20% de promielocitos anormales hipergranulares, Cuerpos de Auer presentes	MP+, SN+, PAS-
M3	Aguda promielocítica variante microgranular	Fina granularidad del citoplasma en los promielocitos, núcleos bilobulados.	MP+, SN+, PAS-
M4	Aguda mielomonocítica	>30% blastos en serie no eritroide, >20% pero <80% monolitos. Monocitos en sangre periférica $>5 \times 10^9 /L$; lisozima >3v lo normal.	MP+, NASDA +
M4Eo	Aguda mielomonocítica con eosinofilia	>5% eosinófilos anormales con gránulos basófilos.	MP+, NASDA+ eosinófilos, PAS+
M5a	Monocítica aguda	>80% células monocíticas son monoblastos, resto son promonocitos/monocitos	MP+, NASDA+
M5b	Monocítica aguda con diferenciación	<80% células monolíticas son monoblastos, el resto son promonocitos/ monocitos.	MP+,NASDA+
M6	Eritroleucemia	>30% de la serie no eritroide son blastos; >50% de la médula ósea son eritroblastos	PAS+, sideroblastos con tinción de Fe²⁺
M7	Megacarioblástica Aguda	>30% de la serie no eritroide son megacarioblastos; mielofibrosis frecuente	MP-, SN-, NASDA plaquetaria +, MP+ por ME.

Por otro lado el sistema de clasificación de la OMS incorpora, al igual que grupo FAB, información clínica y morfológica agregándose características inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares, lo cual dificulta su integración a nivel nacional.

Por lo anterior para obtener el correcto diagnóstico se obliga a realizar diversos estudios tales como: evaluación histoquímica (PAS, Sudán negro, esterasa, etc.), inmunofenotípicos (antígenos linfocíticos B o T, HLA-DR, etc.) al igual que evaluación citogenética y anomalías moleculares de gran importancia.²⁴ Es por ello que a los niños con LMA deben realizarse, idealmente, análisis cromosómicos de la leucemia, pues son importantes marcadores de diagnóstico y pronóstico. Se han identificado anormalidades cromosómicas clonales en los blastos de cerca del 75% de los niños con LMA, y son útiles en la definición de los subtipos con características particulares como t(8;21) con M2, t(15;17) con M3, inv(16) con M4 Eo, anomalías 11q23 con M4 y M5, t(1;22) con M7.^{25, 26, 27} En la literatura internacional se han demostrado la existencia de estos como valores pronósticos.^{28,29,30}

Como factores pronósticos favorables en LMA infantil con los cuales contamos en nuestro hospital incluimos translocaciones, [t(15;87), t(8;21)], inversiones (inversión del cromosoma 16), cuenta leucocitaria $<100 \times 10^9/L$, subtipos FAB M1 o M2 con cuerpos de Auer, M3 y M4Eo y remisión completa al primer ciclo de quimioterapia del tratamiento.

Dentro del tratamiento de los pacientes con LMA infantiles se encuentra basado en el esquema NOPHO 93 modificado, mostrando tasas de supervivencia libre de enfermedad a 5 años alrededor del 50% en distintos grupos.³¹

3. Clasificación inmunológica de las leucemias.

Se basa en la tipificación inmunológica mediante la identificación del linaje celular específico, a través de anticuerpos mononucleares, así como el estadio de diferenciación. De acuerdo a la clasificación según los inmunofenotipos se consideran los siguientes tipos: pre B temprana, la más frecuente (60.4%), pre B transicional y pre B (estas 3 variedades se describen como “común”), B, T, y cuando es nulo.³²

ANTECEDENTES

Alteraciones citogenéticas en LA

Los avances en el campo de la Genética han permitido el estudio mas a fondo de la estructura de la informacion genética a nivel de cromosomas y genes. El estudio cromosómico es una parte importante del estudio de cualquier hemopatía maligna, ya que no solo contribuye al diagnóstico de las mismas sino que la informacion que aporta suele constituir un factor pronóstico de primer nivel.³³

Los estudios cromosomicos de las leucemias humanas durante las últimas tres décadas, han dado un gran aporte al conocimiento de los cambios genéticos que

ocurren en estas enfermedades. El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30,000 neoplasias humanas.³⁴

En el caso de las leucemias agudas, se estima que hasta en el 60% existe una alteración cromosómica, principalmente traslocaciones, inversiones, deleciones, monosomías y trisomías.³⁵ Se piensa estas influyen directamente en el pronóstico del paciente, ya que se relaciona con la respuesta al tratamiento.

La identificación de alteraciones genéticas específicas es actualmente un elemento indispensable para la subclasificación de las leucemias en distintos grupos pronósticos para su adecuado tratamiento. Las alteraciones citogenéticas más frecuentes en neoplasias hematológicas son los rearrreglos y puntos de ruptura (translocaciones e inversiones cromosómicas), deleciones y aberraciones numéricas cromosómicas (monosomías, trisomías, etc.). Estas alteraciones se identifican con el cariotipo o por estudios de biología molecular. Hoy sabemos que las alteraciones genéticas de las neoplasias son, generalmente, los agentes causales de la patología y definen distintos comportamientos biológicos, que se traducen obviamente en distintos comportamientos clínicos y finalmente en pronósticos muy variables.

Las anomalías cromosómicas tanto estructurales como numéricas se han clasificado recientemente como importante factor pronóstico. Un ejemplo claro de ello es el caso de LMA donde estas alteraciones están bien caracterizadas como

favorables, riesgo intermedio y adversas(Tabla 3).^{36,37} Así como su categorización se ha publicado, por ciertos grupos, las prevalencias obtenidas de estas alteraciones(Tabla 4).³⁸

Tabla 3. Subgrupos pronósticos de LMA basados en alteraciones citogenéticas y anomalías moleculares.

Estatus de Riesgo	Citogenéticas	Anormalidades Moleculares
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22) • inv(16)(p13.q22), t(16;16)(p13.q22) • t(15;17) 	<ul style="list-style-type: none"> • Citogenética normal con mutación NMP1 o mutación CEBPA en ausencia de FLT3-ITD
Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> • Citogenética Normal • t8 • t(3;5) • t(9;11)(p22q23) • Otras no definidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación de c-KIT con: t(8;21)(q22;q22) o inv(16)(p13.q22), t(16;16)(p13.q22)
Pobre	<ul style="list-style-type: none"> • Cariotipo complejo (>3 anomalías) • MK+ • Monosomía del 5, del5q • Monosomía del 7, del7q • Otros 11q23 abnl • Inv(3)(q21q26.2), t(3;3)(q21126.2) • t(6;9), t(9;22) • Anl(17p) 	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión alta de EVI1 (con o sin lesión citogenética 3q26) • Citogenética normal con FLT3-ITD en ausencia de mutación NPM1

Tabla 4. Frecuencia de las alteraciones citogenéticas más comunes en LMA.

Rearreglo cromosómico	Frecuencia (%)
Cariotipo Normal	15-30%
t(1;22)(p13;q13)	0-3
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	1-5
Monosomía del 5/del(5q)	1-2.5
t(6;9)(p23;q34)	1-2
Monosomía del 7	1-4.5
del(7q)	1-3
t(7;12)(q36;p13)	3-5
t8	5-10
t(8;16)(p11;p13)	0-2.5
t(8;21)(q22;q22)	7-16
del(9q)	0-4.6
t(9;22)(q34;q11.2)	0-1
t(11q23)/MLL	14-22
t(9;11)(p22;q23)	6-11
t(15;17)(q22;q21)	2-10
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	3-11.6
t(16;21)(p11;q22)	1-3.5
t21	1.5-4.6

La LMA es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea, además de la respuesta inicial del paciente al tratamiento, su pronóstico está determinado por la presencia de anomalías citogenéticas. Varias anomalías citogenéticas recurrentes tales como reordenamiento 11q23 nos ayudan a predecir el resultado de las neoplasias mieloides y leucemias agudas. Hasta ahora se han identificado más de 60 traslocaciones asociadas.³⁹

El ejemplo claro de las diferencias dadas por la presentación de alteraciones cromosómicas está presente por grupos de edad, diferenciando las LLA presentadas en niños y adolescentes a la manifestada por adultos. Autores de un reciente estudio de cohorte en adultos con LMA mostraron que los niños con t(9;11) (p22;q23) con aberraciones adicionales tenían menores tasas de supervivencia global que los que tienen otros subgrupos de LMA.⁴⁰ El análisis detallado de los rearrreglos citogenéticos por varios años ha proveído de información importante para aclarar las incidencias de anomalías individuales y su significancia pronóstica (Figura 1).⁴¹

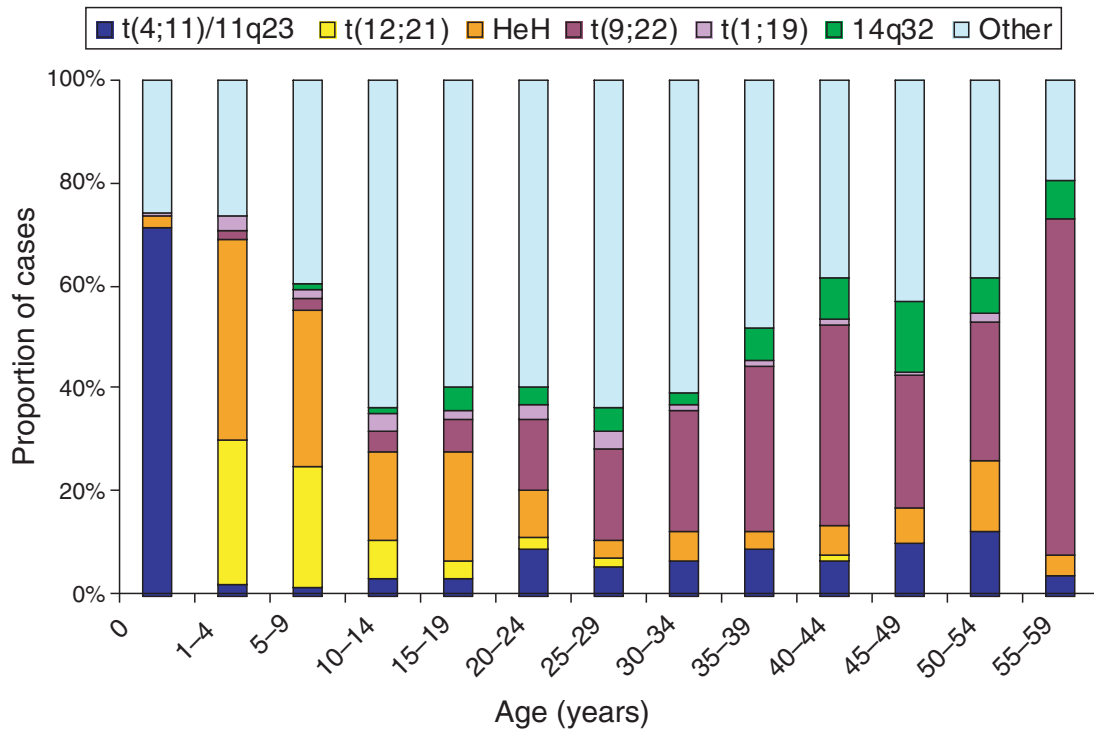


Figura 1. Distribución de las principales alteraciones citogenéticas en LLA acuerdo a subgrupos de edad. HeH:hiperdiporidia.

El estudio de las alteraciones genéticas de este trabajo incluye traslocaciones e inversiones que se buscan de manera rutinaria como t(15;17), inv(16), t(9;22), t(11;17), t(1;19), t(12;21), t(4;11), sin embargo se incluyeron como nuevas las siguientes alteraciones; t(1;11)(q21;q23), t(1;11)(p32;q23), t(1;19), t(3;21), t(3;5), t(4;11), t(5;12), t(5;17), t(6;9), t(6;11), t(8;21), t(9;9), t(9;11), t(9;12), t(9;22), t(10;11), t(11;17), t(11;19) (q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;21), t(12;22), t(15;17), t(16;21), t(17;19), t(X;11); la inv(16), y rearrreglos en la secuencia del gen *TAL1*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las recomendaciones de la FAB son realizar la clasificación Morfológica, Inmunológica y Citogenética por lo que consideramos que es de gran trascendencia investigar las nuevas alteraciones citogenéticas que se están estudiando en el mundo. Por lo anterior realizamos el siguiente planteamiento; el diagnóstico molecular de las LA en el HIMFG podría mejorar si incrementamos el panel de alteraciones citogenéticas. Esto nos permitirá conocer mejor la epidemiología de las mismas en nuestra población.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de alteraciones citogenéticas diagnosticadas por RT-PCR en pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico de Leucemia aguda que acudieron al Hospital Infantil de México?

JUSTIFICACIÓN

Actualmente en nuestro instituto solo se analizan 4 translocaciones [inv(16), t(8;21), t(15;17) y t(9;22)] por RT-PCR por lo que ampliar el panel permitirá conocer la frecuencia de las otras descritas y poder correlacionarlo con la presentación clínica y pronóstico de los pacientes. El tener un diagnóstico molecular de las LA es indispensable para su clasificación y por lo tanto para su tratamiento. Lo anterior permitirá que el grupo de pacientes que se clasifican como

alto riesgo por no tener el estudio citogenético sea tratado de acuerdo a su riesgo real o incluso ser enviado a trasplante de médula ósea oportunamente. Finalmente el realizar una descripción adecuada de la epidemiología molecular de las LA nos permite comparar nuestros resultados con los realizados a nivel internacional. Así mismo podremos realizar publicaciones de LA en las cuales se exige el diagnóstico molecular.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Describir la frecuencia de los siguientes rearrreglos cromosómicos detectados por RT-PCR: t(1;11)(p32;q23), t(1;11)(q21;q23), t(1;19), t(3;5), t(3;21), t(4;11), t(5;12), t(5;17), t(6;9), t(6;11), t(8;21), t(9;9), t(9;11), t(9;12), t(9;22), t(10;11), t(11;17), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;21), t(12;22), t(15;17), t(16;21), t(17;19), t(X;11) ; la inv(16), y en la secuencia del gen TAL1 en pacientes con LA.

Objetivos Específicos.

- Describir la frecuencia de la translocación t(1;11)(p32;q23) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(1;11)(q21;q23) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(1;19) en pacientes con LA detectados por RT-PCR

- Describir la frecuencia de la translocación t(3;5) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(3;21) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(4;11) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(5;12) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(5;17) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(6;9) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(6;11) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(8;21) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(9;9) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(9;11) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(9;12) en pacientes con LA detectados por RT-PCR

- Describir la frecuencia de la translocación t(9;22) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(10;11) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(11;17) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(11;19)(q23;p13.1) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(11;19)(q23;q13.3) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(12;21) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(12;22) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(15;17) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(16;21) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(17;19) en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia de la translocación t(X;11) en pacientes con LA detectados por RT-PCR

- Describir la frecuencia e la inversión del cromosoma 16 en pacientes con LA detectados por RT-PCR
- Describir la frecuencia el rearrreglo en la secuencia del gen TAL1 en pacientes con LA detectados por RT-PCR.

HIPÓTESIS

- La alteración genética más frecuente en pacientes con Leucemia aguda es la traslocación t(12;21)(p13q22).
- La alteración genética más frecuente en pacientes con Leucemia linfoblástica aguda es la traslocación t(9;22).
- La alteración genética más frecuente en pacientes con Leucemia mieloblástica aguda es t(15;17)

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio

Se trata de un estudio descriptivo, transversal, prospectivo y prolectivo.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Menores de 18 años al diagnóstico

- Diagnóstico morfológico de LA
- Sin tratamiento previo

Criterios de exclusión.

1. Muestras de pacientes en las que se obtenga un rendimiento de ARN menor a $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
2. Muestras de pacientes en las que no se obtenga la banda de control de integridad del ARN y de la presencia de inhibidores de la PCR (amplificado de 911pb)

Criterios de eliminación.

- No aplica ya que se trata de un estudio transversal

PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO

Los datos demográficos se analizaron con medidas de tendencia central. Realizamos el análisis de frecuencia. La distribución de frecuencias se realizó en forma de tabla de los datos estadísticos, asignando a cada alteración genética su frecuencia correspondiente.

METODOLOGÍA

Se identificaron a los niños con sintomatología sugestiva de LA y que contaban con criterios para realización de aspirado de médula ósea.

Se realizó un extendido de la muestra de médula ósea y de manera simultánea se tomó un tubo con EDTA con tapón morado y se depositaron 2 ml de médula ósea. Se revisó el aspirado de médula ósea y en base a los criterios de la FAB se estableció el diagnóstico morfológico de Leucemia mieloide aguda o de Leucemia linfoblástica aguda.

Se estudiaron los pacientes con LA de quienes se obtuvieron datos demográficos y clínicos (Anexo 1) con la clasificación inmunológica de la leucemia, se tomaron 2 ml de sangre periférica con la que se realizó una RT-PCR múltiple para la tipificación/subtipificación de leucemias. (Anexo2)

La prueba que se realizó utilizando la RT-PCR cualitativa múltiple anidada en la que se investigaron los siguientes rearrreglos cromosómicos: t(1;11)(p32;q23), t(1;11)(q21;q23), t(1;19), t(3;5), t(3;21), t(4;11), t(5;12), t(5;17), t(6;9), t(6;11), t(8;21), t(9;9), t(9;11), t(9;12), t(9;22), t(10;11), t(11;17), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3), t(12;21), t(12;22), t(15;17), t(16;21), t(17;19), t(X;11) ; la inversión del cromosoma 16, y en la secuencia del gen TAL1

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	TIPO	MEDICIÓN	DEFINICIÓN
EDAD	Cuantitativa continua	En años	No de años del nacimiento al momento del diagnóstico
GÉNERO	Categórica dicotómica	1. Masculino 2. Femenino	
ALTERACIONES CITOGENÉTICAS	Categórica	t(10;11), t(11;19) (q23;p13.1), t(11;19) (q23;p13.3), t(1;11)(p32;q23), t(1;11)(q21;q23) t(9;11), t(3;21), t(15;17), inv(16), t(9;22), t(6;11), t(11;17), t(X;11), t(1 ;19), t(17;19), t(12 ;21), TAL1, t(8;21), t(3;21), t(16;21), t(4;11), t(9;12), t(5;12), t(12;22), t(6;9), t(9;9), t(3;5), t(5;17)	Variaciones en la estructura, función y comportamiento del material genético (ADN)
TIPO DE LEUCEMIA	Categórica Dicotómica	1. Linfoblástica Aguda 2. Mieloide Aguda	Serie celular involucrada

ÉTICA

Al tratarse de un estudio prospectivo en el que se utilizó tejido biológico de pacientes requiere la firma de una carta de consentimiento informado así como una carta de asentimiento en caso de estar indicado.

RESULTADOS

Características de la muestra:

Se estudiaron muestras de 100 pacientes los cuales contaban con diagnóstico de leucemia aguda de inicio y cuyas muestras de médula ósea fueron recibidas en el Laboratorio de Biología Molecular de nuestra institución durante el periodo del estudio, 13 se excluyeron por no cumplir con la cantidad de DNA necesario para el proceso del perfil de alteraciones genéticas, se obtuvo una muestra de 87 pacientes (52 varones, 34 mujeres) (Gráfico 1). El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de 2 a 3 años con 20 (22.9%) pacientes, seguido del grupo de 4 a 5 años con 13 (14.9%) pacientes. Siendo el grupo de menor incidencia el de 16 años con 3 (3.4%) pacientes (Gráfico 2). De los pacientes estudiados 68 fueron diagnosticados con LLA (72.8%), y 19 con LMA (20.7%) (Gráfico 3).

Del grupo de pacientes con LLA, se clasificaron como de Riesgo habitual (RH) a 18 (26.4%) pacientes y de Alto riesgo (AR) a 50 (73.5%) pacientes, siendo los principales indicadores la edad al diagnóstico e hiperleucocitosis. Así mismo se identificó a 5 pacientes categorizados como de riesgo habitual previo a la identificación de la alteración genética, que ya con el resultado positivo a una alteración genética, corresponden a pacientes de alto riesgo. Respondieron adecuadamente a tratamiento con esteroide 56 (82%) pacientes y 12 (18%) tuvieron mala respuesta al mismo (Gráfico 4). Se observó que la médula ósea remitió a los 7 días en 39 (57.3%) pacientes, a los 14 días en 17 (25%) pacientes, a los 21 días en 6 (8.8%) pacientes, a los 28 días en 2 (2.9%) pacientes y en 4

(5.8%) pacientes no se logro documentar remisión por diversas causas principalmente cuadros infecciosos que limitaron la realización de aspirado de médula ósea (Gráfico 5).

En el grupo de pacientes con LMA (19 pacientes), se observó adecuada respuesta al primer ciclo de tratamiento en 15 pacientes (79%) y 4 (21%) de ellos no tuvieron una buena respuesta (Gráfico 6).

De la muestra de 87 pacientes se identificó infiltración a Sistema Nervioso Central solo en 8 (9.1%) pacientes, en el resto las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron negativas para células neoplásicas.

INCIDENCIA DE ALTERACIONES GENÉTICAS DIAGNOSTICADAS POR RT-PCR.

De los 87 pacientes 28 (33.3%) de ellos obtuvieron un resultado positivo a alguna de las 28 traslocaciones que se detectan por RT-PCR (HemaVision), mientras que 60 (65.6%) obtuvieron un resultado negativo para alguna de estas traslocaciones.

Dentro del grupo de pacientes con Leucemia Linfoblastica Aguda (68 pacientes), 22 (32.4%) pacientes tuvieron un resultado positivo a una traslocación, de los cuales la mas común en 7 de los pacientes (10.2%) fue t(12;21)(p13q22), seguida de t(9;22), con 5 pacientes (7.4%), el resto de las traslocaciones fueron: t(11;19)(q23,pp13.3), STIL(1p32)(TALI(1p32), t(8;21)(q22q22), t(4;11)(q21q23), t(9;22)(q32q11), MLL(11q23)AFFI(4q21.3). al relacionarlo con la clínica, se observó que solo en 2 (9%) pacientes con alguna alteración genética no se logró remisión de la médula ósea, en 1 (4.5%) paciente se logró remisión al día 21, en 5

(22.7%) pacientes a los 14 días y en 14 (63.6%) pacientes a los 7 días, siendo estos la mayoría.

En el caso de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (19 pacientes), 7 pacientes presentaron una traslocación de los cuales las mas frecuentes fueron con 2 (10.5%) pacientes cada una: t(15;17) y t(8;21)(q22q22), el resto de las traslocaciones fueron: t(10;11)(p12q23), t(15;17)(q22:q12), y t(16;21)(p11:q22). Al relacionarlo con la clínica se observó que solo 2 pacientes no presentaron una buena respuesta al primer ciclo de tratamiento, y fueron los positivos a la traslocación t(15;17) y t(8;21)(q22q22) respectivamente.

En la tabla 5 se describen las frecuencias de las alteraciones genéticas identificadas por tipo de leucemia. Ver Tabla 5

DISCUSIÓN

La descripción de alteraciones cromosómicas asociadas específicamente a un tipo de leucemia, ha permitido conocer en un periodo corto el significado clínico de muchos marcadores citogenéticos y, más importante todavía, se ha constituido como un paso previo a la detección y localización de los genes implicados en la génesis tumoral.

En nuestro estudio, se estudiaron pacientes con Leucemia aguda en los que predominó el sexo masculino sobre femenino siendo similar a lo reportado en la mayoría de la literatura.¹ Así como la Leucemia de estirpe Linfoblástica fue la más diagnosticada en un 72.8%, seguida de la Mieloide en un 20.7%.

Algunos investigadores han considerado que estas alteraciones cromosómicas son un epifenómeno del proceso oncogénico sin relación con su causa. Sin embargo, este criterio cambió completamente, cuando mediante las técnicas de biología molecular, se puso en evidencia la existencia de genes específicos comprometidos en las translocaciones cromosómicas presentes en la mayor parte de las leucemias y que son activados por la translocación.⁴²

Existen diversos estudios realizados en varias partes del mundo durante la última década, que se han enfocado a analizar la frecuencia y los tipos de alteraciones a nivel de genes y cromosomas de los pacientes con Leucemia aguda, Hye-Jin Kim, et al, describieron en un estudio realizado en 270 pacientes coreanos la frecuencia de las alteraciones genéticas identificadas por RT-PCR (HemaVision), concluyendo que la alteración más frecuente es la traslocación t(12;21)(p13q22)

seguida de $t(8;21)(q22q22)$ y $t(9;22)(q32q11)$ ⁴³. En nuestro estudio se realizó la determinación de las alteraciones genéticas por RT-PCR (HemaVision) con un total de 100 muestras de las cuales 87 pacientes se reportaron con Leucemia Aguda, 22 de los pacientes con LLA presentaron una alteración genética de estos la alteración mas frecuente fue también $t(12;21)(p13q22)$ y $t(9;22)(q34q11)$ a pesar de que nuestra muestra fue menor; sin embargo en segundo lugar encontramos $t(11;19)(q23p13.3)$ la cual se relaciona a mal pronóstico (Tabla 5).

Existen otros estudios como el realizado por Vázquez y Ramírez en el Hospital Universitario San Vicente de Pául de Medellín entre 1998 y 2001 donde se analizaron las alteraciones cromosómicas en la médula ósea de 44 niños (entre un mes y 14 años) con LLA. El estudio reveló que 17 pacientes (41.5%) presentaban cariotipo normal y 24 (58.5%) lo tenían anormal; de estos últimos 18 (75%) tenían un mosaicismo cromosómico, 4 (16.7%) exhibían cariotipos hiperploides y 2 (8.3%) presentaban otras alteraciones genéticas.⁴⁴

En Costa Rica se realizó un estudio citogenético a pacientes con Leucemia, referidos al Hospital Nacional de Niños e incluyó a 107 pacientes menores de 14 años. Las Leucemias agudas constituyeron el 98% de los casos, 70% LLA y 26% LMA. Los hallazgos citogenéticos encontrados fueron principalmente alteraciones numéricas (trisomías 8,19,20,21,y 22) así como deleciones (cromosomas 5 y 6), traslocaciones $t(8;14)$ e inversiones (cromosoma 11).⁴⁵

Otro estudio llevado a cabo en el mismo hospital en 177 niños con Leucemia Linfoblastica Aguda de precursores B se observó una distribución entre cariotipos

normales y aquellos con anomalías cromosómicas de 29% y 71% respectivamente. Las aberraciones encontradas fueron: t(4;11) en 3%, t(9;22) en 3%, t(1;19) en 5%, hiperdiploides en 39% y otras aberraciones cromosómicas en 21%.⁴⁶

En México se han realizado algunos estudios pero no limitados a la población pediátrica como el realizado en el Hospital Juárez de México, sobre la frecuencia de los hallazgos citogenéticos en pacientes con enfermedades hematológicas. Se estudiaron 64 pacientes que acudieron al servicio de Hematología de enero 1999 a junio 2000, tomándose muestras de médula ósea y/o sangre periférica, se procesaron de manera directa y se realizaron cultivos de 24, 48 o 72 horas, las metafases se analizaron por técnica de bandas GTG, los resultados se reportaron según los criterios del ISCN (1995). El rango de edad de la población fue de 1 a 77 años, de acuerdo con la clasificación del grupo FAB, 22 pacientes correspondieron al tipo de Leucemia Linfoblástica aguda, 14 a Leucemia Mieloblástica aguda, 16 a Leucemia Granulocítica crónica, 7 a Síndrome mielodisplásico y 3 fueron sin diagnóstico confirmado. Se obtuvo el estudio citogenético de los pacientes en el 58%, el cariotipo no fue informativo en el 26.5% y en el 15.6% presentó hipocelularidad. De los resultados obtenidos, el 28% fue cariotipo normal, 21.8% presentaron una alteración numérica y el 51% una alteración estructural.⁴⁷

Lo que hemos observado es que la identificación de alteraciones genéticas por cariotipo así como por citogenética se ve limitada por la pobre cantidad de alteraciones a estudiar en cada muestra, lo cual nos limita al diagnóstico de las mismas, por el contrario, al realizar el análisis de las alteraciones citogenéticas

mediante RT-PCR (HemaVision) se incrementa el número de alteraciones detectadas, se disminuye tiempo de procesamiento y se podría clasificar con mayor precisión a los pacientes.

Por lo anterior es importante continuar investigando acerca de las alteraciones genéticas presentes en pacientes con leucemia y correlacionarlo con la presentación clínica para valorar pronóstico en cada uno de los pacientes que acuden a nuestro hospital.

CONCLUSIÓN

Con la realización de este estudio se puede concluir que la Leucemia aguda es mas frecuente en pacientes del sexo masculino de 2 a 3 años de edad, que la estirpe Linfoide es mas frecuente, y de estos con un adecuado tratamiento se observa buena respuesta en un 82% con remisión de la médula ósea al día 7.

Con la realización de la determinación de las alteraciones genéticas mediante RT-PCR(HemaVision) se concluye que las alteraciones genéticas mas frecuentes en los pacientes con Leucemia aguda que acuden al Hospital Infantil de México son la traslocación $t(12;21)(p13q22)$, y $t(9;22)(q34q11)$, lo cual es similar a lo reportado en la literatura, así mismo nos a permitido la identificación de alteraciones que se relacionan a un mal pronóstico como lo es la traslocación $t(11;19)(q23p13.3)$ la cual en nuestros pacientes fue la segunda en frecuencia, siendo de gran importancia su identificación ya que en un futuro podría modificarse el tratamiento

de estos pacientes mejorando su respuesta al tratamiento y por lo tanto el pronóstico de los mismos.

Por otro lado la determinación de las alteraciones genéticas mediante RT-PCR es una técnica adecuada ya que nos permite identificar el mayor numero de alteraciones genéticas en menor tiempo. Por lo que el diagnóstico citogenético de nuestros pacientes se precisará en un mayor porcentaje logrando una mejor clasificación en el riesgo que este presenta y posteriormente realizar una correlación a largo plazo con la respuesta al tratamiento evaluando pronóstico y supervivencia de cada paciente.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Se inicio el proyecto en junio del 2012 con la estandarización de la técnica, revisión y actualización de la literatura, incluyendo muestras de pacientes en febrero del 2013 y concluyendo el 10 de Junio 2014. Se obtuvieron los datos clinicos y demograficos de cada paciente en el mes de junio del presente. (Anexo 3)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Greaves, MF. - Childhood leukaemia.- BMJ, 2002.- 324 (7332): 283-287.
2. Esparza, SD; Sakamoto KM.- Topics in Pediatric Leukemia: Acute Lymphoblastic Leukemia.- Men Gen Med, 2005; 7 (1): 23.
3. Belson M; Kingsley B; Holmes A.- Risk factors for Acute Leukemia in children: a review.- Environ Health Perspect, 2007; 115: 138-145.
4. Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Mejía-Aranguré JM. General and specific incidence of cancer among children affiliated to the Mexican Institute of Social Security. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2007; 45: 579-92.
5. Smith MA, Ries LA, Gurney JG, et al. Online cancer incidence and survival among children and adolescents : United States SEER Program 1975-2008. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/publications/childhood/>.
6. Abdullaev, F., Rivera-Luna, R., Roitenburd-Belacortu, V., & Espinosa-Aguirre, J. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. Arch Med Res 2000; 31: 526-31.
7. Mejía JM. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Hematología 2010;11:35-36
8. Chow EJ, Kamineni A, Daling JR, et al. Reproductive outcomes in male childhood cancer survivors: a linked cancer-birth registry analysis. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 2009; 163(10):887-894.
9. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004;15:1535-1548.
10. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, et al. Trends in leukemia incidence and survival in the united States (1973-1998). Cancer 2003;97:2229-2235.
11. Passarge E. Bloom's syndrome. The German experience. Ann Genet 1991;3-4:179-197

-
12. Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, et al. Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 1996;2:423-438
 13. Whitlock JA. Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2006;135(5):595-602
 14. McNeil DE, Coté TR, Clegg L, et al. SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002;39:554-557.
 15. Harrison C. Cytogenetics of pediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol.* 2009;144(2):147-56.
 16. Pullen J, Shuster JJ, Link M. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia* 1999;13 (11): 1696-70
 17. Möricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al.: Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr* 2005;217(6):310-20
 18. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al.: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1996;14(1):18-24.
 19. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166-178.
 20. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009. Disponible: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2009/04/08/blood-2009-03-209262.full.pdf>
 21. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, et al. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973–1998). *Cancer* 2003;97(9):2229–35.
 22. Rubnitz JE , Gibson B., Smith FO Acute Myeloid Leucemia *Pediatr Clin N Am* 2008;55:21–51

-
23. Meshinchi S, Arceci RJ. Prognostic factors and risk- based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *The Oncologist* 2007;12:341–55.
 24. Ravindranath Y, Chang M, Steuber CP, Becton D, Dahl G, Civin C, Camitta B, Carroll A, Raimondi SC, Weinstein HJ. Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. *Leukemia* 2005;19: 2101-2116
 25. Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(1):49–64.
 26. Meshinchi S and Arceci RJ Prognostic Factors and Risk-Based Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia *Oncologist* 2007;12;341-355.
 27. Wu J, Zhang LP, Lu AD, Wang B, Cheng YF, Liu GL. Clinical features and prognosis of t (8; 21)/AML1-ETO-positive childhood acute myeloid leucemia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2011;13(12):931-5.
 28. Manola K. Cytogenetics of pediatric acute myeloid leucemia. *Eur J Haematol*. 2009;83(5):391-405
 29. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:47-55.
 30. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100:4325– 4336.
 31. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia. *Blood*. 2010;115:453– 474.
 32. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic leukemia. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 15th ed. 2006:538-90.

-
33. Garcia JL, Hernandez JM, Gutierrez NC, Fernandez P, Rios A. La citogenetica en el estudio de las hemopatias malignas. *BLOOD* 1996; 41: 289-296.
 34. Glassman, A:B, Chromosomal abnormalities in acute leukemias.- *Clinics in Laboratory Medina*, 2000.-20(1):39-39
 35. Mitelman F. *Catalog of Chromosome Aberrations in cancer*. New York, NY:Wiley-Liss Inc 1998.
 36. Dohner H, Estey EH, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia. *Blood*. 2010;115:453– 474.
 37. Grimwade D, Hills RK. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:385–395.
 38. Chow EJ, Kamineni A, Daling JR, et al. Reproductive outcomes in male childhood cancer survivors: a linked cancer-birth registry analysis. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2009; 163(10):887-894.
 39. Von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A, et al. Prognostic impact of specific chromosomal aberrations in a large group of pediatric patients with acute myeloid leukemia treated uniformly according to trial AML-BFM 98. *J Clin Oncol*. 2010; 28(16):2682-2689.
 40. Pui, C.H., Relling, M.V. & Downing, J.R. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350; 1535–1548.
 41. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev cancer*. 2006; 6(2): 117-29.
 42. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. Acute Lymphoblastic leukemia. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 15th ed. 2006:538-90.
 43. Hye-Jin, MD, Hyun Jin Oh, MD, Jae Wook Lee, MD, et.al.- Utility of a multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay (HemaVision) in the evaluation of genetic abnormalities in Korean children

with acute leukemia: a single institution study.- Korean J Pediatr 2013; 56(6):247-53.

44. Vásquez Palacio G, Ramírez Castro, JL, et.al.- Leucemia Linfoide Aguda: estudio citogenetico en niños atendidos en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl Medellín en el periodo 1998-2001.- IATREIA, 2002.- 15 (4):217-225.
45. Solis, MV; de los Angeles M; Ruiz, E; et al. Citogenética y citoquímica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales. Rev. Biol. Trop, 2000, 48 (2-3): 707-718.
46. Venegas, P; Rivera, J.- Estudios citogenéticos en niños con Leucemia Linfocítica Aguda B en Costa Rica.- Rev biol. Trop, 2004, 52 (3): 551-558.
47. Sierra Martínez M, Aguilar M, Cruz RJ, et. al.- Frecuencia de los hallazgos citogenéticos en pacientes con enfermedades hematológicas que acuden al Hospital Juárez de México.- Rev Sal Pub y Nut, 2000; 2

LIMITACIÓN DEL ESTUDIO:

La limitación de este estudio son relacionadas con el diseño del mismo del mismo, son embargo es la base para iniciar un estudios en el que se puedan asociar las alteraciones citogenéticas y las características clínico biológicas de la enfermedad.

GRÁFICOS RESULTADOS

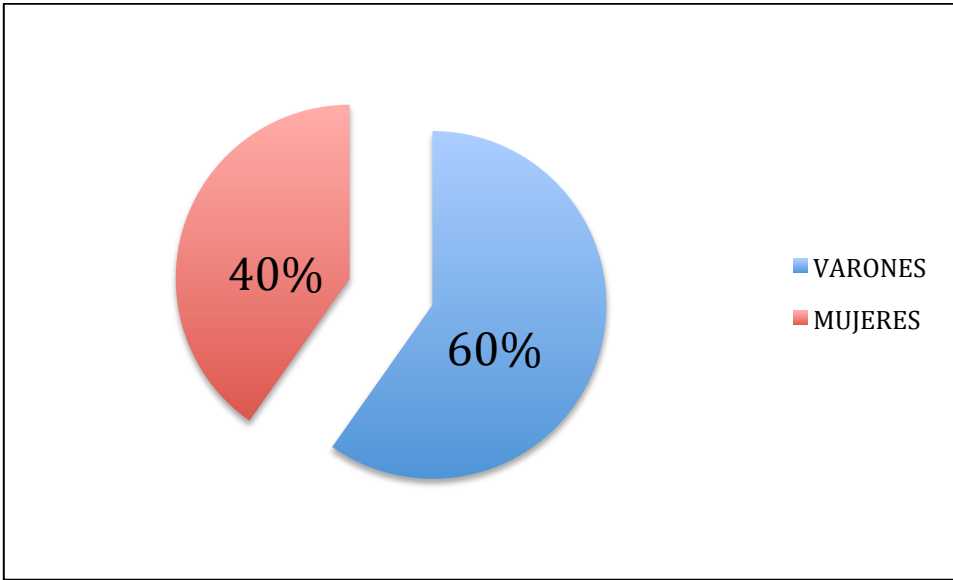


Gráfico 1. Sexo de pacientes mexicanos estudiados con leucemia aguda.

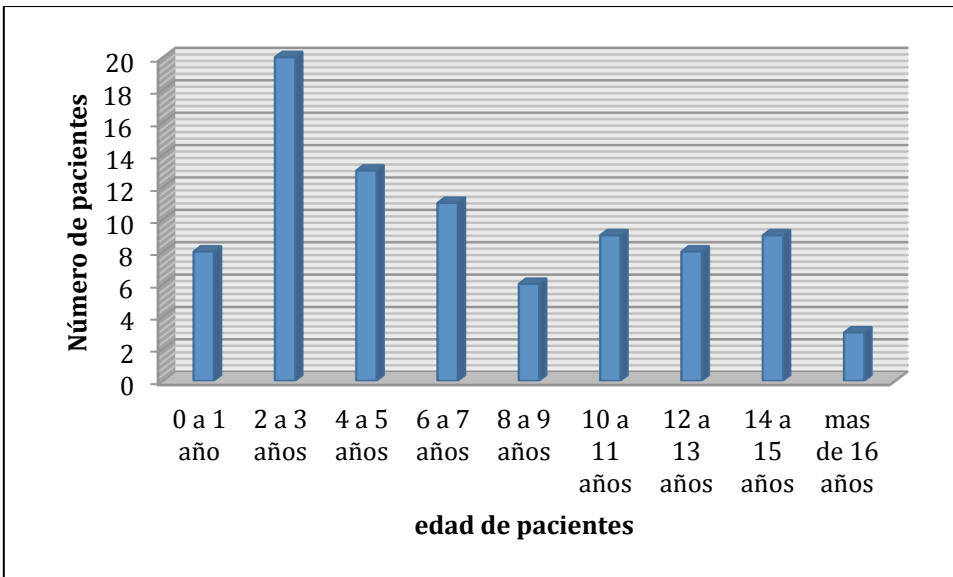


Gráfico 2. Edad de pacientes mexicanos estudiados con leucemia aguda.

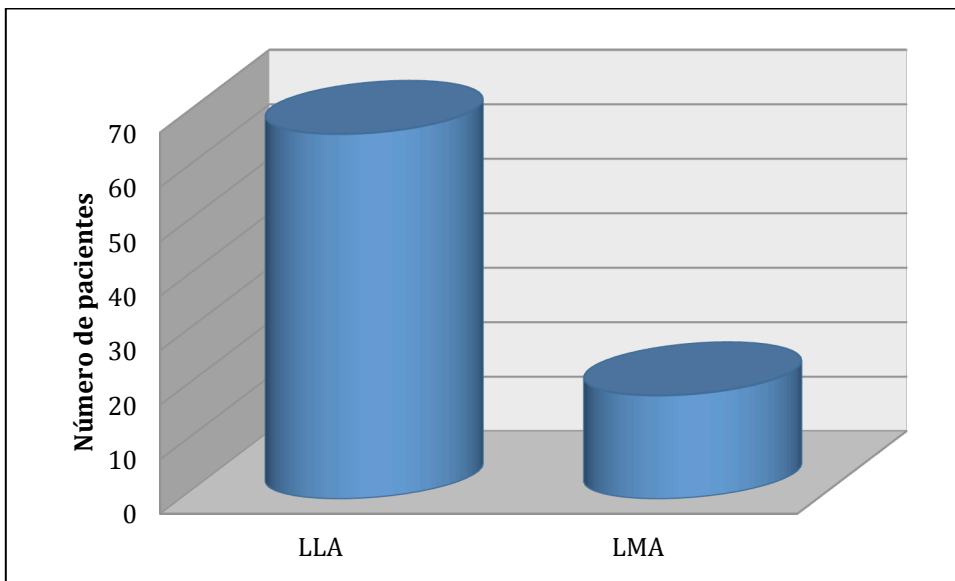


Gráfico 3. Clasificación de Leucemias.

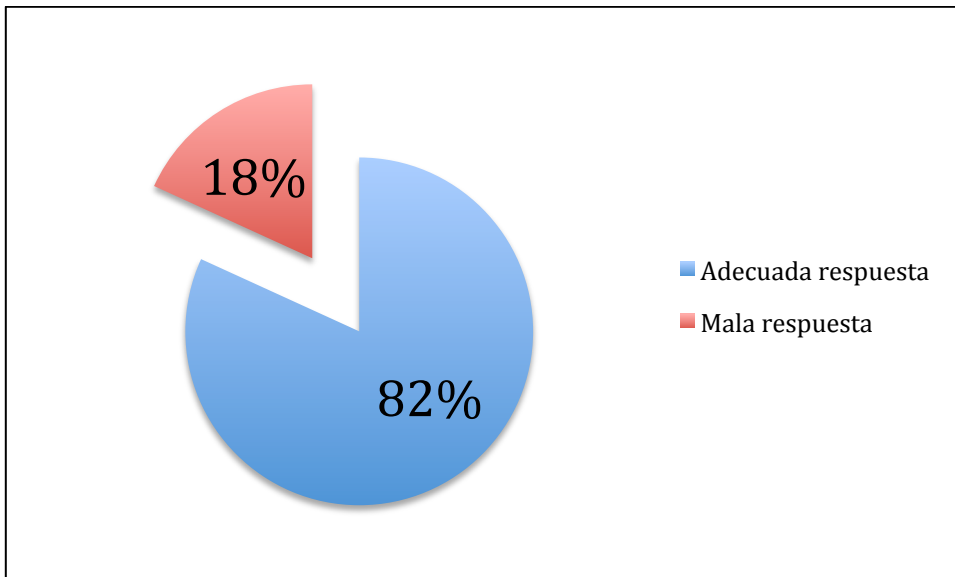


Gráfico 4. Respuesta a esteroide en pacientes con LLA.

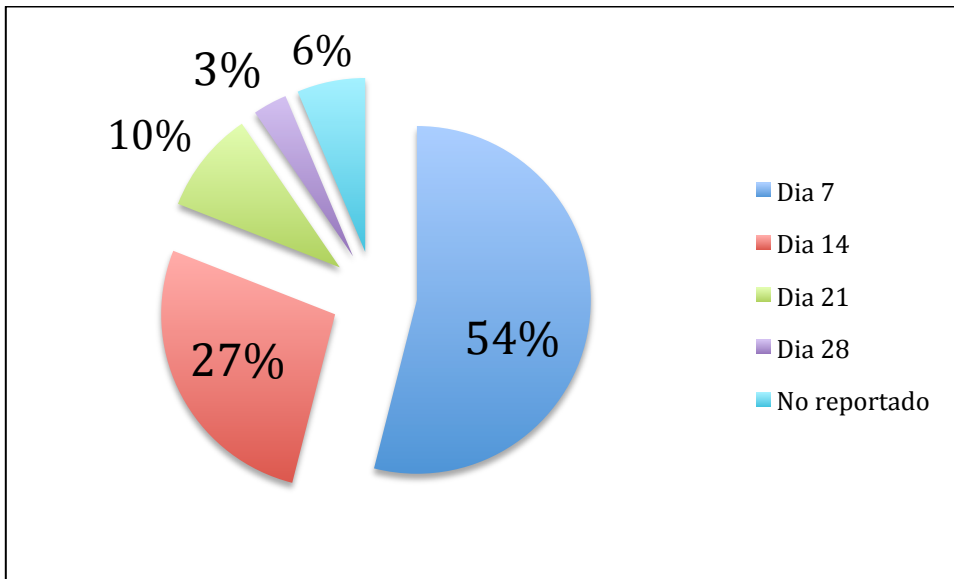


Gráfico 5. Remisión de Médula Ósea en pacientes con LLA.

TABLA RESULTADOS

Tabla 5. Frecuencia de alteraciones genéticas.

ALTERACION GENETICA	Hye-Jin Kim. Et al. (n=270)	Estudio HIM (n=93)
		LLA
t(12;21)(p13q22)	38(14%)	7(7.5%)
t(8;21)(q22q22)	20(7.4%)	1(1%)
t(9;22)(q34q11)	17(6.2%)	7(7.5%)
t(1;19)(Q23P13)	13(4.8%)	0
t(4;11)(q21q23)	8(2.9%)	1(1%)
t(15;17)(q22q21)	9(3.3%)	0
t(11;19)(q23,p13.3)	3(1.1%)	4(4.3%)
del(1p34)	2(0.74%)	2(2.1%)
t(10;11)(p12q23)	1(0.37%)	0
t(16;21)(p13q22)	0	0

ANEXO 1

NO. DE EXPEDIENTE	
SEXO	
EDAD	
FECHA DE DIAGNOSTICO	
RIESGO	
BIOMETRIA AL DIAGNOSTICO	
DIAGNOSTICO MORFOLÓGICO	
FENOTIPO	
PCR-HV	
TRASLOCACIÓN	
GEN AFECTADO	
LCR (POSITIVO/NEGATIVO)	
RESPUESTA A ESTEROIDE (LLA)	
RESPUESTA A 1ER CICLO TX (LMA)	
DIA AL QUE REMITIO LA MÉDULA EN LLA (7,14,21,28)	
FECHA DE ULTIMA CONSULTA	
COMENTARIOS	

ANEXO 2

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Purificación de RNA Celular Total de Sangre Entera Humana. (QIAGEN).

Procedimiento:

- 1. Mezcle 1 volumen de sangre total humana con 5 volúmenes de Buffer EL en un tubo de tamaño apropiado (no provisto).**

Para resultados óptimos, el volumen de la mezcla (sangre + Buffer EL) no deberá exceder 3/4 del volumen del tubo usado. Esto último para permitir un mezclado eficiente. Por ejemplo, agregar 5ml de Buffer EL a 1 ml de sangre total, y mezclar en un tubo el cual tenga un volumen total de 8 ml o más.

Nota: Usar una cantidad apropiada de sangre total. Más de 1.5 ml de sangre sana (normalmente entre 4000 – 7000 leucocitos por microlitro) puede ser procesada. Reduzca apropiadamente la cantidad utilizada si la sangre utilizada contiene un número elevado de leucocitos. (En este caso, también ajuste la cantidad de Buffer RLT en el paso 6.)

- 2. Incube por 10-15 minutos en hielo. Mezcle en vortex brevemente 2 veces durante la incubación.**

La suspensión turbia se convierte en translúcida durante la incubación, indicando la lisis de eritrocitos. Si es necesario, el tiempo de incubación puede extenderse a 20 minutos.

- 3. Centrifugue a 1700 rpm por 10 minutos a 4°C, y remover y descartar completamente el sobrenadante.**

Los leucocitos formarán un botón después de la centrifugación. Asegúrese que el sobrenadante es removido completamente. Trazas de eritrocitos, los cuales le dan al botón un tinte rojo, serán eliminadas en el siguiente paso de lavado. Véase la página 32 si la cantidad de eritrocitos que permanecen es grande.

- 4. Agregue Buffer EL al botón de células (usar 2 volúmenes de Buffer EL por cada volumen de sangre total usado en el paso 1). Resuspender las células usando el vortex brevemente.**

Por ejemplo, agregar 2 ml de Buffer EL por 1 ml de sangre total usada en el paso 1.

- 5. Centrifugue a 1700 rpm por 10 minutos a 4°C, y remover y descartar completamente el sobrenadante.**

Nota: El remover incompletamente el sobrenadante interferirá con la lisis y subsecuente ligado de ARN a la columna de centrifugado *QIAamp (blanca)*, resultando en bajo rendimiento.

- 6. Agregue Buffer RLT al botón de leucocitos de acuerdo con la tabla abajo. Usar vortex o pipetear para mezclar.**

Cuando no se use sangre sana, refiérase al número de leucocitos para determinar el volumen de Buffer RLT requerido. El Buffer RLT destruye las células. Ningún cúmulo de células deberá ser visible antes de proceder con el paso de homogenización. Usar vortex o pipetear más para remover cualquier cúmulo.

Buffer RLT* (µl)	Sangre total sana (ml)	No. de leucocitos
350	Hasta 0.5	Hasta 2×10^6
600	0.5 a 1.5	2×10^6 a 1×10^7

*Asegúrese que β-ME es agregado al buffer RLT (ver "Cosas para hacer antes de iniciar").

- 7. Pipetee el lisado directamente dentro de una columna de centrifugado *QIAshredder* (color morado) en un tubo de recolección de 2 ml (provisto) y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad para homogenizar. Descarte la columna de centrifugación *QIAshredder* y guarde el lisado homogenizado.**

Para evitar la formación de aerosol, ajustar la pipeta a ≥ 750 µl para asegurar que el lisado se agregue a la columna de centrifugación *QIAshredder* en un sólo paso.

Si se han usado muchas células, después de la homogenización el lisado será demasiado viscoso para pipetear. Si este es el caso, favor de referirse a la página 32.

- 8. Agregar 1 volumen (350 µl o 600 µl) de etanol al 70% al lisado homogenizado y mezclar pipeteando. No usar centrifuga.**

Un precipitado puede formarse después de la adición de etanol. Esto no afectará el procedimiento *QIAamp*.

- 9. Pipetee cuidadosamente la muestra, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado, dentro de una columna de centrifugación *QIAamp* nueva (color blanco) en un tubo colector de 2 ml (provisto) sin humedecer el borde. Centrifugar por 15 segundos a $\geq 10,000$ rpm. El volumen máximo de carga es 700 µl. Si el volumen de la muestra excede los 700 µl, cargue sucesivamente alícuotas dentro de la columna de centrifugación *QIAamp* y centrifugue como anteriormente.**

Descarte el filtrado y el tubo colector.

- 10. Transfiera la columna de centrifugación *QIAamp* en un nuevo tubo colector de 2 ml (provisto). Agregue 700 µl de Buffer RW1 a la columna de centrifugación *QIAamp* y centrifugue por 15 segundos a $\geq 10,000$ rpm.**

Descarte el filtrado y el tubo colector.

- 11. Coloque la columna de centrifugación *QIAamp* en un nuevo tubo colector (provisto). Pipetee 500 µl de Buffer RPE dentro de la columna de centrifugación *QIAamp* y centrifugue por 15 segundos a $\geq 10,000$ rpm.**

Descarte el filtrado y el tubo colector.

- 12. Cuidadosamente abra la columna de centrifugación *QIAamp* y agregue 500 µl de Buffer RPE. Cierre la tapa y centrifugue a toda velocidad (14,000 rpm) por 3 minutos.**

Nota: Algunos rotores de centrifuga se distorsionan levemente tras la desaceleración, resultando en que el filtrado, conteniendo el Buffer RPE entre en contacto con la columna de centrifugado *QIAamp*. El retirar la columna de centrifugado *QIAamp* y el tubo colector del rotor puede también causar que el filtrado entre en contacto con la columna de centrifugación *QIAamp*.

- 13. Recomendación: Coloque la columna de centrifugación *QIAamp* en un nuevo tubo colector de 2ml (no provisto) y descarte el tubo colector viejo junto con el filtrado. Centrifugue a toda velocidad por 1 minuto.**

Este paso ayuda a eliminar la probabilidad de posibles remanentes de Buffer RPE.

- 14. Transfiera la columna de centrifugado *QIAamp* en un tubo de centrifuga (Eppendorf) de 1.5 ml (provisto) y pipetee de 30-50 µl de agua libre de RNAsas (provisto)**

directamente en la membrana de *QIAamp*. Centrifugue por 1 minuto $\geq 10,000$ rpm para eluir. Repita si se procesó >0.5 ml de sangre total (o $>2 \times 10^6$ de leucocitos).

TÉCNICA E INTERPRETACIÓN DE RT-PCR.

1. PROPÓSITO DE LA PRUEBA –DETECCIÓN DE 28 TRANSLOCACIONES

El kit HemaVision HV01-28N es una prueba de diagnóstico *in vitro* de 28 translocaciones cromosomales causantes de leucemia incluyendo más de 80 puntos de ruptura además de las variantes de empalme de mRNA asociadas. Además, detecta nuevos puntos de ruptura y variantes de empalme de mRNA para las 28 translocaciones. Es una prueba rápida de un día con muy alta sensibilidad ($>99\%$) y especificidad ($>99\%$) y límites de detección tan bajo como 10^{-6} .

Este análisis lleva a las pruebas de diagnóstico *in vitro* todavía más profundo a una descripción detallada de la organización de los exones de genes híbridos originados de translocaciones cromosomales.

El kit HemaVision HV01-28N es una prueba cualitativa que usa RNA total extraído de células de sangre total o médula ósea como material de inicio en el análisis. La prueba utiliza transcripción reversa, seguido por reacciones en cadena de la polimerasa múltiples y anidadas (RT-PCR), electroforesis en gel de agarosa e interpretación.

HemaVision identifica cromosomas, genes y exones en el punto de ruptura de los genes híbridos. Además, la prueba identifica las variantes de empalme del mRNA de los genes híbridos. El kit contiene iniciadores para 25 reacciones de cDNA, 25 análisis maestros, y 15 análisis de separación.

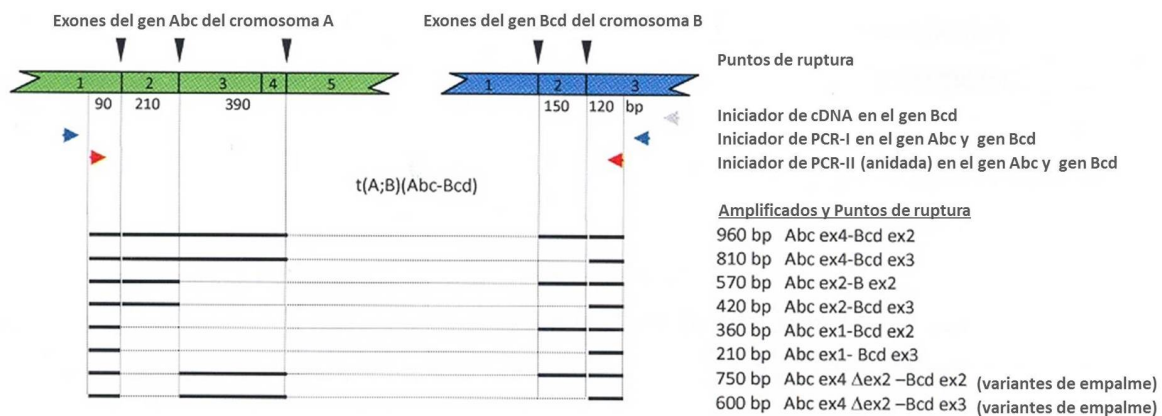


Figura 1: Ilustración de cómo el kit de HemaVision HV01-28N identifica los cromosomas, los genes híbridos y los exones del punto de ruptura entre las 28 traslocaciones cromosómicas de leucemia. Son presentados solamente los puntos de ruptura de los genes híbridos que mantienen el marco de lectura de transcripción original.

1. PRINCIPIOS DE LA PRUEBA.

RNA es la platilla para la síntesis de cDNA en una reacción usando transcriptasa reversa (RT) e iniciadores de cDNA específicos. El cDNA a su vez es la plantilla para la amplificación por PCR usando una DNA-polimerasa Taq de inicio caliente e iniciadores de PCR específicos. Muchos de los genes híbridos tienen varios puntos de ruptura. Por lo tanto, los iniciadores de PCR son diseñados para unirse en posiciones que permitan la búsqueda de todos estos puntos de ruptura como es ilustrado en la figura 1. Todo el proceso de la prueba y un ejemplo de los resultados de la prueba son mostrados en la figura 2.

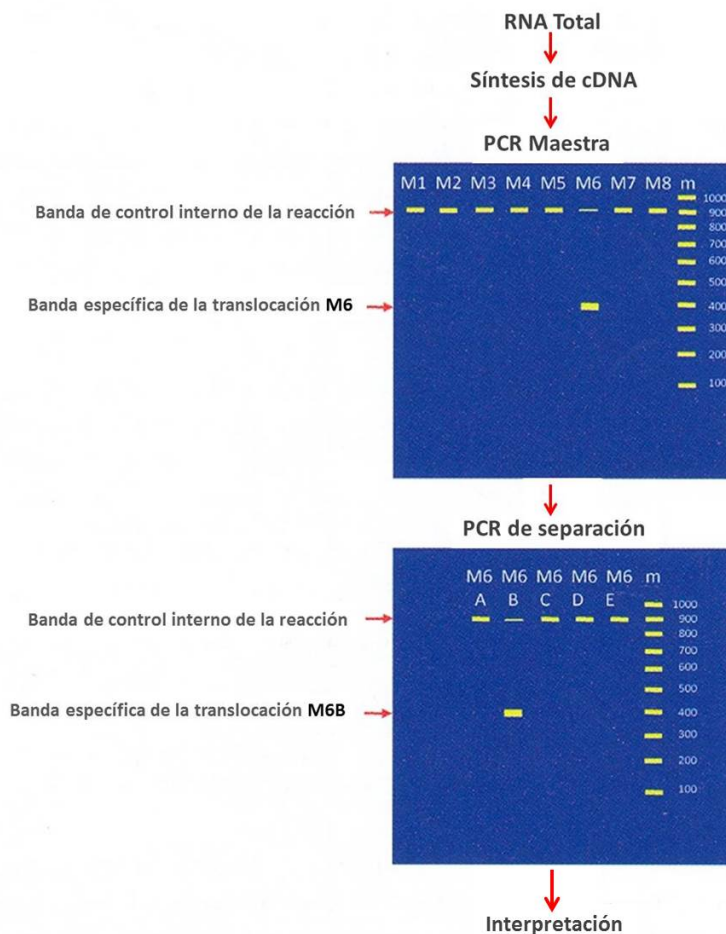


Figura 2: Proceso de trabajo y resultados de un análisis con HemaVision HV01-28N. Resultado: positivo en M6 y M6B, amplificado de 397 pares de bases (pb). Conclusión: Haciendo uso de la tabla 11 se puede concluir que el paciente tiene una translocación en t(9;22)(q34;q11) con un punto de ruptura en el M-bcr (punto de ruptura mayor) en la posición BCRex13-ABLex2 (b2a2) generando una proteína quimérica P210 (kDa)

Preparación de RNA

RNA total es extraído de células de sangre total, líneas celulares, o médula ósea con el Mini Kit de extracción de RNA de sangre QIAamp (Qiagen 52304).

Síntesis de cDNA

El cDNA es sintetizado en una reacción la cual contiene el RNA aislado y susando la Mezcla para cDNA (iniciadores) del kit HemaVision HV01-28N y una transcriptasa reversa, buffer 5x, DTT y dNTP, DTT del componente reactivo del kit HemaVision HV06-RMP.

PCR Maestra

El cDNA es usado como plantilla para ocho reacciones de amplificación por PCR múltiples (PCR Maestra-I) seguido posteriormente por ocho reacciones de PCR anidada (PCR Maestra-II). Todas las reacciones usan mezclas de iniciadores del kit HemaVision HV01-28N y la DNA-polimerasa de HemaVision, buffer 10x, y dNTP del kit HemaVision Hv06-RMP. Cada reacción de PCR Maestra contiene cuatro, cinco o seis pares de iniciadores para translocaciones específicos y un par de iniciadores del control interno de la reacción específicos para el gen constitutivo biotinidasa. Los productos de la PCR Maestra-II son analizados por electroforesis en gel de agarosa. La banda de control interno de la reacción de 911 pb es un control positivo para evaluar que tengamos RNA intacto y la funcionalidad de las reacciones de la RT-PCR. Una banda específica de translocación refleja que la prueba es positiva para una translocación. La identidad de esta translocación es establecida en la PCR de Separación.

PCR de Separación

Cada una de las reacciones de PCR de Separación contiene sólo un par de iniciadores para translocación específicos y un par de iniciadores del control interno de la reacción. Cuando por ejemplo, la reacción maestra M6 es positiva para una banda específica de translocación continúe la prueba usando las reacciones de separación M6A-M6E. Una vez más el cDNA es usado como plantilla para la PCR de Separación-I seguida por la PCR de Separación-II anidada. La PCR de Separación anidada es analizada por electroforesis en gel de agarosa.

Interpretación de resultados

Una muestra es positiva para una translocación cuando ambas PCR (Maestra y de Separación) producen bandas con tamaño molecular idéntico. El punto de ruptura es identificado por el número de la reacción de separación y por el tamaño molecular del amplificado de translocación específica haciendo uso de la tabla 11: Tabla de Interpretación. Más de una banda específica de translocación tanto en la PCR Maestra como en la de Separación revela la presencia de empalmes alternativos del mRNA del gen híbrido.

La figura 2 muestra el proceso para analizar muestras de sangre o médula ósea con la prueba de HemaVision HV01-28N. en este ejemplo, la prueba es positiva en la PCR Maestra M6 y en la PCR de Separación M6B con una banda de translocación específica de 397 pb. Al observar la Tabla de Interpretación (Tabla 11) se puede concluir que el paciente tiene una translocación t(9;22)(q34;q11) con un gen híbrido BCR-ABL1. El punto de ruptura une a los exones BCRex13-ABL1ex2 también llamado b2-a2. Este punto de ruptura pertenece al punto de ruptura mayor (M-bcr) del gen BCR.

1. COMPONENTES DEL KIT Y SU ALMACENAMIENTO.

El kit de HemaVision HV01-28N contiene dos cajas con Mezcla de Iniciadores (ver figura 3) y un Manual del Usuario con instrucciones. El kit es transportado a -20°C o menor y ambas cajas deben ser almacenadas a -20°C por el usuario. Durante la realización de la prueba siempre mantenga los reactivos de la prueba en hielo (0°C). Cada kit contiene material suficiente para 25 pruebas Maestras y 15 pruebas de Separación.

		M1 PCR-I	M2 PCR-I	M3 PCR-I	M4 PCR-I	M5 PCR-I	M6 PCR-I	M7 PCR-I	M8 PCR-I
	cDNA Mix								
		M1 PCR-II	M2 PCR-II	M3 PCR-II	M4 PCR-II	M5 PCR-II	M6 PCR-II	M7 PCR-II	M8 PCR-II

CAJA 1:

Mezclas de iniciadores para PCR Maestra y para cDNA:

200 μL Mezcla cDNA 1x (tapa blanca)
155 μL PCR Maestra-I 8x (tapas azules)
155 μL PCR Maestra-II 8x (tapas rojas)

M1A PCR-I	M1B PCR-I	M1C PCR-I	M1D PCR-I		M1A PCR-II	M1B PCR-II	M1C PCR-II	M1D PCR-II	
M2A PCR-I	M2B PCR-I	M2C PCR-I	M2D PCR-I	M2E PCR-I	M2A PCR-II	M2B PCR-II	M2C PCR-II	M2D PCR-II	M2E PCR-II
M3A PCR-I	M3B PCR-I	M3C PCR-I	M3D PCR-I		M3A PCR-II	M3B PCR-II	M3C PCR-II	M3D PCR-II	
M4A PCR-I	M4B PCR-I	M4C PCR-I	M4D PCR-I		M4A PCR-II	M4B PCR-II	M4C PCR-II	M4D PCR-II	
M5A PCR-I	M5B PCR-I	M5C PCR-I	M5D PCR-I	M5E PCR-I	M5A PCR-II	M5B PCR-II	M5C PCR-II	M5D PCR-II	M5E PCR-II
M6A PCR-I	M6B PCR-I	M6C PCR-I	M6D PCR-I	M6E PCR-I	M6A PCR-II	M6B PCR-II	M6C PCR-II	M6D PCR-II	M6E PCR-II
M7A PCR-I	M7B PCR-I	M7C PCR-I	M7D PCR-I		M7A PCR-II	M7B PCR-II	M7C PCR-II	M7D PCR-II	
M8A PCR-I	M8B PCR-I	M8C PCR-I	M8D PCR-I	M8E PCR-I	M8A PCR-II	M8B PCR-II	M8C PCR-II	M8D PCR-II	M8E PCR-II
				M8F PCR-I					M8F PCR-II

CAJA 2:

Mezclas de iniciadores para PCR de Separación:

95 μL PCR de Separación-I 37x (tapas azules)
95 μL PCR de Separación-II 37x (tapas rojas)

Figura 3: Muestra el contenido del kit de HemaVision HV01-28N.

NOTA: Para la funcionalidad de la prueba de RT-PCR múltiple de HemaVision HV01-28N, es esencial también obtener y usar los reactivos provistos en el kit HemaVision HV06-RMP el cual contiene: Transcriptasa Reversa-MMLV; buffer de cDNA 5x; DTT; dNTP, DNA-Polimerasa HemaVision, buffer de PCR 10x.

2. PROCEDIMIENTO.

Notas

- Almacene todos los componentes de la prueba como fue descrito en la sección 3: *Componentes del Kit y su Almacenaje*.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- Una técnica de pipeteo cuidadosa es esencial para resultados precisos.
- Este protocolo es optimizado con enzimas y buffers del kit HemaVision HV06-RMP.
- Este protocolo es optimizado por el termociclador Perkin Elmer GeneAmp 9600. El uso de otro tipo de termociclador puede requerir la optimización por el usuario.
- Como un control positivo para la calidad del RNA y la funcionabilidad de cada una de las reacciones de la RT-PCR, debe estar presente un fragmento de 911 pb del gen constitutivo biotinidasa en todas las líneas excepto en las reacciones positivas para un amplificado específico de translocación donde puede ser débil o estar ausente.
- Como control negativo realice una reacción de cDNA sin plantilla de RNA.

Preparación del RNA.

- Use sangre de flebotomía recolectada en un tubo con EDTA. Alternativamente, se puede usar médula ósea recolectada en un tubo con EDTA. No congele la muestra de sangre o médula ósea ni use muestras recolectadas en tubos con heparina como anticoagulante.
- Separe las células mononucleares de la sangre total o de la médula ósea por el método Ficoll-Hypaque.
- Dentro de las 24 horas posteriores de recolección, extraiga RNA total con el Mini Kit de extracción de RNA de sangre QIAamp (Qiagen 52304). Normalmente 5-10 µg de RNA total es extraído de 1×10^7 células sanguíneas mononucleares.
- Mida la concentración de RNA leyéndola su densidad óptica a 260 nm. Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL. Ajuste la concentración de RNA a 0.1 µg/ µL con H₂O libre de RNasas.
- Haga alícuotas de 20 µL (0.1 µg/ µL) de RNA en tubos libres de RNasas. Almacene estas alícuotas de RNA a -80°C o use el RNA inmediatamente para la síntesis de cDNA.

Pruebas Maestra y de Separación.

Paso 1: Síntesis de cDNA.

1.1 En la habitación de Mezcla Maestra prepare la Mezcla de síntesis de cDNA de acuerdo con la Tabla 1 usando los reactivos de HemaVision HV06-RMP

No agregue volumen adicional para compensar pérdidas de líquido por la preparación. Esto ya ha sido considerado en las cantidades de la tabla.

Tabla 1: Mezcla de síntesis de cDNA.

Número de muestras	1	2
Buffer MMLV-RT 5x (µL)	11.0	22.0
DTT 100 mM (µL)	5.5	11.0
Mezcla de dNTP 10 mM (µL)	5.5	11.0

MMLV-RT (μL)	2.2	4.4
Volumen Total (μL)	24.2	48.4

- 1.2 En la habitación de cDNA agregue 8 μL de Mezcla cDNA (iniciadores) del tubo de la tapa blanca del kit de HemaVision HV01-28N a uno de los tubos con 20 μL de RNA total (2 μg). Mezcle gentilmente y centrifugue por 10 segundos.
- 1.3 En un tubo libre de RNasas a parte, agregue 8 μL de Mezcla de cDNA a 20 μL de H_2O (control negativo).
- 1.4 Incube los tubos en un bloque térmico o en baño de agua a 65°C por 5 minutos. Enfríe y mantenga en hielo.
- 1.5 Agregue 22 μL de la *Mezcla de síntesis de cDNA* al tubo con 28 μL de RNA+Mezcla cDNA y al tubo de control negativo del paso 1.4. Mezcle gentilmente y centrifugue por 10 segundos.
- 1.6 Incube a 37°C por 45 minutos.
- 1.7 Agregue 50 μL de H_2O a cada tubo de cDNA.
- 1.8 Incube a 95°C por 5 minutos para inactivar la enzima RT-MMLV.
- 1.9 Enfríe y mantenga el tubo de cDNA en hielo (0°C, no congelar) por un máximo de tres días antes de usarlo en la PCR Maestra y la PCR de Separación.

Paso 2: PCR Maestra-I

Con el fin de lograr una máxima sensibilidad y especificidad cada muestra es analizada con una reacción de PCR Maestra primera y otra reacción anidada.

- 2.1 En la habitación de Mezcla Maestra prepare la *Mezcla de PCR Maestra-I* de acuerdo con la Tabla 2 usando los reactivos de HemaVision HV06-RMP. Mezcle y centrifugue por 10 segundos.

No agregue volumen adicional para compensar pérdidas de líquido por la preparación. Esto ya ha sido considerado (+10%) en las cantidades de la tabla.

Tabla 2: Mezcla PCR Maestra-I

Número de muestras	1	2
Número de reacciones PCR	8	16
Buffer PCR 10x (μL)	22.0	44.0
Mezcla de dNTP (μL)	4.4	8.8
DNA-polimerasa HemaVision (μL)	3.5	7.0
H_2O (μL)	102.1	204.2
Volumen Total (μL)	132.0	264.0

- 2.2 Para cada muestra identifique los tubos en una fila de 8 microtubos del M1 al M8.
- 2.3 Alicate 15 μL de *Mezcla PCR Maestra-I* a cada uno de los tubos de PCR en la(s) fila(s) de 8 microtubos.
- 2.4 A estos tubos agregue 5 μL de iniciadores de PCR Maestra-I de los tubos de tapa azul M1-M8 a los tubos de PCR correspondientes. Por ejemplo, al tubo de PCR identificado como M1 agregue 5 μL del M1 PCR-I.
- 2.5 En la habitación de PCR agregue 5 μL de cDNA (del paso 1.9) a cada uno de los tubos de PCR del paso 2.4. Cierre los tubos, mezcle y centrifugue por 10 segundos. Volumen por tubo: 25 μL .

- 2.6 Transfiera los tubos a un termociclador e inicie la amplificación por PCR usando los parámetros de ciclado de PCR de la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros de amplificación de la PCR Maestra-I

Paso	Tiempo/Temperatura	Ciclos
1	15 minutos a 95°C	1
2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 minuto 30 segundos a 72°C	25
3	Mantener a 4°C	1

Paso 3: PCR Maestra-II (anidada)

- 3.1 En la habitación de Mezcla Maestra prepare la *Mezcla PCR Maestra-II* de acuerdo con la Tabla 4 usando los reactivos de HemaVision HV06-RMP. Mezcle y centrifugue por 10 segundos. No agregue volumen adicional para compensar pérdidas de líquido por la preparación. Esto ya ha sido considerado (+10%) en las cantidades de la tabla.

Tabla 4: Mezcla PCR Maestra-II

Número de muestras	1	2
Número de reacciones PCR	8	16
Buffer PCR 10x (µL)	22.0	44.0
Mezcla de dNTP (µL)	4.4	8.8
DNA-polimerasa HemaVision (µL)	3.5	7.0
H ₂ O (µL)	137.3	274.6
Volumen Total (µL)	167.2	334.4

- 3.2 Para cada muestra identifique los tubos en una fila de 8 microtubos del M1 al M8.
- 3.3 Alicate 19 µL de *Mezcla PCR Maestra-II* a cada uno de los tubos de PCR en la(s) fila(s) de 8 microtubos.
- 3.4 A estos tubos agregue 5 µL de iniciadores de PCR Maestra-II de los tubos de tapa roja M1-M8 a los tubos de PCR correspondientes. Por ejemplo, al tubo de PCR identificado como M1 agregue 5 µL del M1 PCR-II.
- 3.5 En la habitación de PCR abra cuidadosamente y sin derramar los tubos de PCR que contienen las reacciones de la PCR Maestra-I. De estos tubos transfiera 1 µL a los tubos de PCR Maestra-II correspondientes del paso 3.3. Para esta transferencia puede utilizarse una pipeta de ocho cámaras. Cierre los tubos, mezcle y centrifugue por 10 segundos. Volumen por tubo: 25 µL.
- 3.6 Transfiera los tubos a un termociclador e inicie la amplificación por PCR usando los parámetros de ciclado de PCR de la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros de amplificación de la PCR Maestra-II

Paso	Tiempo/Temperatura	Ciclos
1	15 minutos a 95°C	1

2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 minuto 30 segundos a 72°C	20
3	10 minutos a 72°C	1
4	Mantener a 4°C	1

Paso 4: Electroforesis en gel

4.1 Prepare un gel de agarosa al 1.5% (p/v) de al menos 10 cm de longitud en buffer TBE 1x. Agregue bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ µL.

4.2 En la habitación de electroforesis en gel abra cuidadosamente los tubos de PCR con la PCR Maestra-II sin contaminar los guantes o alrededores con gotas de los amplificadores con gran número de copias.

Agregue 3 µL de buffer de carga 10x dentro de cada tubo de PCR. Cargue aproximadamente 14 µL por pozo en el gel (carriles 1-8). Finalmente, cargue un marcador de peso molecular en el carril 9.

4.3 Corra el gel en buffer TBE 1x hasta que el colorante azul Bromofenol haya migrado aproximadamente ¾ del gel.

4.4 Examine el gel con luz UV y documente el resultado por fotografía.

Paso 5: Interpretación de los resultados de PCR Maestra-II

- Positivo para una (o más) banda(s) específicas de translocación. Continúe con las reacciones de Separación correspondientes para identificar la translocación.
- Positivo para una banda específica de translocación pero es muy débil o apenas una mancha. Positivo para la banda de control interno de reacción (911 pb) en todos los carriles. Continúe con las reacciones de Separación relevantes para identificar la translocación.
- Negativo para una banda específica de translocación y positiva para la banda de control interno de reacción (911 pb) en todos los carriles M1-M8. El paciente es negativo para las 28 translocaciones detectadas por HemaVision HV01-28N.
- Negativo para una banda específica de translocación y negativo para la banda de control interno de reacción (911 pb) en todos los carriles M1-M8. La prueba falló más debidamente a 1) pobre calidad del RNA, o 2) uso del termociclador con un perfil de temperatura diferente del de ABI 9600, o 3) mezcla incorrecta de reacciones. Corrija y repita la prueba.
- Negativo para una banda específica de translocación y positivo para la banda de control interno de reacción (911 pb) en algunos de los carriles M1-M8. La prueba falló más debidamente a 1) uso del termociclador con un perfil de temperatura diferente del de ABI 9600, o 2) mezcla incorrecta de reacciones. Corrija y repita la prueba.
- El control negativo de la prueba es positivo (presencia de banda): La(s) reacción(es) fue contaminada con DNA. Identifique la contaminación y repita la prueba.

Paso 6: PCR de Separación-I

Cuando una muestra aparece como positiva para una translocación en la PCR Maestra-II, dicha translocación y el punto de ruptura del gen híbrido pueden ser identificados analizando el cDNA remanente en una reacción de PCR de Separación primera y otra anidada.

- 6.1** En la habitación de Mezcla Maestra prepare la *Mezcla de PCR de Separación-I* de acuerdo con la Tabla 6 usando los reactivos de HemaVision HV06-RMP. Mezcle y centrifugue por 10 segundos.

No agregue volumen adicional para compensar pérdidas de líquido por la preparación. Esto ya ha sido considerado (+10%) en las cantidades de la tabla.

Tabla 6: Mezcla PCR de Separación-I

Número de positivos en la PCR Maestra-II	1	1	1
Número de reacciones PCR de Separación-I	4	5	6
Buffer PCR 10x (µL)	11.00	13.75	16.50
Mezcla de dNTP (µL)	2.20	2.75	3.30
DNA-polimerasa HemaVision (µL)	1.76	2.20	2.64
H ₂ O (µL)	51.04	63.80	76.56
Volumen Total (µL)	66.0	82.5	99.0

- 6.2** Identifique cuatro, cinco o seis tubos de PCR (p.ej. si la PCR Maestra M6 es positiva identifica cinco tubos para la PCR de Separación: M6A, M6B, ...M6E).
- 6.3** Alicata 15 µL de *Mezcla PCR de Separación-I* a cada uno de los tubos de PCR.
- 6.4** A cada uno de estos tubos agregue 5 µL de iniciadores de PCR de Separación-I de los tubos de tapa azul (p.ej. al tubo de PCR identificado como M6A agregue 5 µL de la mezcla de iniciadores M6A).
- 6.5** En la habitación de PCR agregue 5 µL de cDNA (del paso 1.9) a cada uno de los tubos de PCR del paso 6.4. Cierre los tubos, mezcle y centrifugue por 10 segundos. Volumen por tubo: 25 µL.
- 6.6** Transfiera los tubos a un termociclador e inicie la amplificación por PCR usando los parámetros de ciclado de PCR de la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros de amplificación de la PCR de Separación-I

Paso	Tiempo/Temperatura	Ciclos
1	15 minutos a 95°C	1
2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 minuto 30 segundos a 72°C	25
3	Mantener a 4°C	1

Paso 7: PCR de Separación-II (anidada)

- 7.1** En la habitación de Mezcla Maestra prepare la *Mezcla PCR de Separación-II* de acuerdo con la Tabla 8 usando los reactivos de HemaVision HV06-RMP. Mezcle y centrifugue por 10 segundos.

No agregue volumen adicional para compensar pérdidas de líquido por la preparación. Esto ya ha sido considerado (+10%) en las cantidades de la tabla.

Tabla 8: Mezcla PCR de Separación-II

Número de positivos en la PCR Maestra-II	1	1	1
Número de reacciones PCR de Separación-II	4	5	6
Buffer PCR 10x (µL)	11.00	13.75	16.50
Mezcla de dNTP (µL)	2.20	2.75	3.30
DNA-polimerasa HemaVision (µL)	1.76	2.20	2.64
H ₂ O (µL)	68.64	85.80	102.96
Volumen Total (µL)	83.6	104.5	125.4

- 7.2 Identifique cuatro, cinco o seis tubos de PCR (p.ej. si la PCR Maestra M6 es positiva identifica cinco tubos para la PCR de Separación: M6A, M6B, ...M6E).
- 7.3 Alicate 19 µL de *Mezcla PCR de Separación-II* a cada uno de los tubos de PCR.
- 7.4 A cada uno de estos tubos agregue 5 µL de iniciadores de PCR de Separación-II de los tubos de tapa roja (p.ej. al tubo de PCR identificado como M6A agregue 5 µL de la mezcla de iniciadores M6A).
- 7.5 En la habitación de PCR abra cuidadosamente y sin derramar los tubos de PCR que contienen las reacciones de la PCR de Separación-I. De estos tubos transfiera 1 µL a los tubos de PCR de Separación-II correspondientes del paso 7.4. Cierre los tubos, mezcle y centrifugue por 10 segundos. Volumen por tubo: 25 µL.
- 7.6 Transfiera los tubos a un termociclador e inicie la amplificación por PCR usando los parámetros de ciclado de PCR de la Tabla 9.

Tabla 9: Parámetros de amplificación de la PCR de Separación-II

Paso	Tiempo/Temperatura	Ciclos
1	15 minutos a 95°C	1
2	30 segundos a 95°C 30 segundos a 58°C 1 minuto 30 segundos a 72°C	20
3	10 minutos a 72°C	1
4	Mantener a 4°C	1

Paso 8: Electroforesis en gel

- 8.1 Prepare un gel de agarosa al 1.5% (p/v) de al menos 10 cm de longitud en buffer TBE 1x. Agregue bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ µL.
- 8.2 En la habitación de electroforesis en gel abra cuidadosamente los tubos de PCR con la PCR de Separación-II sin contaminar los guantes o alrededores con gotas de los amplificadores con gran número de copias.
Agregue 3 µL de buffer de carga 10x dentro de cada tubo de PCR. Cargue aproximadamente 14 µL por pozo en el gel (carriles 1-8). Finalmente, cargue un marcador de peso molecular en el carril 9.
- 8.3 Corra el gel en buffer TBE 1x hasta que el colorante azul Bromofenol haya migrado aproximadamente ¾ del gel.
- 8.4 Examine el gel con luz UV y documente el resultado por fotografía.

5 INTERPRETACIÓN.

- Positivo para la banda de control interno de la reacción (911 pb) en todas (cuatro o cinco o seis) las reacciones de PCR de Separación-II. La banda de control interno de la reacción puede ser débil o puede estar ausente en el carril que contenga una fuerte banda de translocación específica. La banda de translocación específica tiene el mismo peso molecular que la banda específica de translocación en la reacción de PCR Maestra-II correspondiente. Identifique la translocación con el uso de la Tabla 11.
Como un ejemplo: Ambas reacciones M6 y M6B contienen un amplificado de 397 pb. La Tabla 11 demuestra que la muestra tiene un translocación t(9;22)(q34;q11) con un gen híbrido BCR-ABL1 teniendo su punto de ruptura en los exones b2-a2.
- Cuando dos reacciones PCR Maestras-II y dos PCR de Separación-II cuentan con bandas específicas de translocación puede ser causado por la presencia de dos translocaciones. Pero también pueden ser causadas por la amplificación de dos regiones de una sola translocación que se superponen entre sí. P.ej. el gen BCR en la translocación t(9;22)(BCR-ABL1) puede tener puntos de ruptura después del exón 1, exón 6, exón 12, exón 13, exón 14, exón 19 y exón 20 dando como resultado proteínas quiméricas funcionales con un punto de ruptura del gen ABL1 en el exones 2 o 3. M6 y M6B contienen iniciadores para PCR que se unen al exón 12 del BCR. M8 y M8F contienen iniciadores para PCR que se une al exón 1 de BCR. Cuando el punto de ruptura está localizado en cualquier lugar después del exón 12 de BCR, M6 y M6B serán positivas. Pero a veces M8/M8F también son positivas junto con M6/M6B (cuando no hay ninguno de los empalmes alternativos). La translocación debe ser interpretada como positiva en M6B, vea Tabla 10. Esta tabla muestra translocaciones con dos o tres reacciones Maestras/de Separación positivas.

Tabla 10: Translocaciones con dos o tres reacciones Maestra y de Separación positivas.

Separación positiva...	... y también Separación positiva.	Interprete la translocación de la Separación	Translocación
M1D	M2D & M5B	M1D	t(10;11)
M2D	M5B	M2D	t(10;11)
M2C	M5C	M2C	t(11;19)
M4B	M8B	M4B	t(3;21)
M5D	M2E	M5D	t(9;11)
M6A	M7C	M6A	inv(16)
M6B	M8F	M6B	t(9;22)
M7D	M4B & M8B	M7D	t(3;21)
M8C	M4D	M8C	t(15;17)

- La PCR de Separación-II es negativa para la banda de “translocación específica) vista en la reacción de PCR Maestra-II correspondiente. Cuando todas las reacciones de Separación cuentan con la banda de control interno de la reacción (911 pb) la prueba debe ser interpretada como negativa para las translocaciones presentadas por el kit de HemaVision HV01-28N. Cuando algunas o todas las reacciones de Separación son también negativas para la banda de control interno de la reacción (911 pb) la prueba de Separación falló y ésta debe ser repetida.

- El kit de HemaVision HV01-28N encuentra 28 translocaciones o rearrreglos cromosómicos con más de ochenta mRNA variantes de los genes híbridos gracias a la heterogeneidad de los puntos de ruptura y/o de los empalmes alternativos. Como consecuencia, el número de fragmentos de PCR positivos para una translocación es grande.

Tabla 11: Tabla de interpretación

M1 y M1A-D			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M1A	t(X;11)(q13;q23)	MLL(11q23) FOXO4(Xq13.1)	MLL ex8 – FOXO4 ex2: 244 pb MLL ex9 – FOXO4 ex2: 376 pb MLL ex10 – FOXO4 ex2: 490 pb
M1B	t(6;11)(q27;q23)	MLL(11q23) MLLT4(6q27)	MLL ex8 – MLLT4 ex2: 309 pb MLL ex9 – MLLT4 ex2: 441 pb MLL ex10 – MLLT4 ex2: 555 pb
M1C	t(11;19)(q23;p13.1)	MLL(11q23) ELL(19p13.1)	MLL ex8 – ELL ex3: 283 pb MLL ex8 – ELL ex2: 331 pb MLL ex9 – ELL ex3: 415 pb MLL ex9 – ELL ex2: 463 pb MLL ex9 – ELL ex2 ins120: 583 pb MLL ex10 – ELL ex2: 697 pb
M1D	t(10;11)(p12;q23)	MLL(11q23) MLLT10(10p12)	MLL ex8 – MLLT10 ex6: 268 pb MLL ex7 – MLLT10 ex5: 304pb MLL ex8 – MLLT10 ex4: 433 pb MLL ex7 – MLLT10 ex3: 439 pb

M2 y M2A-E			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M2A	t(1;11)(p32;q23)	MLL(11q23) EPS15(1p32)	MLL ex8 – EPS15 ex2: 184 pb
M2B	t(11;17)(q23;q12-21)	MLL(11q23) MLLT6(17q21)	MLL ex7 – MLLT6 ex11: 304 pb
M2C	t(11;19)(q23;p13.1)	MLL(11q23) MLLT1(19p13.3)	MLL ex8 – MLLT1 ex2: 187 pb MLL ex9 – MLLT1 ex2: 319 pb MLL ex10 – MLLT1 ex2: 433 pb MLL ex11 – MLLT1 ex2: 580 pb
M2D	t(10;11)(p12;q23)	MLL(11q23) MLLT10(10p12)	MLL ex8 – MLLT10 ex10: 269 pb MLL ex8 – MLLT10 ex9: 365 pb MLL ex9 – MLLT10 ex10: 401 pb MLL ex8 – MLLT10 ex8: 461 pb MLL ex9 – MLLT10 ex9: 497 pb MLL ex9 – MLLT10 ex8: 593 pb
M2E	t(9;11)(p22;q23)	MLL(11q23) MLLT3(9p22)	MLL ex8 – MLLT3 ex9(B): 367 pb MLL ex9 – MLLT3 ex9(B): 499 pb MLL ex10 – MLLT3 ex9(B): 613 pb

M3 y M3A-D

PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M3A	t(1;19)(q23;p13)	TCF3(19p13.3) PBX1(PRL)(1q23.3)	TCF3 ex16 – PBX ex3: 376 pb TCF3 ex16 – PB ex3 (ins 27 pb): 403 pb
M3B	t(17;19)(q22;p13)	TCF3(19p13.3) HLF(17q22)	TCF3 ex15 – HLF ex4: 207 pb TCF3 ex14 – HLF ex3: 269 pb TCF3 ex16 – HLF ex3: 552 pb TCF3 ex14 – HLF ex2: 605 pb TCF3 ex16 – HLF ex2: 888 pb TCF3 ex16 – HLF ex4(ins59): 389 pb TCF3 ex16 – HLF ex4(ins87): 417 pb
M3C	t(12;21)(p13;q22)	ETV6(12p13) RUNX1(21q22.3)	ETV6 ex5 – RUNX1 ex4: 389 pb ETV6 ex5 – RUNX1 ex3: 428 pb
M3D	TALd 40kpb delección 1p32	STIL(1p32) TAL1(1p32)	STIL ex1 – TAL1 ex1 d1+d2: 184 pb

M4 y M4A-D			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M4A	t(8;21)(q22;q22)	RUNX1(21q22.3) RUNX1T1(8q22)	RUNX1 ex6 – RUNX1T1 ex2: 197 pb RUNX1 ex7 – RUNX1T1 ex2: 389 pb RUNX1 ex8 – RUNX1T1 ex2: 551 pb
M4B	t(3;21)(q26;q22)	RUNX1(21q22.3) MDS1-EVI1(3q26)	RUNX1 ex6 – MDS1-EVI1 ex2: 291 pb RUNX1 ex7 – MDS1-EVI1 ex2: 483 pb RUNX1 ex8 – MDS1-EVI1 ex2: 645 pb
M4C	t(16;21)(p11;q22)	FUS(16p11.2) ERG(21q22.3)	FUS ex7 – ERG ex13: 315 pb FUS ex8 – ERG ex11: 453 pb
M4D	t(15;17)(q22;q12)	PML (15q22) RARA(17q12)	PML ex3 – RARA ex3: 325 pb

M5 y M5A-E			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M5A	t(4;11)(q21;q23)	MLL(11q23) AFF1(4q21.3)	MLL ex8 – AFF1 ex8(1546): 191 pb MLL ex8 – AFF1 ex7(1459): 278pb MLL ex9 – AFF1 ex8(1546): 323 pb MLL ex8 – AFF1 ex6(1414): 323 pb MLL ex9 – AFF1 ex7(1459): 410 pb MLL ex10 – AFF1 ex8(1546): 437 pb MLL ex9 – AFF1 ex6(1414): 455 pb MLL ex10 – AFF1 ex7(1459): 524 pb MLL ex10 – AFF1 ex6(1414): 569 pb
M5B	t(10;11)(p12;q23)	MLL(11q23) MLLT10(10p12)	MLL ex7 – MLLT10 ex17: 200 pb MLL ex8 – MLLT10 ex16: 386 pb MLL ex7 – MLLT10 ex15: 491 pb MLL ex9 – MLLT10 ex16: 518 pb MLL ex7 – MLLT10 ex14: 539 pb MLL ex7 – MLLT10 ex13: 572 pb MLL ex7 – MLLT10 ex12: 617 pb

M5C	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL(11q23) MLLT1(19p13.3)	MLL ex8 – MLLT1 ex7(B): 315 pb MLL ex9 – MLLT1 ex7(B): 447 pb MLL ex10 – MLLT1 ex7(B): 561 pb
M5D	t(9;11)(p22;q23)	MLL(11q23) MLLT3(9p22)	MLL ex8 – MLLT3 ex6(A): 322 pb MLL ex9 – MLLT3 ex6(A): 454 pb MLL ex10 – MLLT3 ex6(A): 568 pb
M5E	t(1;11)(q21;q23)	MLL(11q23) MLLT11(1q21)	MLL ex8 – MLLT11 ex2: 401 pb MLL ex9 – MLLT11 ex2: 533 pb MLL ex10 – MLLT11 ex2: 647 pb

M6 y M6A-E			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M6A	inv(16)(p13;q22)	CBFB(16q22.1) MYH11(16p13.11)	CBFB ex4 – MYH11 ex30(G): 192 pb CBFB ex4 – MYH11 ex29: 399 pb CBFB ex5 – MYH11 ex30(D): 288 pb CBFB ex5 – MYH11 ex29(E): 495 pb
M6B	t(9;22)(p34;q11)	BCR(22q11) ABL1(9q34.1)	M-bcr, P210: BCR ex12 – ABL1 ex3 (b1a3): 118 pb BCR ex13 – ABL1 ex3 (b2a3): 223 pb BCR ex12 – ABL1 ex2 (b1a2): 292 pb BCR ex14 – ABL1 ex3 (b3a3): 298 pb BCR ex13 – ABL1 ex2 (b2a2): 397 pb BCR ex14 – ABL1 ex2 (b3a2): 472 pb μ-bcr, P230: BCR ex19 – ABL1 ex3 (c3a3): 838 pb BCR ex20 – ABL1 ex2 (c3a3): 973 pb BCR ex19 – ABL1 ex2 (c3a2): 1012 pb BCR ex20 – ABL1 ex2 (c3a2): 1047 pb
M6C	t(9;12)(q34;p13)	ETV6(12p13) ABL1(9q34.1)	ETV6 ex2 – ABL1 ex3: 121 pb ETV6 ex3 – ABL1 ex3: 286 pb ETV6 ex2 – ABL1 ex2: 295 pb ETV6 ex4 – ABL1 ex3: 421 pb ETV6 ex3 – ABL1 ex2: 460 pb ETV6 ex4 – ABL1 ex2: 595 pb ETV6 ex5 – ABL1 ex3: 967 pb ETV6 ex5 – ABL1 ex2: 1141 pb
M6D	t(5;12)(q33;p13)	ETV6(12p13) PDGFRB(5q33)	ETV6 ex4 – PDGFRB ex11: 464 pb ETV6 ex4 – PDGFRB ex9: 800 pb
M6E	t(12;22)(p13;q11-12)	ETV6(12p13) MN1(22q12.1)	ETV6 ex2 – MN1 ex2(1): 244 pb ETV6 ex3 – MN1 ex2(2): 409 pb ETV6 ex4 – MN1 ex2: 544 pb

M7 y M7A-D			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M7A	t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) NUP214(9q34)	DEK ex9 – NUP214 ex18: 320 pb DEK ex10 – NUP214 ex18: 449 pb DEK ex9 – NUP214 ex17: 479 pb DEK ex10 – NUP214 ex17: 608 pb DEK ex9 – NUP214 ex16: 629 pb DEK ex9 – NUP214 ex15: 716 pb DEK ex10 – NUP214 ex16: 758 pb DEK ex10 – NUP214 ex15: 845 pb

M7B	t(9;9)(p34;q34)	SET(9q34) NUP214(9q34)	SET ex7 – NUP214 ex18: 246 pb SET ex8 – NUP214 ex18: 393 pb SET ex7 – NUP214 ex17: 405 pb SET ex8 – NUP214 ex17: 552 pb SET ex7 – NUP214 ex16: 555 pb SET ex7 – NUP214 ex15: 642 pb SET ex8 – NUP214 ex16: 702 pb SET ex8 – NUP214 ex15: 789 pb
M7C	inv(16)(p13;q22)	CBFB(16q22.1) MYH11(16p13.11)	CBFB ex4 – MYH11 ex34 (F): 174 pb CBFB ex5 – MYH11 ex34 (A): 270 pb CBFB ex4 – MYH11 ex33: 387 pb CBFB ex5 – MYH11 ex33 (B): 483 pb CBFB ex4 – MYH11 ex32: 636 pb CBFB ex5 – MYH11 ex32: 732 pb CBFB ex4 – MYH11 ex31: 789 pb CBFB ex5 – MYH11 ex31: 885 pb
M7D	t(3;21)(q26;q22)	RUNX1(21q22.3) RPL22 (EAP) (3p26)	RUNX1 ex6 – RPL22 (EAP) 22pb del extremo 3' ex2: 127 pb RUNX1 ex7 – RPL22 (EAP) 22pb del extremo 3' ex2: 319 pb

M8 y M8A-F			
PCR	TRANSLOCACIÓN	GENES	PUNTOS DE RUPTURA Y FRAGMENTOS DE PCR
M8A	t(11;17)(q23;q12)	ZBTB16(11q23) RARA(17q12)	ZBTB16 ex4(A) – RARA ex3: 285 pb ZBTB16 ex5(B) – RARA ex3: 373 pb
M8B	t(3;21)(q26;q22)	RUNX1(21q22.3) EVI1(3q26)	RUNX1 ex6 – MDS1-EVI1 ex5: 91 pb RUNX1 ex7 – MDS1-EVI1 ex5: 283 pb RUNX1 ex8 – MDS1-EVI1 ex5: 445 pb RUNX1 ex6 – MDS1-EVI1 ex2: 667 pb RUNX1 ex7 – MDS1-EVI1 ex2: 859 pb RUNX1 ex8 – MDS1-EVI1 ex2: 1021 pb
M8C	t(15;17)(q22;q12)	PML(15q22) RARA(17q12)	PML ex6 – RARA ex3: 353 pb
M8D	t(5;17)(q35;q12)	NPM1(5q35) RARA(17q12)	NPM1 ex4(S) – RARA ex3: 91 pb
M8E	t(3;5)(q25.1;q35)	NPM1(5q35) MLF1(3q25.1)	NPM1 ex6 – MLF1 ex4: 276 pb
M8F	t(9;22)(q34;q11)	BCR(22q11) ABL1(9q34.1)	<u>m-bcr, P190:</u> BCR ex1 ABL1 ex3 (e1a3): 146 pb BCR ex1 ABL1 ex2 (e1a2): 320 pb BCR ex6 ABL1 ex3 (e6a3): 788 pb BCR ex1 ABL1 ex2 (e6a2): 962 pb

La **Tabla 11** es usada para la interpretación de los resultados observados en la electroforesis en gel de agarosa de la PCR de Separación-II. La tabla enlista las translocaciones, los genes involucrados, los exones en el punto de ruptura y el tamaño molecular de los amplificadores de la PCR Maestra y de Separación-II. El enumerado de los exones fue actualizado de acuerdo a GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Son presentados solamente los puntos de ruptura de los genes involucrados que mantienen el marco de lectura de transcripción original.

Nota: Puede aparecer un amplificador de la PCR-II con un peso molecular no enlistado en la Tabla 11 como consecuencia de la amplificación de un punto de ruptura o un empalme alternativo que no haya sido publicado todavía.

Nota: La tabla de interpretación ha sido actualizada de acuerdo al Comité de Nomenclatura de Genes HUGO (HGNC). Para una lista de los cambios hechos en los nombres de los genes vea la sección “6. Abreviaciones de genes de acuerdo al HGNC.”

6 ABREVIACIONES DE GENES DE ACUERDO AL HGNC:

El Comité de Nomenclatura de Genes HUGO (HGNC) aprueba un nombre *único y significativo* para cada uno de los genes humanos conocidos. La tabla 12 contiene una lista de todos los genes relevantes para los productos HemaVision, con la abreviatura anterior y su abreviatura del HGNC correspondiente.

Tabla 12

Abreviación vieja	β. Abreviación HGNC	59. Cromosoma	60. ID HGNC
ABL	ABL1	9q34.1	HGNC: 76
AF10	MLLT10	10p12	HGNC: 16063
AF17	MLLT6	17q21	HGNC: 7138
AF1p	EPS15	1p32	HGNC: 3419
AF1q	MLLT11	1q21	HGNC: 16997
AF4	AFF1	4q21.3	HGNC: 7135
AF6	MLLT4	6q27	HGNC: 7137
AF9	MLLT3	9p22	HGNC: 7136
AFX1	FOXO4	Xq13.1	HGNC: 7139
AML1	RUNX1	21q22.3	HGNC: 10471
BCR	BCR	22q11	HGNC: 1014
CAN	NUP214	9q34	HGNC: 8064
CBFβ	CBFB	16q22.1	HGNC: 1539
DEK	DEK	6p23	HGNC: 2768
E2A	TCF3	19p13.3	HGNC: 11633
ELL	ELL	19p13.1	HGNC: 23114
ENL	MLLT1	19p13.3	HGNC: 7134
ERG	ERG	21q22.3	HGNC: 3446
ETO	RUNX1T1	8q22	HGNC: 1535
FUS	FUS	16p11.2	HGNC: 4010
HLF	HLF	17q22	HGNC: 4977
MDS1	EVI1	3q26	HGNC: 3498
MLF1	MLF1	3q25	HGNC: 7125
MLL	MLL	11q23	HGNC: 7132
MN1	MN1	22q12.1	HGNC: 7180
MYH11	MYH11	16p13.11	HGNC: 7569
NPM	NPM1	5q35	HGNC: 7910
PBX1	PBX1	1q23.3	HGNC: 8632
PDGFRβ	PDGFRB	5q31-q32	HGNC: 8804
PLZF	ZBTB16	11q23	HGNC: 12930
PML	PML	15q22	HGNC: 9113
RARα	RARA	17q12	HGNC: 9864
SET	SET	9q34	HGNC: 10760
SIL1	STIL	1p32	HGNC: 10879
Tal1	TAL1	1p32	HGNC: 11556
TEL	ETV6	12p13	HGNC: 3495
TLS	FUS	16p11.2	HGNC: 4010

ANEXO 3

Fecha de inicio: junio 2012 (mes/año)	TRIMESTRE											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ACTIVIDAD												
Obtención de insumos												
Estandarización de técnica												
Revisión y actualización de la literatura												
Inclusión de pacientes												
Toma de muestras												
Análisis de los estudios												
Presentación de resultados												
Elaboración de manuscritos												
Publicación												
OTRAS ACTIVIDADES (ESPECIFICAR)												