



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
LABORATORIO DE GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR

“Diseño de una prueba molecular para la detección de transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *TEL-AML1* en líneas celulares para el diagnóstico en leucemia linfoblástica aguda”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA
PRESENTA:

LILIANA RUTH VALDOVINOS MILLÁN

DIRECTORA: M en C. Mónica Sierra Martínez
Hospital Juárez de México

ASESORA INTERNA: Biól. Reynalda Roldán Pérez



México D.F, ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL
JUÁREZ DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. MÓNICA SIERRA
MARTÍNEZ.**

*No te rindas, aún estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continua el viaje, perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme, aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.*

*Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.*

*Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo...*

(Mario Benedetti).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas desde Iniciación Universitaria, Preparatoria ENP 2, hasta la culminación de mis estudios FES-Zaragoza en la carrera de Biología.

A cada uno de mis profesores que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada, para los retos que pone la vida.

A la **M. en C. Mónica Sierra Martínez**, por brindarme su apoyo, tiempo, paciencia, guía para realizar este trabajo, por sus enseñanzas y por permitirme pertenecer su equipo de trabajo.

Al **Biól. Juan Carlos Bravata Alcántara**, gracias por brindarme tu paciencia, tus conocimientos, gracias por llevarme de la mano para aprender las maravillas de la Biología Molecular, pero sobre todo gracias por tu confianza que me brindaste.

A la **Dra. Carolina Bekker** del Hospital General La Raza del IMSS por brindarme las células requeridas en el presente trabajo. Muchas gracias.

A los miembros del jurado.

Biól Carlos Martínez Montoya
M. en C. Mónica Sierra Martínez
Biól. Reynalda Roldán Pérez
Dra. Elia Roldán Reyes
M. en C. Luis Sánchez Sánchez

Quienes con sus valiosas aportaciones enriquecieron y guiaron, para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a **Renata Zaballa**, porque tú fuiste la razón para dedicarme al área de las leucemias, porque a tu corta edad fuiste mi mejor amiga y me enseñaste el verdadero valor de la vida, me enseñaste que el dolor no existe, que solo es temporal y que la vida es hoy y ahora, gracias mi pequeño angelito por haber marcado mi vida.

A **Dios** por darme salud, fuerza, paciencia, por darme una vida llena de felicidad y aprendizajes, por guiarme para saber quién soy y hacia dónde voy.

A mi **Madre** por su amor incondicional, por sus cuidados, sus consejos, por ser la mejor mujer y mi mayor ejemplo, gracias por todo lo que has hecho por mí, ninguna palabra o acción es comparable para decirte todo lo que eres y significas para mí. Gracias mamá Te amo.

A mi **Padre** por ser el pilar en mi andar, por siempre guiarme y corregirme cuando me he equivocado, gracias por escucharme y ayudarme en cualquier circunstancia de mi vida, gracias por hacer de mí una mejor persona, eres lo máximo. Te amo papá muchas gracias por todo.

A mi compañero de vida **Jorge Ramos**, por siempre apoyarme en cualquier circunstancia, gracias por tu cariño y paciencia, por creer en mí, por crecer y caminar juntos, por ser mi amigo y mi amor, te amo mucho mi yorch.

A mi hermano **Jorge** porque siempre has sido mi motor de vida, por haberme regalado tus mejores años, por ser ahora mi más grande ángel guardián, te amo y te amaré toda mi vida.

A mis hermanas **Yasmin** y **Erendida** por su apoyo incondicional, paciencia y cariño, gracias por estar siempre a mi lado y enseñarme que la vida no es fácil pero tampoco imposible.

A mis sobrinos **Josemaría**, **Antonio** y **Georgina** por alegrarme cada momento que comparto con ustedes, por hacerme sentir que puede existir un mejor mundo, y hacer de mí una gran tía.

A mis primos **Adriana** y **Daniel** por ser más que mis primos, por ser mis hermanos, por tantas risas, aventuras vividas, gracias por su apoyo.

A mis tíos **Daniel** y **Juan** por su apoyo, amor y enseñarme que cuando se quiere se puede, gracias.

A mis amigos de toda la vida **Cavita, Lalo, Ale, Karla J, Carlos, Méndez y Daniel** porque a pesar del tiempo y la distancia siempre han estado a mi lado en los mejores momentos así como en los peores, muchas gracias por su apoyo incondicional.

A mis amigos de la prepa **Karla, Vero, César y Ricardo**, a quienes debo tantas risas y tantos recuerdos que jamás se borrarán, gracias por compartir cada momento bueno y malo, y por permitirme encontrar en ustedes una segunda familia.

A mis Biólogos favoritos **Ara, Kika, Jonathan y Fidel** por todos los momentos tan divertidos, por todos esos partidos de Pumas y todas esas aventuras que solo con ustedes se pudieron vivir, fueron los mejores momentos de mi vida y lo mejor que la biología me pudo regalar, gracias por haber sido parte de ello.

A mis amigos de la Universidad **Paco y Viry** por haber sido parte fundamental de mi formación académica, por haber sido el equipo VAL y por enseñarme que la persistencia y la lucha por tus ideales se antepongan siempre.

A mis compañeros de laboratorio **Erick, Gaby, Ary, Mara, Sadai y Bruno**, por su apoyo, su amistad, sin su compañía esto no hubiera sido lo mismo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	2
LISTA DE CUADROS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Hematopoyesis	8
2.2 Leucemia	12
2.3 Leucemia Linfoblástica Aguda	13
2.3.1 Epidemiología	13
2.3.2 Etiología	14
3. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	15
3.1 Citomorfológica	15
3.2 Inmunofenotípica	16
4. CUADRO CLÍNICO Y DIAGNÓSTICO	17
4.1 Pruebas diagnósticas para leucemia linfoblástica aguda	18
4.2 Factores pronósticos	18
5. ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	19
5.1 Alteraciones cromosómicas numéricas	19
5.2 Alteraciones cromosómicas estructurales	20
5.2.1 Diagnóstico por biología molecular	22
5.2.2 Translocación t(9;22) (q34;q11) o <i>BCR-ABL</i>	22
5.2.3 Translocación t(12;21) (p13;q22) o <i>TEL-AML1</i>	26
5.2.4 Translocación t(1;19) (q23;p13) o <i>E2A-PBX1</i>	28
5.2.5 Translocación t(4;11) (q21;q23) o <i>MLL-AF4</i>	29
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
7. JUSTIFICACIÓN	32
8. HIPÓTESIS	33
9. OBJETIVO	33
9.1 Objetivo general	33
9.2 Objetivos particulares	33
10. MÉTODO	34
10.1 Muestras clínicas	34
10.1.2 Criterios de inclusión	34

10.1.3 Criterios de exclusión	35
10.2 Líneas celulares	35
10.3 Extracción de ácidos nucleicos (RNA)	36
10.4 Evaluación de la concentración del RNA	37
10.5 Integridad del RNA	37
10.6 Síntesis del cDNA	38
10.7 PCR punto final	39
10.7.1 Búsqueda de iniciadores	39
10.7.2 Especificidad de iniciadores	39
10.7.3 PCR punto final para el gen constitutivo <i>ABL</i>	39
10.7.4 PCR punto final para las líneas celulares	40
10.7.5 Diagrama general de trabajo	42
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
11.1 Búsqueda y verificación de iniciadores, para la detección de los transcritos quiméricos en líneas celulares y en muestras de pacientes leucémicos	43
11.2 Estandarización de las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa, para la detección de los transcritos quiméricos en líneas celulares leucémicas	44
11.3 Verificación del cDNA mediante la amplificación del gen constitutivo <i>ABL</i>	47
11.4 Verificación de la metodología en muestras de pacientes diagnosticados con LLA	51
11.5 Características clínicas de los pacientes	56
12. CONCLUSIONES	60
13. REFERENCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Jerarquía de las células hematopoyéticas.
- Figura 2. Microambiente hematopoyético.
- Figura 3. Incidencia y mortalidad en México por leucemia.
- Figura 4. Translocación *BCR-ABL* t(9;22)(q34;q11).
- Figura 5. Gen *ABL* y *BCR* de manera normal.
- Figura 6. Se muestra el punto de ruptura de los genes *TEL* y *AML1* de la translocación *TEL-AML1*.
- Figura 7. Se muestra los puntos de ruptura de los genes *MLL* y *AF4* de la translocación *MLL-AF4*.
- Figura 8. Estandarización con serie de diluciones para la línea celular 697.
- Figura 9. PCR punto final de líneas celulares.
- Figura 10. Detección del gen constitutivo *ABL* en muestras de pacientes con LLA.
- Figura 11. Detección del gen constitutivo *ABL* en muestras de pacientes con LLA.
- Figura 12. Detección del transcrito quimérico *BCR-ABL menor* en pacientes con LLA.
- Figura 13. Detección del transcrito quimérico *TEL-AML1* en pacientes con LLA.
- Figura 14. Detección del transcrito quimérico *E2A-PBX1* en pacientes con LLA.
- Figura 15. Detección del transcrito quimérico *MLL-AF4* en pacientes con LLA.
- Figura 16. Diagrama de pastel representando en porcentaje la prevalencia en hombres y mujeres con LLA.

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CLP	Progenitores Linfoides Comunes
CMP	Progenitores Mieloides Comunes
CO ₂	Dióxido de carbono
CPH	Célula Progenitora Hematopoyética
CTH	Célula Troncal Hematopoyética
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleósido Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETS	Dominio de Transactivación
FAB	Franco Americano Británico
FISH	Hibridación fluorescente in situ
GMP	Progenitores Granulocitos Macrófagos
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HLH	Hélice-asa-hélice
IMDM	Medio Dulbecco Modificado por Iscove
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
L	litro
LDH	Deshidrogenasa láctica
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de linaje B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de linaje T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LT-HSCs	Células troncales reconstituyentes a largo plazo
M-bcr	<i>BCR</i> punto de rompimiento mayor
m-bcr	<i>BCR</i> punto de rompimiento menor
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MEP	Progenitores Megacariocitos Eritrocitos
ml	mililitro
mM	milimolar
MPP	Progenitores Multipotentes
ng	nanogramos
nm	nanómetros
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ph+	Cromosoma Filadelfia positivo
Pre-B	Precursores B

Pre-T	Precursores T
OMS	Organización Mundial de la Salud
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SFB	Suero Fetal Bovino
SMD	Síndrome Mielodisplásico
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Secretaría de Salud
ST-HSCs	Células troncales reconstituyentes acorto plazo
UV	Radiación Ultravioleta
WBC	Cuenta de leucocitos al diagnóstico
μl	microlitro
μg	microgramos

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Clasificación morfológica según la FAB de la leucemia linfoblástica aguda.
- Cuadro 2. Alteraciones estructurales en la leucemia linfoblástica aguda.
- Cuadro 3. Características de las líneas celulares que se utilizarán en el presente trabajo.
- Cuadro 4. Master mix para síntesis de cDNA (kit Promega®).
- Cuadro 5. Condiciones del termociclador Nyx Technik® para PCR.
- Cuadro 6. Master mix para PCR de gen constitutivo *ABL* (kit Roche®).
- Cuadro 7. Condiciones del termociclador Nyx Technik® para PCR del gen constitutivo *ABL*.
- Cuadro 8. Condiciones para la detección de transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1* en líneas celulares.
- Cuadro 9. Secuencia de oligonucleótidos para la identificación de transcritos quiméricos.
- Cuadro 10. Cuantificación de RNA (ng/μl) de las líneas celulares y concentración de pureza.
- Cuadro 11. Cuantificación de RNA (ng/μl) y concentración de pureza de las muestras de pacientes con LLA.
- Cuadro 12. Características clínicas generales de los pacientes con LLA.
- Cuadro 13. Estudio citogenético y molecular de los pacientes con LLA.

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el resultado de la transformación neoplásica de células troncales hematopoyéticas de la estirpe linfoide. En los últimos años, los esquemas de tratamiento se han actualizado de acuerdo al avance del conocimiento de la biología celular, molecular y bioquímica de la leucemia; sin embargo, la mortalidad sigue siendo muy elevada.

En el servicio de Hematología del Hospital Juárez de México se atienden anualmente alrededor de 30 pacientes adultos con LLA, esto debido a su baja frecuencia en población adulta. La identificación de transcritos quiméricos por medio de PCR es una guía para el manejo de los pacientes ya que en algunas veces el cariotipo falla o no hay suficientes células en división que nos permita dar un diagnóstico y pronóstico al paciente.

El propósito de este trabajo fue desarrollar una metodología molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los cuatro transcritos quiméricos más frecuentes (*BCR-ABL*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX1* y *MLL-AF4*). Esto con la finalidad de otorgar un beneficio al paciente, aportar un elemento diagnóstico y dar un pronóstico de bajo costo.

Se estandarizó la metodología a partir de líneas celulares, posteriormente se procedió a analizar 19 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LLA, para detectar las cuatro translocaciones más frecuentes en población mexicana. Se logró identificar 2 casos positivos para *BCR-ABL menor* y uno para *MLL-AF4*, los cuales no fueron detectados por citogenética convencional, lo que se concluye que esta técnica es útil para la detección de estos transcritos quiméricos.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the result of neoplastic transformation of hematopoietic stem cells from the lymphoid lineage. In recent years, the treatment schemes have been updated according to the advancement of knowledge of the cellular, molecular biology and biochemistry of leukemia; however, mortality remains very high.

In the Hematology service of the Hospital Juárez de México occurs annually about 30 adult patients with ALL, this due to their low frequency in adult population. The identification of chimeric transcripts by PCR is a guide for the management of patients because sometimes the karyotype fails or there are insufficient dividing cells that allow us to give a diagnosis and prognosis to the patient.

The purpose of this work was to develop a molecular methodology based on the reaction of the polymerase chain (PCR) for detection of the four most common chimeric transcripts (BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1 and MLL-AF4), This in order to provide a benefit to the patient, make a diagnosis and give a low cost prognosis.

Methodology was standardized from cell lines, then proceeded to analyze 19 peripheral blood samples of patients diagnosed with ALL, to detect the four most frequent translocations in Mexican population. It was possible to identify two positive cases for BCR-ABL minor and one for MLL-AF4, which were not detected by conventional cytogenetics, which concludes that this technique is useful for the detection of these chimeric transcripts.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas, que se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica (Stone y col., 2004). Las leucemias se dividen en dos grupos dependiendo de la severidad, en crónicas y agudas. Éstas a su vez se subdividen en linfoides y mieloides, dependiendo del progenitor que se derive (Mayani y col., 2009). Las leucemias agudas se caracterizan por su evolución rápida y por la acumulación de células blásticas (Fajardo y col., 2007), la cual puede ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética. Dentro de las leucemias agudas, las linfoblásticas son cuatro veces más comunes que las de estirpe mieloide (Labardini, 2006).

La leucemia representa el 3.4% por causa de muerte en hombres y mujeres a nivel mundial (INEGI, 2008). En México está reportado que las leucemias linfoides están dentro de las 13 primeras causas de mortalidad, con una tasa de 3.8 por cada 100,000 habitantes (Globocan, 2012).

Las leucemias linfoides se diagnostican mediante el análisis citogenético, que permite identificar alteraciones cromosómicas recurrentes con valor pronóstico independiente y de gran valor en la decisión terapéutica (Raimondi y col., 1993). Las alteraciones estructurales se detectan en más del 60% de los casos y se trata de alteraciones primarias que afectan a regiones cromosómicas donde, la mayoría de los casos se localizan en oncogenes o genes supresores de tumores (Martin y col., 2001).

Las translocaciones asociadas a subtipos morfológicos y fenotípicos de las leucemias, son los eventos importantes en la patogénesis de la enfermedad, produciendo transcritos quiméricos que pueden modificar el ciclo celular (Rowley, 1998; Alcalay y col., 2001). Éstos transcritos se pueden identificar mediante pruebas de biología molecular, a través de su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(Wong, 2005). Por lo que es necesario desarrollar una prueba diagnóstica para la detección de transcritos quiméricos de manera eficaz, rápida y de bajo costo lo cual aporta un elemento diagnóstico y pronóstico al paciente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 HEMATOPOTESIS

Diariamente se producen en nuestro organismo grandes cantidades de células sanguíneas tales como eritrocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos, células dendríticas y linfocitos, que cumplen diversas funciones (Wintrobe, 1981), como el transporte de oxígeno, la participación en la coagulación y la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos (Zambrano y col., 1999). Estas células sanguíneas mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones y Wickramasingh, 1991), siendo su número restituido por la formación de nuevas células sanguíneas mediante un proceso denominado hematopoyesis (Orkin, 1995; Oberlin y col., 2010), que ocurre bajo condiciones muy específicas en el interior de los huesos planos de la médula ósea (Oberlin y col., 2010; Mayani y col., 2007).

Este proceso se inicia desde la embriogénesis en el saco vitelino, hígado, bazo y continúa durante la vida adulta en la médula ósea (Zambrano y col., 1999). Durante la etapa adulta del individuo se incrementa el número de células adiposas en ciertas regiones de la médula, por lo que el proceso queda restringido fundamentalmente en la epífisis de los huesos largos (fémur y húmero), así como en los huesos pélvicos, columna vertebral, cráneo y esternón (Hughes y Wickramasingh, 1991; Bellantuono, 2004).

Se sabe que la hematopoyesis es un proceso jerárquico (Figura 1) en el que células primitivas dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético, por lo cual es posible distinguir de manera funcional cuatro compartimientos hematopoyéticos: troncal, progenitor, precursor y maduro (Mayani, y col., 2007; Bellantuono, 2004).

El compartimiento troncal, célula troncal hematopoyética (CTH) corresponde al 0.05% del total de las células en la médula ósea, se concentran principalmente en el estroma y son células que tiene capacidad de auto-renovación. Sin embargo, a pesar de ser tan escasas son capaces de dar origen a todas las células sanguíneas durante la vida del individuo.

Estas células carecen de características morfológicas y citoquímicas propias de las células maduras o comprometidas hacia un linaje celular (Orlic y Bodine, 1994). Se estima que a partir de una sola CTH se pueden producir 10^{13} células maduras *in vivo* y 35×10^6 *in vitro* (Metcalf, 2001). En condiciones normales las células troncales hematopoyéticas (CTH) se encuentran en la fase G0 del ciclo celular (quiescentes) y se dividen solo para mantener el estado normal de la hematopoyesis o la demanda de progenitores en el organismo (Ogawa y Matzunaga, 1999; Kaufman y col., 2001; Abkowitz y col., 2002).

El compartimiento progenitor, células progenitoras hematopoyéticas (CPH) constituye el 0.15% de las células de la médula ósea (Mayani, 2003), las células progenitoras pierden su capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad, pero adquieren la suficiente capacidad proliferativa para generar gran cantidad de células sanguíneas maduras. Estas células progenitoras al diversificarse, dan lugar a células precursoras (tercer compartimiento) reconocibles por su morfología, las cuales corresponden a más del 99.5% de las células presentes en la médula ósea. En las etapas finales, las células sufren una especialización promovida por las fases de diferenciación. En estas etapas, los distintos precursores tienen una notable o total disminución en su capacidad proliferativa (Bondurant y Koury, 1999).

Finalmente, el compartimiento maduro representa el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos (Montesinos y Mayani, 2002) presentes mayoritariamente en torrente sanguíneo. Este compartimiento contiene varios tipos de células completamente distintas en apariencia y con funciones específicas (Munker, 2000). Estas células son: eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas (Mayani y col., 2007).

CASCADA HEMATOPOYÉTICA

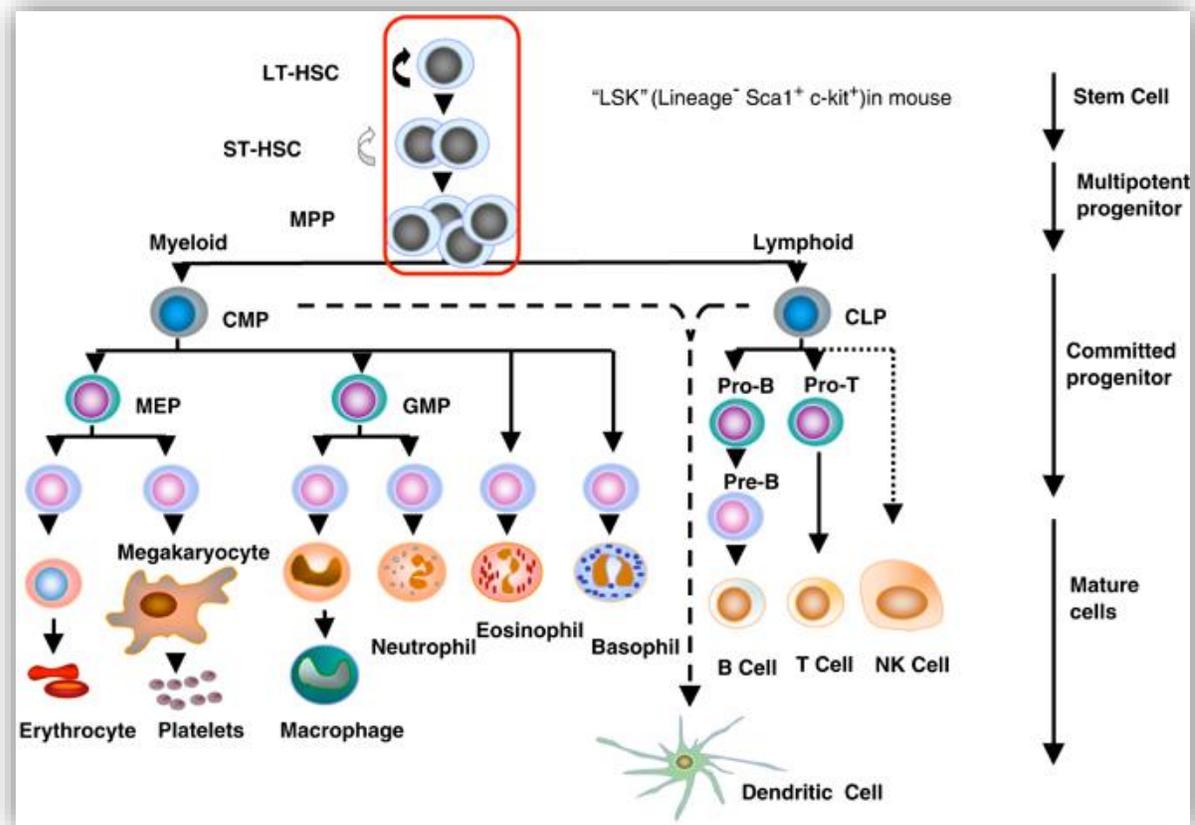


Figura 1. Jerarquía de las células hematopoyéticas. LT-HSCs, células troncales reconstituyentes a largo plazo; ST-HSCs, células troncales reconstituyentes a corto plazo; MPP, progenitores multipotentes; CMP, progenitores mieloides comunes; CLP, progenitores linfocitos comunes; MEP, progenitores megacariocitos-eritrocitos; GMP, progenitores granulocitos-macrófagos. Tomado y modificado de Larsson y Karlsson, 2005.

La hematopoyesis se desarrolla en un ambiente denominado microambiente hematopoyético (Figura 2), el cual consiste en una estructura tridimensional compuesta por diferentes tipos celulares (células del estroma) y por sus productos (matriz extracelular, citocinas, colágena, etc.) los cuales, en conjunto regulan la localización, proliferación y diferenciación (Yin y col., 2006) de los distintos tipos de células sanguíneas maduras (Zambrano y col., 1999, Mayani y col., 2007).

La localización exacta de las CTH dentro de la médula ósea no es azarosa. La mayoría de estas células se localizan dentro de una región denominada endosteal, mientras que los progenitores comprometidos hacia un linaje determinado y las células maduras se distribuyen lejos de esta región, predominantemente en la región central de la médula ósea, cerca de los vasos sanguíneos (Mayani y col., 2009).

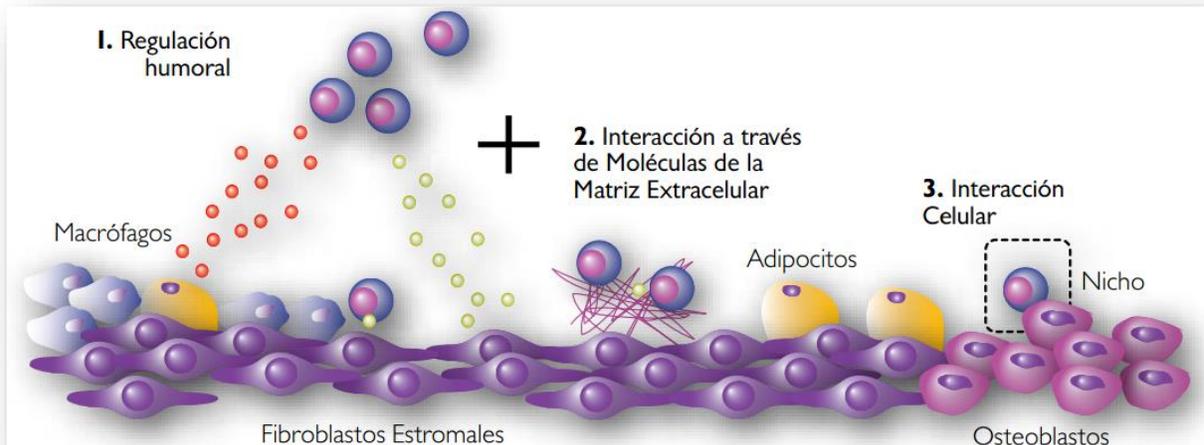


Figura 2. Microambiente hematopoyético. Esquema representativo de los diferentes tipos celulares que integran el microambiente hematopoyético y los mecanismos de regulación de la hematopoyesis. Tomado de Mayani y col., 2007.

El proceso de la hematopoyesis es muy dinámico, siendo un gran número de genes responsables de controlar los mecanismos de proliferación, diferenciación o la supervivencia celular. Mutaciones en uno o más de dichos genes pueden conferirles a las células hematopoyéticas una desregulación en la producción de células sanguíneas, lo que puede desembocar en un proceso neoplásico maligno, que generalmente es conocido como leucemia (Ryan y col., 2001), representando una de las primeras causas de muerte por cáncer en México (INEGI, 2009).

2.2 LEUCEMIA

La leucemia es un tipo de cáncer de la sangre iniciado por la mutación de una célula hematopoyética del compartimiento troncal. La progenie clonal de esta célula mutada, constituye una población heterogénea en la cual la proliferación y diferenciación desregulada, induce una acumulación de células blásticas no funcionales (Stone y col., 2004), que eventualmente sustituyen al tejido hematopoyético normal, ocasionando un descenso a la producción de células normales en médula ósea (Gutiérrez y col., 2007; Golub y col., 1998).

Su ontogenia de la leucemia se desarrolla como consecuencia de una serie de cambios genéticos mediante las cuales, las células normales adquieren una sucesión de capacidades distintivas, como son: inestabilidad a señales inhibitorias de la proliferación, evasión de la apoptosis, autosuficiencia de señales de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, invasión de tejidos, angiogénesis y metástasis, lo que les permiten convertirse en tumorales y malignas (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las leucemias se dividen en dos grupos dependiendo la severidad, en crónicas y agudas. Éstas a su vez se subdividen en linfoides y mieloides, dependiendo del progenitor que se derive (Mayani y col., 2009).

Las leucemias crónicas se caracterizan por su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Dichas células interfieren en la producción de linfocitos y granulocitos que presentan características morfológicas similares a células maduras, pero no son funcionales, esta neoplasia es frecuente en personas mayores a 50 años (Kantarjian y col., 1988).

Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la acumulación de células blásticas (Fajardo y col. 2007), la cual puede ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética, o bien de sus descendientes. Dichas mutaciones pueden influir en la activación de protooncogenes que muchas veces van acompañados de la inactivación de uno o varios genes supresores.

Dentro de las leucemias agudas, las linfoblásticas son cuatro veces más comunes que las de estirpe mieloide (Labardini, 2006).

2.3 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por la proliferación y acumulación de células linfoides inmaduras que están presentes en grandes números en la médula ósea, en el timo y los ganglios linfáticos (Pui y Relling, 2004).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la presencia de 20% de blastos en médula ósea corresponde a una LLA, estas se clasifican de acuerdo al inmunofenotipo que muestran. Por medio del inmunofenotipo se clasifican en leucemias de linaje B, en un 85% y de linaje T, en un 15 % (Pui y col., 2010). De acuerdo a los antígenos que expresan en su membrana, las leucemias linfoides de linaje B (LLA-B) se subclasifican en pro-B, B común, pre-B y B madura, las leucemias linfoides del linaje T (LLA-T) se subclasifican en pro-T y T madura (Ruiz y col., 2006).

2.3.1 Epidemiología

De acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA) y del INEGI en el 2008, se reporta que el egreso hospitalario por cáncer; principalmente de leucemia representa un 8.7%, afectando principalmente a los hombres en un 15.1%, mientras que a las mujeres en un 5.6%.

En México está reportado que las leucemias linfoides están dentro de las 13 primeras causas de mortalidad (Figura 3) con una tasa de 3.8 por cada 100,000 habitantes (Globocan, 2012). Se presenta principalmente en niños entre 2 a 5 años de edad, obteniendo de un 70 a un 80% de supervivencia libre de enfermedad (SLE). En los adultos ocurren en menor proporción siendo de un 20 a 40 % de SLE (Bassan, 2005).

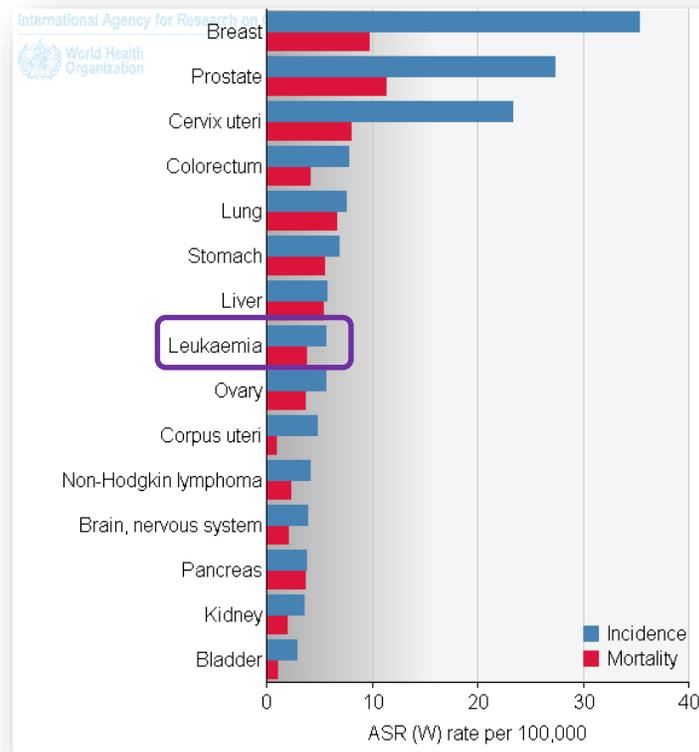


Figura 3. Incidencia y mortalidad en México por leucemia. Ocupando el treceavo lugar en mortalidad. Tomado de Globocan, 2012.

2.3.2 Etiología

El origen de la LLA no está bien determinado; sin embargo, se han asociado diversos factores genéticos y ambientales que han desarrollado este tipo de neoplasia:

Factores genéticos: Tales como algunos síndromes que se asocian con leucemia, específicamente el síndrome de Down, el cual está presente en el 2% de todos los casos de LLA pediátrica (Fong y Brodeur, 1987). Los pacientes con síndrome de Klinefelter y los portadores de algunas translocaciones balanceadas (Shaw y col., 1992). Así mismo, se han descrito numerosos casos de familias con dos o más miembros, con parentesco de primer y segundo grado, con leucemias (Ross y col., 1994).

En estudios epidemiológicos de pacientes con leucemia entre el 5-10% han tenido familiares con antecedentes de enfermedades pre neoplásicas hematológicas y de

leucemias, mientras que en la población sana solo es del 1-2% presentan familiares con dichos antecedentes. En los casos familiares hay mayor prevalencia de anomalías cromosómicas adquiridas en los blastos leucémicos, siendo más frecuentes en determinados subtipos morfológicos (Sandler y Ross, 1997).

Factores ambientales que incrementan el riesgo de desarrollar leucemia tales como radiaciones en desastres atómicos (Caldwell y col., 1980), agentes químicos como el benceno (London y col., 1991), campos electromagnéticos (Rinsky y col., 1987) y a la radioterapia.

3. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA INFOBLÁSTICA AGUDA

3.1 Citomorfológica

A partir de la década de los setenta, la leucemia aguda y los síndromes mielodisplásicos (SMD) se han definido y clasificado de acuerdo con las recomendaciones del grupo Franco-Americano-Británico (FAB), clasificándolas con respecto a las características morfológicas de las células individuales y al grado de heterogeneidad de la población leucémica (Heim y Mitelman, 1995). Dentro de éstas se distinguen tres subgrupos: L1, L2, L3 definidas de acuerdo a patrones morfológicos (Cuadro 1) como el tamaño celular, el patrón de la cromatina nuclear, la morfología nuclear, la presencia de nucléolos, la cantidad de citoplasma y el grado de basofilia citoplasmática.

La distribución de los subtipos: L1, L2 y L3 en niños es del 85%, 14% y 1% respectivamente, mientras que en adultos el subtipo más común es la L2 y la proporción L1, L2 y L3 es del 31%, 60% y 9%, respectivamente (Heim y Mitelman, 1995).

Cuadro 1. Clasificación morfológica según la FAB de la LLA

L1 Población de linfoblastos relativamente homogénea con células pequeñas con citoplasma escaso, cromatina nuclear heterogénea, núcleo regular, con o sin nucléolo.

L2 Muestra células grandes, con mayor heterogeneidad en cuanto a tamaño y a la distribución de la cromatina nuclear con respecto a las L1; la forma del núcleo es irregular y puede presentar uno o dos nucléolos.

L3 Con células grandes y homogéneas, con cromatina nuclear finamente punteada, núcleo regular, prominente y citoplasma vacuolado.

Tomado de Wang y col., 1998.

3.2 Inmunofenotípica

La clasificación inmunofenotípica de las LLA se basa en la presencia de los antígenos B o T y en la maduración de las células leucémicas. La estirpe celular B se caracteriza por la presencia de rearrreglos en los genes de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, en contraste, en la estirpe T se detectan los rearrreglos en los genes receptores de las células T.

Las LLA se clasifican en cuatro tipos:

1. Estirpe de células B: es el subtipo más frecuente, se presenta en el 60% al 75% de los pacientes adultos. La estirpe-B se subdividen de acuerdo en el estado de maduración que presentan los blastos leucémicos en:
 - Pre-pre B
 - Pre-B temprana o con el antígeno común asociado a la LLA (CD10⁺)
 - Pre-B

- B-madura

En la LLA pre-B temprana se identifica el antígeno CD10⁺ este inmunofenotipo es más frecuente en niños y se asocia con una mejor evolución; sin embargo, en adultos este marcador es poco común, lo cual se ha asociado con la alta frecuencia de la translocación t(9;22) que confiere pronóstico adverso (San y Duque, 1996).

2. Estirpe de células T: Se presentan en el 25% al 30% de los adultos, se divide en.
 - Timocitos tempranos
 - Timocitos intermedios
 - Timocitos tardíos
 - Timocitos maduros
3. Estirpe nula: las células no expresan antígenos T o B y se presenta sólo en el 10% de los pacientes adultos. Se ha reportado que alcanza la remisión hasta el 75% de los casos.
4. Estirpe bifenotípica: Coexpresa antígenos asociados a la estirpe linfoide y mieloide, se presenta en el 2% al 3% de los casos y tienen un pronóstico desfavorable (Maver y col., 1982; Copelan y McGuire, 1995; San y Duque, 1996).

4. CUADRO CLÍNICO Y DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leucemia, se basa fundamentalmente en el cuadro clínico, exámenes de laboratorio, aspirado de médula ósea e Inmunofenotipo (Margolin y col., 2001). Clínicamente los síntomas y signos que presentan los pacientes con leucemia son variados; entre ellos, son comunes la insuficiencia medular evidencia por leucopenia, invasión de células blásticas a órganos extramedulares, coagulopatías, leucocitosis, leucostasis. Trastornos metabólicos relacionados con la proliferación, entre otros (Giménez, 1986).

Cuando coexiste infiltración a los diferentes órganos y tejidos se observa crecimiento en los mismos. Esta infiltración en ganglios linfáticos se le conoce como linfadenopatía, la cual se encuentra presente en el 50% de los casos pediátricos y en el 80% de los adultos;

en hígado como hepatomegalia y en el bazo como esplenomegalia, que se observa en el 65 y 75% de los niños y adultos, respectivamente (Bleyer, 1988; Cortés y Kantarjian, 1995).

4.1 Pruebas diagnósticas para detectar LLA

Para poder diagnosticar la LLA se comienza por realizar una biometría hemática completa que ayuda a analizar los niveles de hemoglobina, las cifras de plaquetas, reticulocitos y leucocitos (Rivera, 1994).

Posteriormente se realiza un análisis morfológico mediante un frotis de médula ósea y tinciones especiales (Wright, PAS, mieloperoxidasas), las células se observan a través de un microscopio para así ser clasificada por morfología según la FAB. El diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, requiere de la presencia de un porcentaje mayor o igual al 20% de blástos en el frotis de aspirado de médula ósea (Pui y col., 1995, Pui y Evans, 1998).

El diagnóstico es complementado con la realización de inmunofenotipo mediante citometría de flujo para determinar su origen como T o B y su grado de maduración (Benne y col., 1995). Además se requiere de la evaluación de anomalías citogenéticas y moleculares, fundamentales para la evaluación de la enfermedad, estratificación de riesgo y la planificación de tratamiento (Borowitz y Chan, 2008).

La presencia de alteraciones genéticas recurrentes debe ser evaluada mediante un cariotipo de bandas-GTG (citogenética convencional), debido a que proporciona datos sobre el diagnóstico, pronóstico y asesoramiento terapéutico. Desafortunadamente existen limitaciones para obtener un cariotipo, ya que en la mayoría de los casos se obtiene material inadecuado o se llega a presentar fallas en el cariotipo. (Borowitz y Chan, 2008).

4.2 Factores pronósticos

La LLA comprende varios subgrupos con influencia pronóstica, basados en algunas características como son: la edad, cuenta de leucocitos (WBC) al diagnóstico, infiltración al

SNC, masa mediastinal, organomegalia, respuesta al tratamiento y falla a la inducción a la remisión (O'Brien y Lacayo, 2008; Pieters y Carroll, 2008; Dördelmann y col., 1999; Quintero, 1999). Los avances obtenidos en los últimos años con relación a la inmunología, la citogenética y la biología molecular han permitido la detección de los cambios genéticos asociados. Con esto se ha logrado definir con mayor precisión distintos grupos de riesgo considerándolos un factor pronóstico independiente (Pieters y Carroll, 2008; Dördelmann y col., 1999; Quintero, 1999).

5. ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Los cambios genéticos en las células leucémicas han sido identificados por análisis citogenético, ya que contribuye al conocimiento de las características genéticas de la LLA, identificando alteraciones cromosómicas recurrentes con valor pronóstico independiente y de gran valor en la decisión terapéutica (Raimondi y col., 1993). Las alteraciones citogenéticas encontradas en la leucemia proporcionan marcadores, que son utilizados en el seguimiento del paciente y en la evolución de la estirpe celular anormal durante el curso de la enfermedad. Por otra parte, la descripción de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales en la LLA ha permitido conocer la importancia clínica de dichas alteraciones y caracterizar molecularmente muchas de ellas, identificando los genes implicados (Raimondi y col., 1993).

5.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NÚMERICAS

Se ha reportado que entre el 60 y 75% de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas numéricas. Una de ellas es la hiperdiploidía que se caracteriza por la presencia de más de 50 cromosomas, lo cual se asocia a un mejor pronóstico. En contraste, las hipodiploidias se caracterizan por tener menos de 44 cromosomas y se relacionan con un pobre pronóstico (Martin y col., 2001).

El Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2013) ha definido al número de cromosomas que están presentes en células malignas (ploidía). Los pacientes con LLA se clasifican de acuerdo al grupo de ploidía en: 1) diploidía (46 cromosomas), 2)

hipodiploidía (<46 cromosomas), 3) pseudodiploidía (46 cromosomas con alteraciones estructurales y numéricas), 4) hiperdiploidía alta (>50 cromosomas), 5) hiperdiploidía baja (47-50 cromosomas) y los cercanos a la triploidía y tetraploidía (68-92 cromosomas).

Los cambios citogenéticos más observados en la LLA que son de utilidad diagnóstica y pronóstica, son aquellos que involucran translocaciones que afectan a los protooncogenes y sus factores de transcripción, que son de importancia clínica (Raimondi y col., 1993).

5.2 ALTERACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES

Las alteraciones cromosómicas estructurales se detectan en más del 60% de los casos en leucemia. Se trata de alteraciones primarias que afectan a regiones cromosómicas; donde la mayoría de los casos se localizan en oncogenes o genes supresores de tumores (Marti y col., 2001).

Muchas anormalidades cromosómicas, especialmente las translocaciones o inversiones están asociadas a subtipos morfológicos y fenotípicos de leucemias y linfomas. Estos son eventos importantes en la patogénesis de la enfermedad produciendo proteínas oncogénicas (Rowley, 1998; Alcalay y col., 2001). Las alteraciones estructurales (Cuadro 2) más frecuentes en pacientes con LLA son las translocaciones como: t(12;21)(p12;q22) (*TEL-AML1*), t(1;19)(q23;p13) (*E2A-PBX1*), t(4;11)(q21;q23) (*MLL-AF4*) y t(9;22)(q34;q11) (*BCR-ABL*), (Sawyers, 1997).

La identificación y clonación de estas translocaciones han tenido un gran impacto en el conocimiento de la biología molecular de la enfermedad y han permitido identificar los genes y las proteínas involucradas en la patogénesis de dicha enfermedad, así como la implicación clínica de cada una de las translocaciones (Rowley, 1998).

Muchas de estas proteínas son factores de transcripción que están involucrados en el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las células y algunos de ellos juegan un papel crítico en la hematopoyesis normal como proteínas específicas de linaje (Alcalay y col., 2001).

Cuadro 2. Alteraciones estructurales en la leucemia linfoblástica aguda.

Alteraciones citogenéticas	Genes asociados	Tipo celular asociado	Niños		Adultos	
			Frecuencia (%)	Resultado clínico	Frecuencia (%)	Resultado clínico
Hiperploidía	-----		23-30	Favorable	7-8	Favorable Intermedio
Hipodiploidía	-----		6	Favorable Intermedio	7-8	Adversa
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)</i>	Pre-B	22-26	Favorable	0-4	No determinada
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	Pre- B común	1-3	Adversa	11-29	Adversa
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AFF1(AF4)</i>	Pro-B	1-2	Adversa	4-9	Adversa
t(1;19)(q23;p13.3)	<i>E2A-PBX1</i>	Pre-B común	1-6	Favorable Intermedio	1-3	Favorable
Cariotipo normal			31-42	Relativamente favorable	15-34	Relativamente favorable

Frecuencia y significado pronóstico en niños y adultos. Tomado y modificado de Mrózek y col., 2009.

5.2.1 Diagnóstico por biología molecular

Por biología molecular se han reportado genes de fusión involucrados en estas alteraciones que pueden ser detectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además permite una mayor sensibilidad y especificidad para su identificación, ya que no son visibles por técnicas usuales, siendo esencial el análisis molecular para la detección y monitorización de la enfermedad (Rubnitz y Look, 1998; Nyvold y col., 2002; Mullighan y col., 2005), ya que permite identificar una célula leucémica entre 10^{-4} a 10^{-6} células normales (Van y col., 1999).

5.2.2 Translocación $t(9;22)(q34;q11)$ o *BCR-ABL*

La translocación (9;22) o Ph⁺ se presenta del 25 al 30% de los casos de LLA en adultos, esta translocación (Figura 4) se forma por el intercambio recíproco del DNA entre los brazos largos del cromosoma 9 (*ABL*) en la región q34 y el cromosoma 22 (*BCR*) en la región q11 (Rubnitz y Look, 1998; Ottmann y Wassmann, 2005).

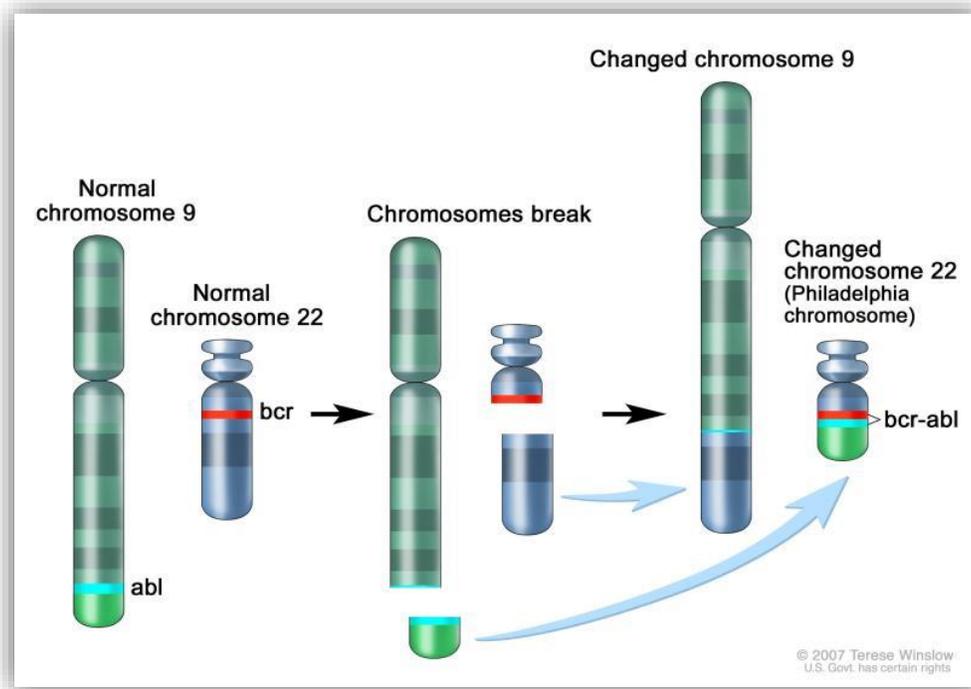


Figura 4. Translocación *BCR-ABL* $t(9;22)(q34;q11)$. El gen quimérico *BCR-ABL* se forma por el intercambio recíproco del entre los brazos largos del cromosoma 9 (*ABL*) y el cromosoma 22 (*BCR*), denominado como cromosoma Filadelfia. Tomado de National Cancer Institute, 2011.

Esta translocación determina la fusión de los genes *BCR* y *ABL* denominado como cromosoma Filadelfia (Ph+) (Saffroy y col., 2000). Este transcrito quimérico codifica para una proteína, la cual aumenta la actividad tirosina cinasa dando lugar a una estimulación anormal de la proliferación celular (Pieters y Carroll, 2008).

El mecanismo por el cual la fusión anormal de genes, tales como *BCR-ABL*, puede dar origen a diferentes leucemias. Esto se atribuye a la función de estos genes en el desarrollo y función de las células de las líneas mieloides y linfoides, así como a la codificación de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, señales de traducción, genes receptores de inmunoglobulinas y genes receptores de las células T (Rabbitts, 1994; Look 1997).

El gen *ABL* (Figura 5) está ubicado en el cromosoma 9, tiene su extremo 5' orientado hacia el centrómero, consta de 13 exones que codifica para una proteína tirosina cinasa de 145 KDa (p145^{ABL}). Presenta dos isoformas (Ia y Ib) producidas por splicing alternativo (corte de intrones y empalme de exones) del primer exón, es en este sitio donde se lleva a cabo el rompimiento de la fusión con el gen *BCR* (Deininger y col., 2000).

Este gen *ABL* está constituido por tres dominios (SH1, SH2 y SH3), que se localizan en el amino terminal. El dominio SH1 tiene la función de tirosina cinasa, y los dominios SH2 y SH3 interactúan con otras proteínas (Deininger y col., 2000). Recientemente se ha reportado que estos sitios tienen interacciones intra e intermoleculares que inhiben la conformación y reclutan varias proteínas que inhiben la actividad de *ABL* (Wang, 2000).

Se ha reportado diversas funciones al gen *ABL*, entre las que destacan la regulación del ciclo celular (McWhirter y Wang 1993; Kipreos y Wang, 1994; Sawyers y col., 1994, Deininger y col., 2000). Se ha sugerido que este gen sirve como complejo de modulación de señales intra y extramedulares que inducen a la célula a tomar la decisión de seguir el ciclo celular o sufrir apoptosis (Lewis y Schwartz, 1998).

El gen *BCR* está constituido por 23 exones que codifican para dos proteínas una de 160 KDa (p160^{c-BCR}) y otra de 130 KDa. Presenta tres sitios de rompimiento que darán origen a

tres proteínas quiméricas de diferente peso molecular (Figura 5). *BCR* de manera normal se localiza en el citoplasma y núcleo, en el núcleo está asociada al DNA condensado en la metafase e interfase (Wetzler y col., 1995). El primer exón del gen *BCR* es esencial para la oncogénesis debido a que tiene actividad de Treonina/serina. Además interactúa con proteínas G, estas proteínas son esenciales en la señalización intracelular, la organización del citoesqueleto, el crecimiento celular y el desarrollo (Diekmann y col., 1991).

EL gen *BCR* también tiene la actividad de GTPasa y de intercambiadora de nucleótidos de guanina (Diekmann y col., 1991). A través de la translocación t(9;22) se pueden formar varias proteínas quiméricas, dependiendo del punto de rompimiento que se encuentre involucrado (Faderl, 1998).

En la leucemia mieloide crónica (LMC) los puntos de ruptura en el cromosoma 22 ocurren dentro del gen *BCR*, en una pequeña región del DNA que abarca 5.6 Kb, el cual se le ha denominado punto de ruptura mayor (M-bcr). Este se produce por la translocación del exón a2 del gen *ABL* y los exones 13 o 14 (b2 o b3) del gen *BCR*, lo cual origina un mRNA con unión b2a2 o b3a2, que producirá una proteína de 210 KDa llamada p210^{*BCR-ABL*} (Mrózek y col., 2004; Faderl y col., 1998).

En algunas leucemias agudas Ph⁺ se puede localizar otro punto de ruptura del cromosoma 22, que se encuentra en una región de 10.8 Kb denominada punto de ruptura menor (m-bcr), el gen *BCR* se rompe entre el exón 1 y 2 (e1-e2) y el gen *ABL* en el exón 1 y 2 (1a y a2), produciendo un transcrito e1a2, que genera una proteína de 190 KDa llamada p190^{*BCR-ABL*}. Estas proteínas poseen una actividad tirosina cinasa mucho mayor que la proteína normal de 145 KDa correspondiente al gen *ABL* y que les confiere su propiedad leucemogénica (Cannistra, 1990; Shtivelman y col., 1985). Entre el 50 y 70% de los pacientes adultos y el 90% de los niños con LLA presentan este punto de ruptura (Secker y Craig, 1993; Mrózek y col., 2004; Bose y col., 1998).

En el transcrito quimérico *BCR-ABL* tanto la proteína p210^{*BCR-ABL*} y la proteína 190^{*BCR-ABL*} son tirosinas cinasas constitutivamente activas, que son críticas para el desarrollo de la enfermedad (Alcalay y col., 2001; Deininger y col., 2000; Wang 2000). También tiene la

capacidad de activar rutas de señalización intracelular que controlan el ciclo celular y la proliferación, tales como RAS, así mismo pueden modificar las propiedades de adhesión provocando que las células progenitoras en la médula ósea se liberen a sangre periférica (Verfaillie y col., 1997).

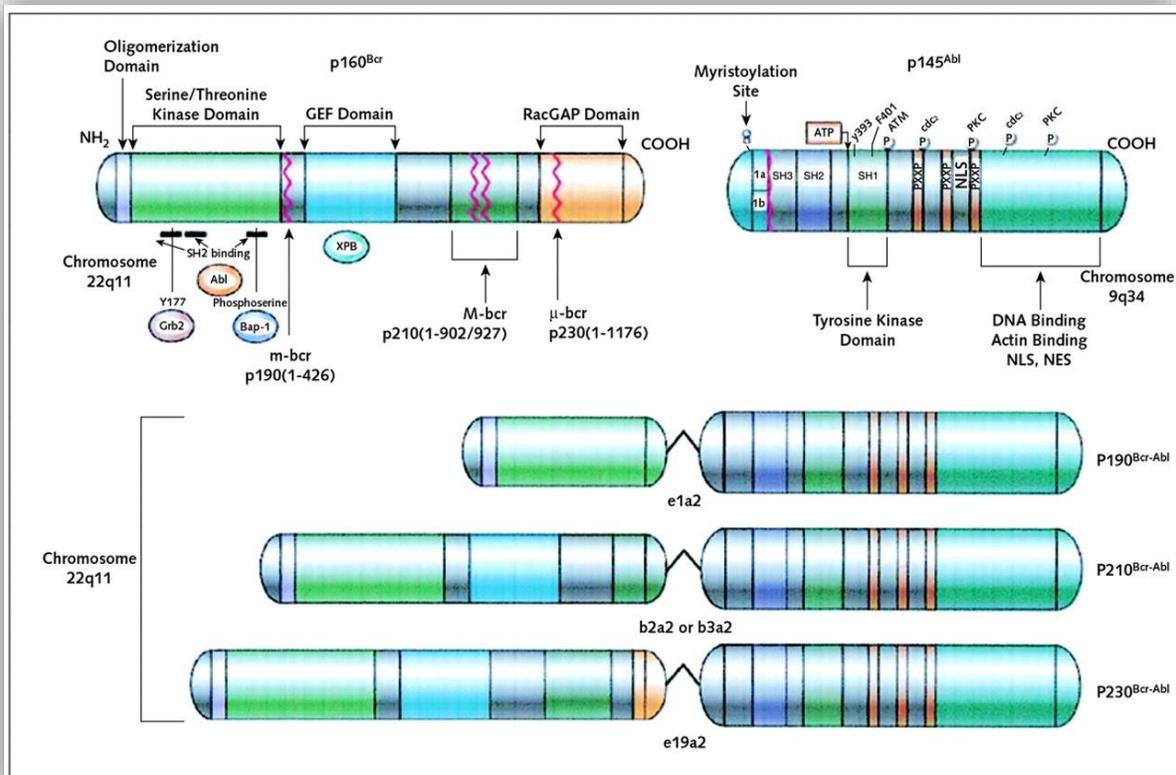


Figura 5. Gen *ABL* y *BCR* de manera normal. Sitios funcionales del gen *BCR* y *ABL* incluye el dominio de cinasa de Serina/Treonina, un dominio central, intercambiador de guanina y un dominio GAP en el extremo carboxilo terminal, así como las variantes de la translocación *BCR/ABL*. Tomado de Kurzrock y col., 2003.

La t(9:22) se puede identificar por estudios citogenéticos convencionales en un 90 a 95%; sin embargo, un 5 a 10% no se detecta por esta técnica, por lo que se requiere de técnicas más sofisticadas y específicas tales como PCR para la detección de este transcrito quimérico (Pui y col., 1994; Inaba y col., 1992; Dorothy y col., 1984).

Según Pane y col. (1996) la localización precisa del punto de ruptura en el gen *BCR* y en el gen *ABL*, así como la composición de la proteína producto de la fusión *BCR-ABL* puede

servir para determinar el fenotipo de la enfermedad y por tanto, para orientarse en la estrategia terapéutica a seguir (Pane y col., 1996).

5.2.3 Translocación t(12:21) (p13;q22) o *TEL-AML1*

La translocación t(12:21) que se da entre el gen *TEL* (*ETV6*) del cromosoma 12 y del *AML1* (*CBFA2*) del cromosoma 21, dan lugar al transcrito quimérico *TEL-AML1*. Se encuentra aproximadamente en el 25% de los casos de LLA; está asociado con un pronóstico favorable y con buena respuesta al tratamiento inicial (Pieters y Carroll, 2008, Mullighan y col., 2005; Artigas y col., 2006).

Comúnmente aparece in útero y es probablemente el evento inicial en la génesis de la LLA de estirpe B (Pieters y Carroll, 2008); sin embargo, algunos estudios han demostrado que este evento de recombinación génica, es insuficiente para generar la enfermedad, y que es obligatorio un evento secundario posnatal (Roper y col., 1983), por lo que se considera que *TEL-AML1* genera solamente una clona pre-leucémica, que puede persistir sin manifestarse por muchos años, hasta que ocurra un evento secundario que favorezca la proliferación clonal de esta translocación (Ford y col., 2001).

El gen *TEL* (*ETV6*) pertenece a la familia ETS de factores de transcripción, está localizado en el cromosoma 12p13.1 (Codrington y col., 2000). Abarca una región de 240 kb y está constituido por 8 exones, el punto de ruptura entre el exón 5 y el exón 6 (Figura 6) abarca una región de 15 Kb (Baens y col., 1996).

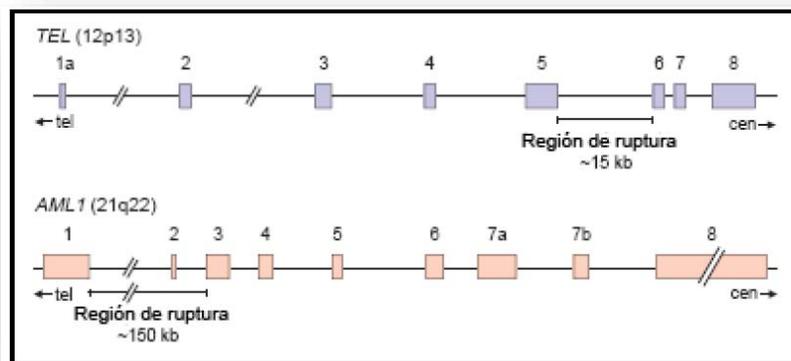


Figura 6. Se muestra el punto de ruptura de los genes *TEL* y *AML1* de la translocación *TEL-AML1*. Tomado y modificado de Van Dongen y col., 1999

El gen *TEL* codifica para una proteína de 452 aminoácidos y posee un dominio de transactivación (ETS) en la región del carboxilo terminal. Este dominio es codificado por los exones 6-8, y es el responsable de la secuencia específica para la unión a DNA rico en purinas; también existe un amino central, el cual está implicado en el reclutamiento del complejo de represión NCOR2 y MSIN3 (Rubnitz y col. 1999).

Este gen posee un dominio hélice-asa-hélice (HLH) que une factores de la misma familia ETS y también tiene un sitio de unión al DNA (DBD) (Seeger y col., 1998; Shurtleff y col., 1995). La fusión entre el exón 5 y 6, es específico para la fusión *TEL-AML1* (Golub y col., 1994); Peeters y col., 1997; Romana y col., 1995).

Se ha demostrado que el gen *TEL* es esencial para el establecimiento de la hematopoyesis, de todos los tipos celulares en la médula ósea. Este gen se involucra frecuentemente en rearrreglos estructurales en padecimientos hematológicos malignos, por lo que se encuentra presente en más de 40 translocaciones (Wlodska y col., 1998; Rubnitz y col., 1999), aunque la fusión más frecuente en la LLA es *TEL-AML1*.

El gen *AML1* (*CBFA2*) se localiza en la banda 21q22, consta de 9 exones que abarca una región de 150 kb, codifica a un factor de transcripción que forma un heterodímero con la proteína CBF β 2 y el sitio de rompimiento se localiza entre los exones 1 y 3 (Rowley, 1999; Hromas y col., 2001). *AML1* heterodimeriza con CBF β formando un complejo que puede funcionar como organizador transcripcional, que estimulan la transcripción de genes implicados en la maduración mieloide (Lo y col., 1997).

El transcrito quimérico *TEL-AML1* probablemente inhibe la actividad normal de la transcripción del gen *AML1* involucrado en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, originando disrupción en la hematopoyesis normal (Pieters y Carroll, 2008; Rubnitz y Look, 1998).

Por lo tanto, *TEL* y *AML1* son genes esenciales para el establecimiento de la hematopoyesis definitiva, aunque ambos genes pueden estar fusionados con muchos otros genes que codifican para cinasas o factores de transcripción en leucemias de linaje

mieloide o linfoide, el transcrito *TEL-AML1*, parece ser exclusivo de la leucemia linfoblástica aguda de progenitores B (Wang y col., 1998).

5.2.4 Translocación t(1;19) (q23;p13) o *E2A-PBX1*

La translocación t(1;19) se observa en niños con LLA en un 25% y en adultos se presenta en menos del 5% de los pacientes. Esta translocación se observa en forma balanceada como no balanceada, que resulta en una trisomía del brazo largo del cromosoma 19p. La consecuencia molecular en ambas es la fusión del gen *E2A (TCF3)* localizado en 19p13 con el gen *PBX1* localizado en el cromosoma 1q23, originando un transcrito quimérico, cuyo producto es una proteína aberrante que actúa como un potente activador de la transcripción (Lu y col., 1994).

El gen *E2A* codifica dos factores de transcripción, el E12 y el E47, los cuales a su vez se unen a los elementos potenciadores en la inmunoglobulina k, o el gen *IGK* y los elementos regulatorios de otros genes. El gen *PBX1* es un gen homeótico (HOX) en el cromosoma 1. Los RNA mensajeros de la fusión *E2A-PBX1* son formados y codifican para proteínas quiméricas que consisten en el dominio de la activación transcripcional del E12-E47 y de los dominios de uniones de DNA del gen *PBX1* (Hunger, 1996; Kamps, 1997). El transcrito quimérico *E2A-PBX1* puede promover leucemogénesis debido a la transactivación de varios genes que normalmente no se expresaban en tejidos linfoides (Fu y col., 1999).

La t(1;19) ocurre en dos formas: 1) una translocación recíproca t(1;19)(q23;p13) o, con mayor frecuencia, 2) una forma desbalanceada caracterizada por dos cromosomas normales el 1 y el 19 y un cromosoma reacomodado, el cromosoma 19, der(19)t(1,19)(q23;p13) (Pui y col., 1994).

Esta translocación se ha reportado que es de origen posnatal y se encuentra entre un 5% y 6% de todos los casos de LLA, y aproximadamente el 25% son de fenotipo pre-B. El transcrito quimérico *E2A-PBX1* se asocia a características clínicas de mal pronóstico. Las características clínicas de LLA con t(1;19) incluyen una edad media de 5 años, un recuento de células blancas de $21-28 \times 10^9$, altos valores de LDH y un índice de DNA < 1.6,

se asocia preferentemente con cariotipos pseudodiploides y una mala respuesta a tratamientos estándares (Crist y col., 1990).

5.2.5 Translocación t(4;11)(q21;q23) o *MLL-AF4*

La translocación t(4;11) que se da entre el gen *MLL* (*ALL1*, *HRX*, *HTRX*, *TRX1*) del cromosoma 11 y del gen *AF4* (*FEL*) del cromosoma 4, dan lugar al transcrito quimérico *MLL-AF4*. Los reordenamientos del brazo largo del cromosoma 11 son mayoritariamente translocaciones recíprocas y se identifican mediante citogenética convencional (Bandas G o R), se observan en un 2% de los niños con LLA (Mirro y col., 1996; Pui, 1992; Harbott y col., 1993; Secker, 1990) y en los adultos la frecuencia varía del 3% al 10% (Levin y col., 1984; Secker y col., 1997).

Esta translocación se asocia a un alto recuento de células blancas $>100 \times 10^9 /L$, organomegalias e infiltración al sistema nervioso central (SNC). Las células leucémicas tienen una morfología L2 y fenotipo inmaduro pre-B (CD10-) con expresión frecuente de marcadores mieloides, lo cual sugiere que la translocación podría ocurrir en una célula pluripotencial con capacidad de diferenciación en ambos linajes, linfoide y mieloide (Stong y col., 1985). El pronóstico de los pacientes es malo y únicamente el 75% consigue la remisión completa (Smith y col., 1996).

El gen *MLL* se localiza en el cromosoma 11q23, las translocaciones de este gen se asocian con gran cantidad de enfermedades hematológicas tales como: LMA, leucemia de células T, LLA de células B, SMD, linfoma linfoblástico y linfoma de Burkitt (Hess, 2004; Daser y Rabbitts, 2005). *MLL* consta de 36 exones los cuales codifican para una proteína de 3969 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 430 KDa. Así mismo el gen *MLL* se expresa ampliamente en el desarrollo embrionario y sus niveles bajan en la mayoría de los tejidos adultos. Se han identificado más de 50 translocaciones y aproximadamente 40 patrones de genes en *MLL*, aunque se podrían identificar otros patrones genéticos con el uso de PCR (Boomer y col., 2001).

Aproximadamente de 3-10% de los pacientes adultos con LMA tienen una translocación del gen *MLL*, les confiere un pronóstico intermedio, mientras que las LLA de linaje B en adultos con esta misma translocación su pronóstico es adverso, con fallas al tratamiento (Hess, 2004).

El principal punto de ruptura del gen *MLL* está entre los exones 8 y 12, el punto de ruptura de mayor frecuencia se encuentra entre los exones 9 y 10 en pacientes adultos y pediátricos con LLA (Figura 7) (Gu y col., 1992).

El gen *AF4* se localiza en el cromosoma 4q21, fue el primer gen descrito que se fusiona con el gen *MLL* en la t(4;11) en la leucemia aguda. El RNAm, del gen *AF4* se expresa en células hematopoyéticas normales y en tejido normal (Gu y col., 1992). Este gen consta de 23 exones, donde el punto de ruptura se encuentra entre los exones 3 y 7; sin embargo la más frecuente se localiza en el exón 4 (Figura 7) (Gu y col., 1992).

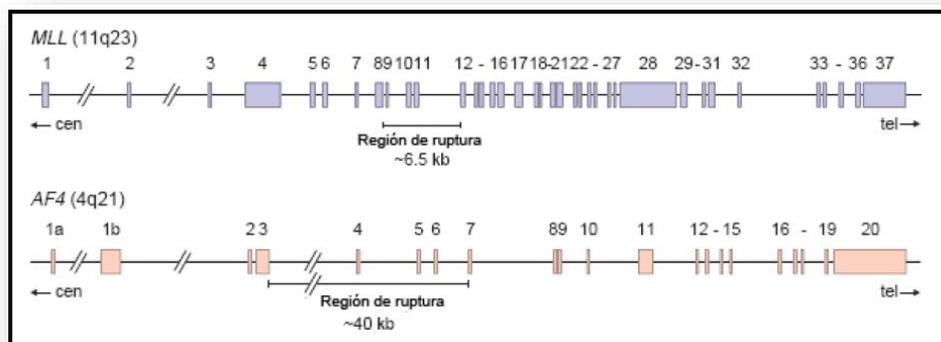


Figura 7. Se muestra los puntos de ruptura de los genes *MLL* y *AF4* de la translocación *MLL-*AF4**. Tomado y modificado de Van Dongen y col., 1999.

EL gen *AF4* codifica para una proteína de 1210 aminoácidos y un peso molecular de 140 KDa, rica en secuencias de prolina y serina, contienen un dominio de unión a GTP y secuencias de localización nuclear. *AF4* es indispensable para el crecimiento y

diferenciación normal de las células progenitoras de linfocitos (Meyer y col., 2006). Los productos de fusión del gen *MLL* no se conocen, pero están asociados con la expresión anormal de los genes *HOX*, que pueden dar lugar al crecimiento anormal de las células troncales hematopoyéticas. Se han establecido modelos in vitro para estudiar los aspectos biológicos de esta translocación, donde se ha demostrado que las proteínas de fusión portan propiedades oncogénicas, aumentando la resistencia contra la apoptosis con *AF4* (Caslini y col., 2004). Mientras que la proteína de fusión *MLL* estimula el crecimiento celular, ya que se une directamente a las regiones promotoras de dos inhibidores del ciclo celular (p18 y p27), regulando así su expresión génica (Ayton y Clearly, 2001).

Las células con la presencia de este transcrito tienen una mayor tasa de crecimiento, manteniendo el ciclo celular en la fase de síntesis, aún en ausencia de factores de crecimiento, y resistencia a la apoptosis (Gaussmann y col., 2007). Dando lugar a resistencia a la quimioterapia, en comparación con células que tienen otros transcritos quiméricos leucemogénicos (Kersey y col., 1998).

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leucemia linfoblástica aguda representa la décima tercera causa de muerte por neoplasias en México (Globocan, 2012), para su diagnóstico se basa en características morfológicas, inmunofenotípicas y por estudio citogenético; sin embargo, aproximadamente el 30% de los pacientes presentan un cariotipo normal, aunado a esto en algunos casos (10-15%) se obtiene material inadecuado, se llega a presentar fallas en el cariotipo o no existen células en división, lo que hace que el estudio citogenético no sea representativo de las poblaciones leucémicas. Por tal razón en el Hospital Juárez de México se requiere desarrollar metodologías moleculares que permitan identificar alteraciones específicas para contribuir a mejorar la estratificación del pronóstico de los pacientes, y así poder dar un tratamiento más personalizado en el menor tiempo posible.

7. JUSTIFICACIÓN

Los factores pronóstico influyen en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia de los pacientes tales como: la edad, la cuenta de leucocitos (por sus siglas en inglés WBC), el género, el inmunofenotipo y el estudio citogenético. Con la detección de los marcadores moleculares de valor pronóstico por PCR se podrá decidir el tratamiento terapéutico, cuando el estudio citogenético falla o es cariotipo normal, siendo la PCR una prueba altamente sensible, específica, rápida y reproducible.

Algunos procedimientos de diagnóstico hematológico molecular requieren del aislamiento y estudio a nivel de RNAm para poder detectarse. Debido a que la traducción del RNAm produce proteínas, las secuencias modificadas de ribonucleótidos en el RNAm generan un transcrito. La transcripción de este transcrito origina una proteína de fusión que puede modificar el control del ciclo celular, lo que provoca neoplasias malignas.

La técnica de la PCR permite la detección de este RNAm quimérico, además de ser una técnica rápida en comparación con la citogenética convencional. La aplicación de la PCR como herramienta diagnóstica en la práctica clínica, puede influir de manera muy

importante clasificando grupos de riesgo susceptibles mediante la detección molecular específica de alteraciones moleculares en cualquier momento de la enfermedad.

Actualmente en el laboratorio de genética y diagnóstico molecular del Hospital Juárez de México se realiza la identificación de las translocaciones mediante un kit comercial, con altos costos e inalcanzables para el paciente, por lo cual es necesario realizar pruebas individualizadas que permitan la identificación de dichas translocaciones pero a bajos costos.

8. HIPÓTESIS

En las translocaciones se producen transcritos quiméricos que en algunas ocasiones no pueden ser diagnosticadas por citogenética convencional, por ello el aplicar técnicas de biología molecular como la PCR se podrá detectar este tipo de alteraciones, ya que es más sensible (detecta una célula en un millón) y no requiere de células en división.

9. OBJETIVO

9.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una prueba diagnóstica para la detección de transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1* por medio de PCR punto final en líneas celulares leucémicas.

9.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Buscar y verificar los iniciadores para la detección de los transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1*, en la literatura y por el blast.

- Estandarizar la metodología para detectar los transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1* en líneas celulares leucémicas.
- Verificar si esta metodología en PCR identifica las alteraciones en muestras de pacientes con LLA previamente diagnosticados con este tipo de alteración del servicio de hematología del Hospital Juárez de México.
- Correlacionar los datos clínicos con los resultados de Biología molecular.

10.MÉTODO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y diagnóstico molecular del Hospital Juárez de México de la Secretaría de Salud.

10.1 Muestras clínicas

Se incluyeron 19 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en cualquier estadio de la enfermedad (*Novo* o recaída), provenientes del servicio de Hematología del Hospital Juárez de México. A cada paciente se le tomó de 3 a 5ml de sangre periférica, la sangre fue colectada en un tubo con EDTA (utilizado como anticoagulante). Todos los pacientes que participaron en el trabajo firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

10.1.2 Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de LLA.
- Pacientes en cualquier estadio de la enfermedad.
- Pacientes con al menos el 20% de blástos circulantes en sangre periférica.
- Pacientes de 15 a 50 años.

10.1.3 Criterios de exclusión

- Pacientes con menos de 20% de blástos circulantes en sangre periférica.
- Pacientes mayores de 50 años.

10.2 Líneas celulares

Cultivo celular en suspensión para las líneas celulares HL-60, Sub-p15, 697, REH y RS4.

Con el objetivo de estandarizar la metodología se emplearon líneas celulares procedentes de pacientes caucásicos con LLA, las cuales se utilizaron como controles positivos y negativos para cada uno de los transcritos quiméricos (Cuadro 3). Estas líneas celulares se obtuvieron del ATCC (American Type Culture Collection), y se cultivaron en medio RPMI-1640 (Invitrogen GIBCO-BRL) para las líneas celulares RS4, 697 y REH y medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium de Invitrogen GIBCO-BRL), para líneas HL-60, Sup-B15, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Invitrogen GIBCO-BRL H y Clone) y antibiótico: penicilina/estreptomina, en cajas petri de vidrio con capacidad de 5ml, se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y humedad saturante, a una densidad de 1X10⁵ células/ml para HL-60, RS4, REH, una densidad de 5X10⁵ para Sup-B15 y 2x10⁶ para la línea celular 697, con una resiembra de cada 48 horas (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan y col., 1993).

En el siguiente cuadro se muestran las líneas celulares que se utilizaron como controles positivos y negativos para cada una de las translocaciones.

Cuadro 3. Características de las líneas celulares que se utilizaron en el presente trabajo.

Número del ATCC	Línea celular	Mutación	Características
CCL-240	HL-60	Control negativo	Línea celular de leucemia aguda promielocítica, negativa para alguna translocación.
CRL-1929	Sup-B15	<i>BCR-ABL</i>	Línea celular de LLA positiva para la translocación <i>BCR-ABL menor</i> .
CRL-8286	REH	<i>TEL-AML1</i>	Línea celular de LLA positiva para la translocación <i>TEL-AML1</i> .
CCL-119	697	<i>E2A-PBX1</i>	Línea celular de LLA positiva para la translocación <i>E2A-PBX</i> .
CRL-1873	RS4	<i>MLL-AF4</i>	Línea celular de LLA positiva para la translocación <i>MLL-AF4</i> .

10.3 Extracción de ácidos nucleicos (RNA).

Se obtuvieron células mononucleadas de las líneas celulares, así como muestras de sangre periférica de 19 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, provenientes del servicio de hematología del Hospital Juárez de México. Las líneas celulares fueron colectadas en un tubo falcon estéril de 15ml y fueron lavadas con 1ml de PBS (Solución buffer de fosfatos), se centrifugaron a 3,500rpm para obtener el botón celular, se desechó el sobrenadante y se prosiguió a realizar la extracción mediante la técnica de trizol. Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron en un tubo con EDTA, se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 minutos, posteriormente se desechó el plasma y se obtuvieron los leucocitos en un tubo eppendorf.

Al igual que las líneas celulares y las muestras de los pacientes una vez obtenido el botón leucocitario se adicionaron 800µl a 1000µl de TRizol (Invitrogen Life Tech Inc, Carlsbad, CA, USA) homogeneizándose vigorosamente, se añadió 200µl de cloroformo (Sigma-

Aldrich®) frío y se mezcló por inversión, se dejó incubar 10 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4°C. Se obtuvo una fase orgánica (DNA y proteínas) de color rojo, una fase intermedia (proteínas) y una fase superior acuosa (RNA), pero únicamente se tomó la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo eppendorf estéril, donde se le agregó 500µl de alcohol isopropílico frío (Sigma-Aldrich®), se dejó incubar por 15 min a 4°C y se centrifugó nuevamente durante 15 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet celular se lavó con 1 ml de etanol frío al 75 %, volviéndose a centrifugar. Finalmente el pellet celular se disolvió en 30µl de agua tratada libre de RNAsas. Los tubos obtenidos con RNA se almacenaron a -70°C hasta su uso. Todo el material que se utilizó era nuevo y estéril.

Nota: todos los pasos que incluyeron centrifugaciones se realizaron a 13,000rpm.

10.4 Evaluación de la concentración del RNA

La concentración y pureza del RNA de las muestras así como de las líneas celulares fue evaluada mediante la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro EPOCH (BioTek®), colocando en cada celda 2µl de cada RNA a 260nm.

La lectura a 260nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra. Una DO de 1 corresponde aproximadamente a 50µg/ml de DNA, 40 µg/ml de RNA y 20 µg/ml de oligonucleótidos de cadena sencilla. La proporción entre las lecturas de 260nm y 280nm da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Habitualmente, las preparaciones puras de RNA tienen valores de DO₂₆₀/DO₂₈₀ de 2.0.

La concentración de RNA por ml se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{RNA}[\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{D.O.}(260\text{nm}) \times 40 (\text{factor de corrección}) \times (\text{dilución})}{1000}$$

10.5 Integridad del RNA

La verificación de la integridad del RNA de las líneas celulares y de las muestras de pacientes, se realizó a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, en un amortiguador de TBE 1X, teñido con 1.5µl de Bromuro de etidio. En el gel de agarosa se cargó 2 µl de RNA con 1 µl de azul de bromofenol. La electroforesis se realizó a 90V

durante 45 minutos. La integridad del RNA total se determinó por observación del RNA ribosomal 28S y 18S en un transluminador de luz UV, Gel Doc™ EZImager (BIO-RAD).

10.6 Síntesis del cDNA

La síntesis del cDNA se realizó mediante el kit Promega®, la master mix se preparó en un tubo eppendorf de 0.6ml (Cuadro 4), se agregaron 10.5µl de la master mix en diferentes tubos para PCR. A cada uno de los tubos se le agregó 1µg de RNA y se completó a un volumen final de 20 µl con H₂O. Posteriormente, todos los tubos de PCR se centrifugaron para que el contenido de los tubos se mezclara y se asentaran en el fondo.

Cuadro 4. Master mix para síntesis de cDNA (kit Promega®).

Reactivo	Volumen (para 1 muestra)
Buffer ImProm II 5x	4µl
MgCl ₂	3µl
DNTPs mix (10mM de cada dNTP)	1µl
Inhibidor de ribonucleasas	0.5µl
Enzima RT (RT SuperScriptII)	1µl
Oligo dt	1µl
RNA	2µl
Agua miliQ	7.5

Las condiciones para llevarse a cabo la reacción de PCR se describen en el Cuadro 5, el termociclador usado fue el Nyx Technik® TC-412.

Cuadro 5. Condiciones del termociclador Nyx Technik® para PCR

Temperatura (°C)	Tiempo
42	60min
95	5min

10.7 PCR punto final**10.7.1 Búsqueda de iniciadores**

Se realizó una revisión bibliográfica, en la cual se buscaron iniciadores específicos para cada una de los transcritos quiméricos *BCR-ABL menor*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1*.

10.7.2 Especificidad de iniciadores

Se verificó la especificidad de los iniciadores utilizando la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ya que nos permite alinear dos o más secuencias para comparar la similitud de éstas con una gran cantidad de secuencias reportadas en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

10.7.3 PCR punto final para el gen constitutivo *ABL*

Para evaluar la integridad del cDNA se realizó una amplificación mediante PCR del gen constitutivo *ABL* de las muestras de los pacientes previamente diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda. La PCR punto final se realizó mediante el kit de ROCHE®, en un tubo eppendorf nuevo y estéril de 0.6ml, se realizó una mezcla master mix (Cuadro 6 y 7) con las siguientes condiciones:

Cuadro 6. Master mix para PCR de gen constitutivo *ABL* (kit Roche®).

Reactivos	Volumen por reacción
<i>Taq</i> polimerasa	0.3 µl
Buffer 10x	3.5 µl
dNTP'S	1 µl
Iniciador <i>ABL</i> Forward	0.5 µl
Iniciador <i>ABL</i> Reverse	0.5 µl
cDNA	5 µL
Agua miliQ	9.2 µl
Volumen total	20 µl

Cuadro 7. Condiciones del termociclador Nyx Technik® para PCR del gen constitutivo *ABL*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	15 min	
Desnaturalización	94°C	45 seg	
Alineamiento	63°C	1 min	35
Extensión	72°C	1 min 30 seg	
Extensión final	72°C	7 min	

Se verificó la amplificación del gen *ABL* mediante una electroforesis, el cual se cargó un gel de agarosa al 2 % y se visualizaron los productos de la amplificación mediante un transluminador de luz UV.

10.7.4 PCR punto final para las líneas celulares

Se realizaron 4 master mix mediante el kit ROCHE® para detectar los transcritos quiméricos *BCR-ABL menor*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1* en líneas celulares (Cuadro

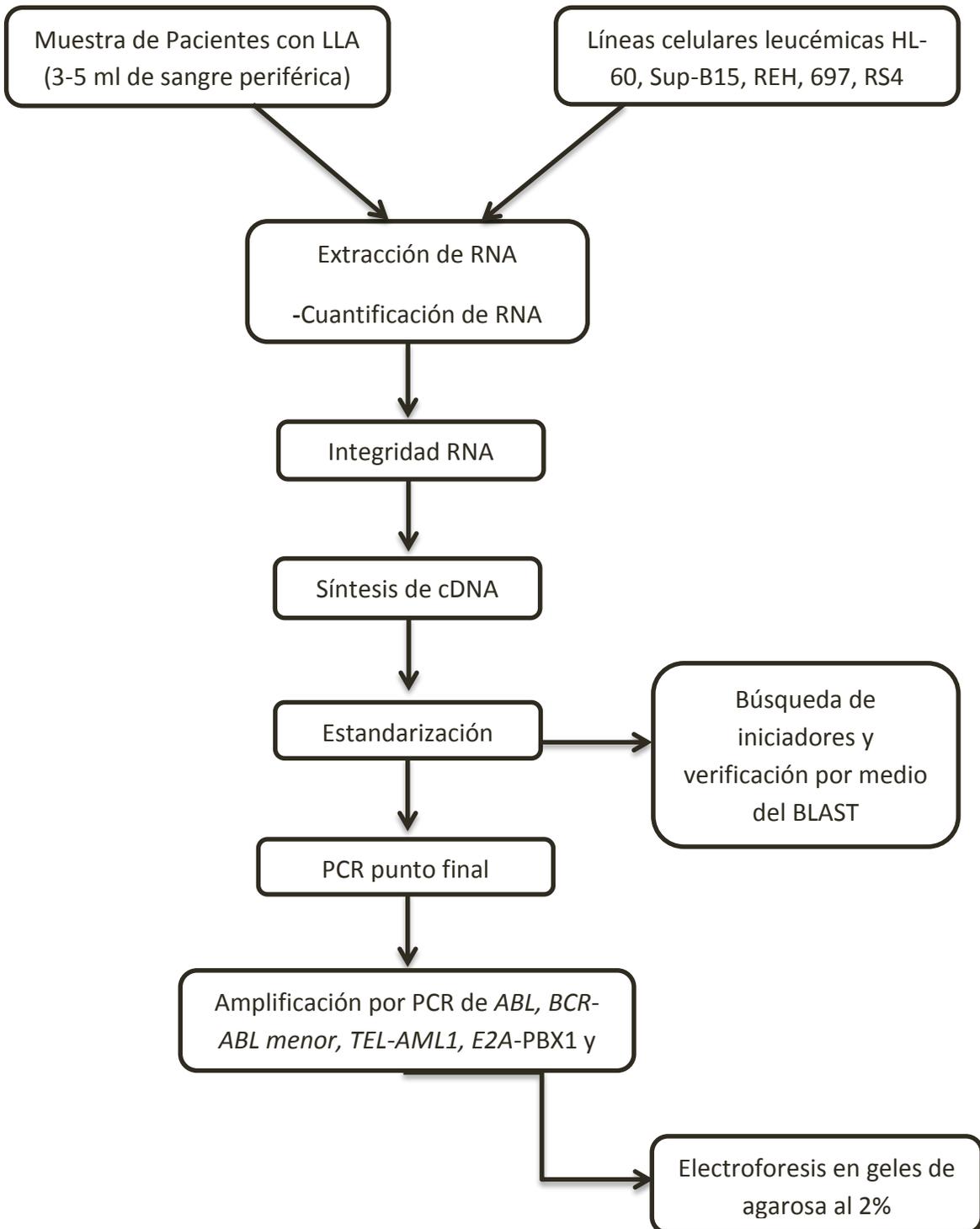
8), las condiciones para llevarse a cabo la reacción de PCR fueron las siguientes condiciones:

Cuadro 8. Condiciones para la detección de transcritos quiméricos *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1* en líneas celulares.

Reactivos	Volumen por reacción	Condiciones de amplificación
<i>Taq polimerasa</i>	0.3 µl	94°C X 15 min
Buffer 10x	3.5 µl	94°C X 45 seg
dNTP'S	1 µl	63°C X 1 min
Iniciador Foward	1 µl	72°C X 1 min 30 seg
Iniciador Reverse	1 µl	72°C X 7 min
cDNA	5 µl	
Agua libre de RNAsa	8.2 µl	
Volumen final por tubo	20 µl	Por 35 ciclos

Se cargó en un gel de agarosa al 2 %, se realizó una electroforesis y se visualizaron los productos de la amplificación mediante un transluminador de luz UV.

10.7.5 Diagrama general de trabajo



11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 Búsqueda y verificación de iniciadores, para la detección de los transcritos quiméricos en líneas celulares y en muestras de pacientes leucémicos.

Para el diseño de oligos o iniciadores, se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos para la selección de éstos, así seleccionando los iniciadores más óptimos para utilizar. La estandarización consistió en definir las condiciones de la amplificación, tanto del gen *ABL* (control constitutivo), como la región específica para la detección de cada uno de los transcritos quiméricos (*BCR-ABL menor*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* y *TEL-AML1*).

Para ésto se utilizaron herramientas bioinformáticas como el BLAST Assembled Ref Seq Genomes (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome), para verificar si los iniciadores, amplificaban los transcritos quiméricos mencionados en las referencias consultadas. En función a la revisión en el BLAST, los siguientes pares de iniciadores que se utilizaron fueron:

Cuadro 9. Secuencia de oligonucleótidos para los diferentes transcritos quiméricos.

Gen de fusión	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Producto (pb)
<i>ABL</i>	5'-GGCCAGTAGCATCTGACTTTG-3'	5'-ATGGTACCAGGAGTGTTTCTCC-3'	290
<i>TEL-AML1</i>	5'-TGCACCCTCGATCCTGAAC-3'	5'-AACGCCTCGCTCATCTTGC-3'	181
<i>BCR-ABL</i>	5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3'	5'-GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'	521
<i>MLL-AF4</i>	5'-CCGCCTCAGCCACCTAC-3'	5'-TGTCAGTGAAGGTCG-3'	559
<i>E2A-PBX1</i>	5'-CACCAGCCTCATGCACAA-3'	5'-TCG CAG GAG ATT CAT CAC G -3'	373

Tomado de Pakakasama y col., 2008; Ibrahim y col., 2008; Sudhakar y col., 2011.

11.2 Estandarización de las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa, para la detección de los transcritos quiméricos en líneas celulares leucémicas.

Con finalidad de estandarizar la metodología para la detección de transcritos quiméricos, se utilizaron líneas celulares leucémicas que fueron obtenidas mediante la ATCC, estas líneas celulares Sup-B15, 697, REH y RS4, son células de leucemia linfoblástica aguda positivas para los transcritos quiméricos, como control negativo se utilizó la línea celular HL-60, línea celular de leucemia promielocítica aguda negativa para los transcritos.

Se cultivaron las líneas celulares a una densidad de 1×10^5 células/ml para HL-60, RS4, REH, una densidad de 5×10^5 para Sup-B15 y 2×10^6 para la línea celular 697, con una resiembra de cada 48 horas, una vez obtenida la densidad celular necesaria, se prosiguió a extraer el RNA de cada una, se cuantificó (Cuadro 10) y a partir del valor del RNA se realizó la síntesis de cDNA.

Cuadro 10. Cuantificación de RNA (ng/ μ l) de las líneas celulares y concentración de pureza.

Línea celular	Concentración (ng/ μ l)	Pureza
HL-60	881.496	1.66
Sup-B15	429.12	1.90
REH	1297.824	1.66
697	402.072	1.84
RS4	1225.158	1.67

Una vez obtenida la síntesis de cDNA de cada línea celular, se realizó una serie de pruebas para estandarizar las condiciones óptimas de temperaturas, tales como, la de alineamiento para evitar la formación de productos inespecíficos para la PCR punto final, así como curvas de concentraciones de cDNA a utilizar. Se realizó una serie de diluciones

de 1:10 hasta 1:10000, debido a que el producto de cDNA de algunas líneas celulares, como la línea 697 positiva para *E2A-PBX1*, eran demasiada alta y saturaba la reacción, por lo cual no se podía visualizar claramente una banda específica (Figura 8).

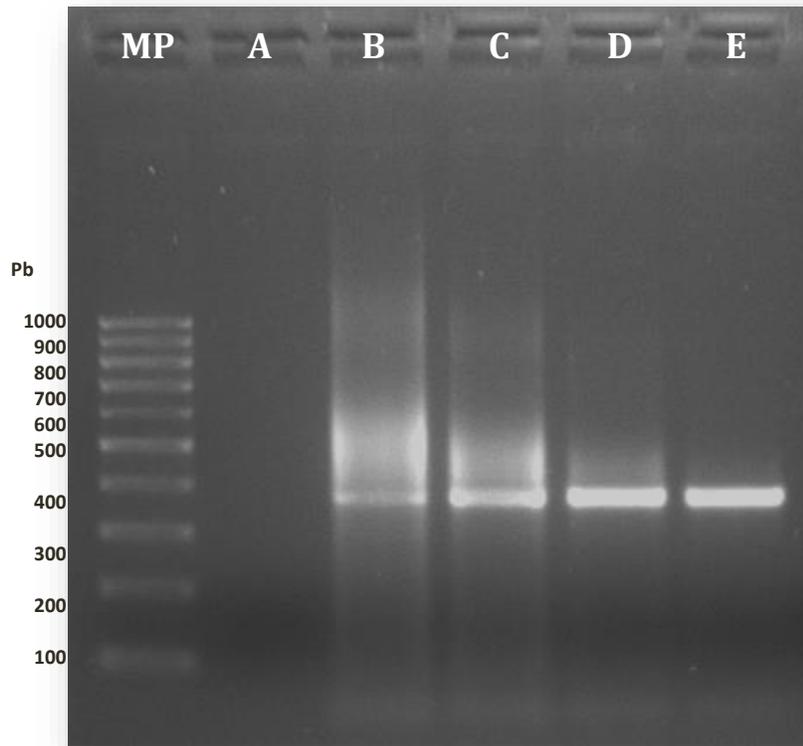


Figura 8. Estandarización con serie de diluciones para la línea celular 697. A) control negativo HL-60, B) línea celular 697 positiva para *E2A/PBX1* diluida 1:10 C) línea celular 697 positiva para *E2A/PBX1* diluida 1:100, D) línea celular 697 positiva para *E2A/PBX1* diluida 1:1000, E) línea celular 697 positiva para *E2A/PBX1* diluida 1:10000, MP) Marcador de peso molecular Data Sheet 100pb a 1Kb.

Como se puede observar en la Figura 8 la dilución más óptima y la que se utilizó fue la de 1:10000, a partir de esa dilución se tomó para correr las muestras y utilizarla como control positivo.

Una vez estandarizada las condiciones de concentración, y la cantidad de cDNA se obtuvieron cuatro amplificaciones de cada línea celular siendo positivas para cada uno de los transcritos quiméricos. La primera amplificación, se obtuvo un producto de PCR de 521pb de la línea celular Sup-B15, la cual es positiva para el transcrito quimérico *BCR-ABL*

de rompimiento menor, transcrito quimérico que se presenta en la leucemia linfoblástica aguda (Cannistra, 1990).

La segunda amplificación que se obtuvo fue de 181pb de la línea celular REH, la cual corresponde al transcrito quimérico de *TEL-AML1*, la tercera amplificación obtenida fue con un producto de 373pb de la línea celular 697 la cual es positiva para el transcrito quimérico *E2A-PBX1* y la última amplificación obtenida fue de 559pb de la línea celular RS4, la cual es positiva para el transcrito quimérico *MLL-AF4*. Estas amplificaciones se observaron en un gel de agarosa al 2% teñido con 1.5µl de Bromuro de etidio (Figura 9).

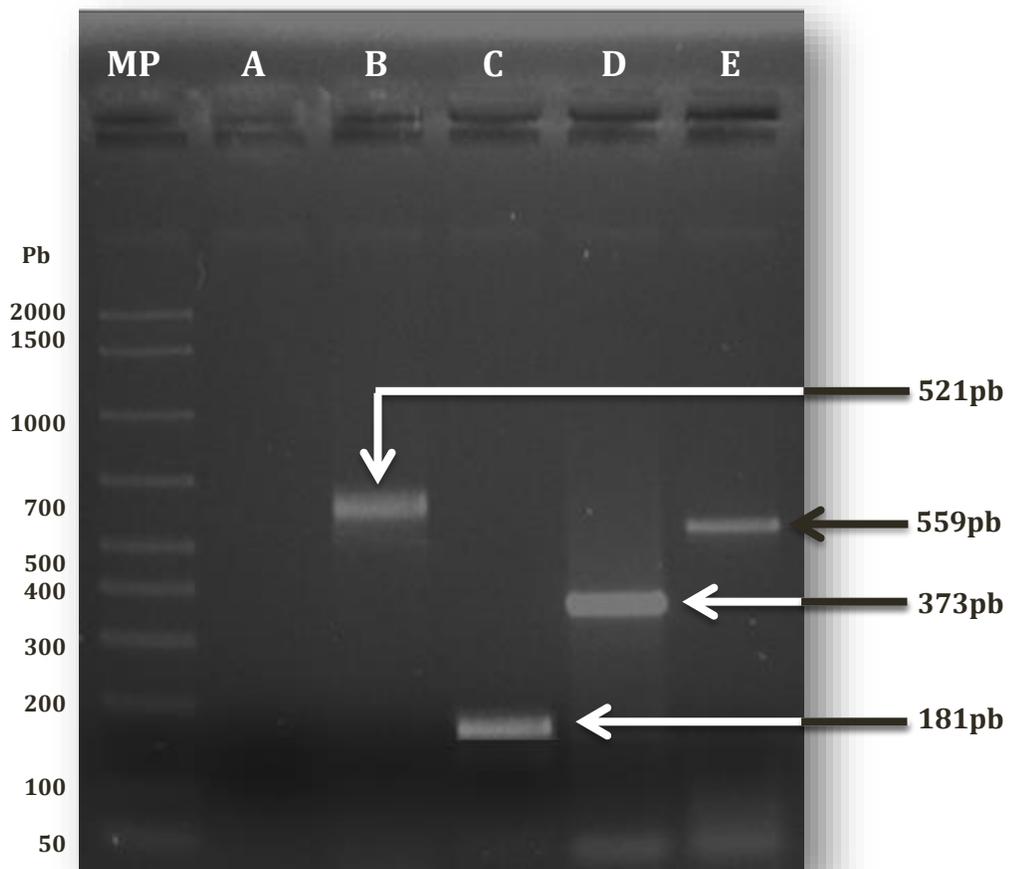


Figura 9. PCR punto final de líneas celulares. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Amplificación de PCR punto final estandarizada para la detección de los transcritos quiméricos *BCR-ABL menor*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX1* y *MLL-AF4*. Donde A) es control negativo línea celular HL-60, B) línea celular Sup-B15 positiva para *BCR-ABL menor*, C) línea celular REH positiva para *TEL-AML1*, D) línea celular 697 positiva para *E2A-PBX1*, E) línea celular RS4 positiva para *MLL-AF4*, MP) marcador de peso molecular 50-2000pb Amershan Life Science.

Al igual que cualquier ensayo de diagnóstico clínico, la PCR debe ser estandarizada adecuadamente así mismo validada (Londoño, 2004). El proceso de estandarización es principalmente conocer la metodología necesaria para que en cualquier laboratorio pueda ser aplicada la prueba. Los métodos utilizados en un laboratorio clínico deben ser evaluados y sometidos a pruebas que aseguren que producen resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir que deben ser validados (Ginebra, 1984).

La validación de un método se realiza mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión y especificidad. Los métodos cualitativos requieren para su validación, la especificidad/selectividad, es decir si la matriz de la muestra difiere de la utilizada cuando se elaboró el método, el límite de detección y la precisión (en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad). En el caso de los métodos cuantitativos se requiere de una exactitud, tener un umbral de concentración, así mismo tener una precisión en el umbral de concentración (Ginebra, 1984).

Por lo anterior se demostró que las líneas celulares y los iniciadores fueron los específicos para cada uno de los transcritos quiméricos en dichas líneas celulares, así asegurándonos de tener un control positivo y poder realizar la identificación de estas alteraciones.

11.3. Verificación del cDNA mediante la amplificación del gen constitutivo *ABL* de las muestras de pacientes con LLA.

En el presente trabajo se analizaron 19 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en cualquier estadio de la enfermedad, tratados y no tratados, provenientes del servicio de hematología del Hospital Juárez de México, en el periodo de Abril 2014 a Febrero 2015. Se extrajo el RNA de las 19 muestras las cuales se cuantificaron (Cuadro 11) para realizar la síntesis de cDNA.

Cuadro 11. Cuantificación de RNA (ng/μl) y concentración de pureza de las muestras de pacientes con LLA.

No muestra	Cuantificación (ng/μl)	Pureza
1	191.947	1.83
2	219.605	1.86
3	752.645	1.90
4	130.507	1.98
5	204.427	1.90
6	161.387	1.69
7	1510.827	1.79
8	1003.38	1.89
9	1629.94	1.86
10	525.125	1.97
11	530.56	2.06
12	360.08	1.95
13	217.04	1.62
14	100.24	1.68
15	1345.05	2.1
16	897.04	2.10
17	828.96	2.04
18	626.32	1.98
19	283.52	1.70

Una vez que se extrajo el RNA se procedió a comprobar su integridad mediante la técnica de PCR para el gen constitutivo *ABL*, cuyo producto de amplificación esperado fue de 290pb para cada una de las muestras de los pacientes. Esto asegura que la PCR amplifica de manera correcta y específica las secuencias de DNA específicos de los iniciadores. En la

Figura 10 y 11 se muestra un gel de agarosa al 2% donde se observan los productos de PCR del gen constitutivo *ABL* de 19 muestras de pacientes con LLA.

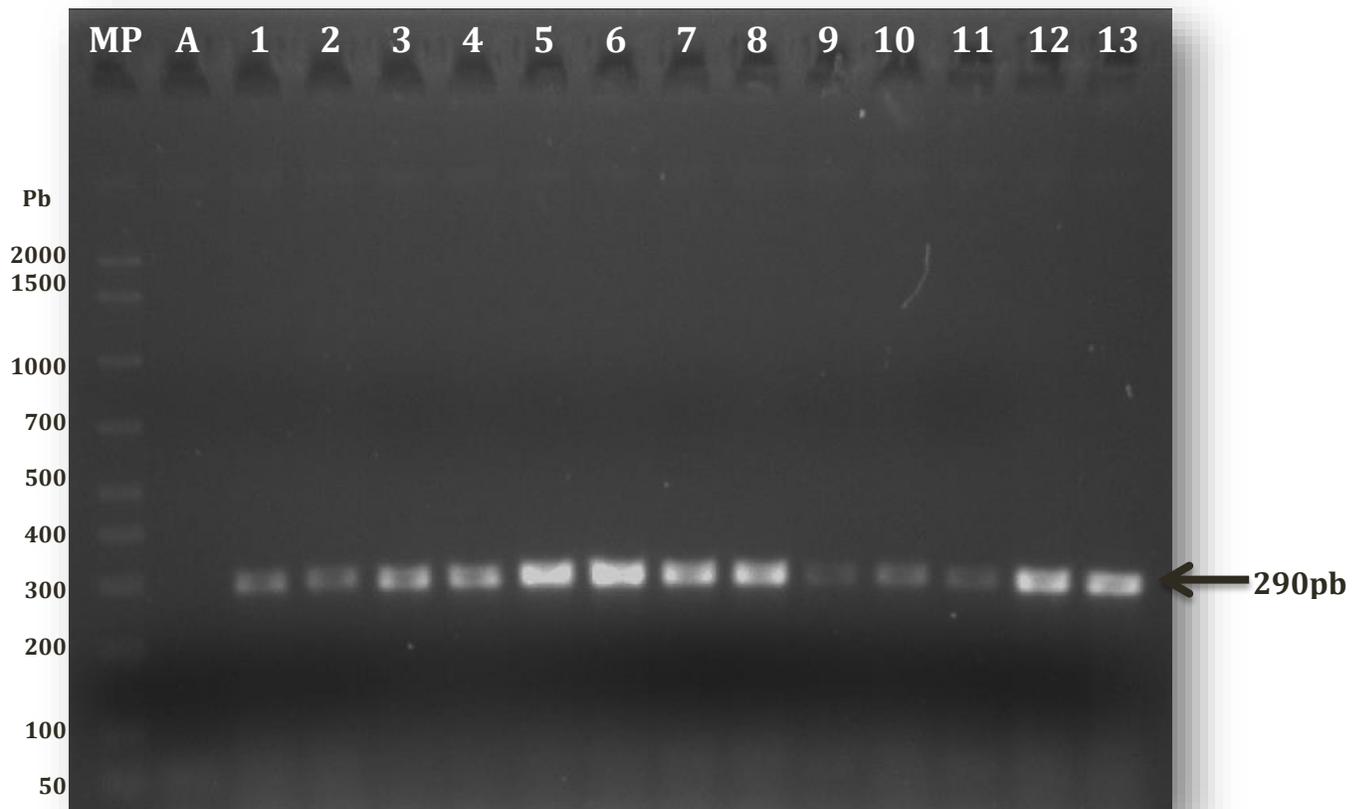


Figura 10. Detección del gen constitutivo *ABL* en muestras de pacientes con LLA. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. A) Control negativo (mezcla para PCR y agua libre de RNAsa), 1-13) producto de PCR del gen constitutivo *ABL* de 290 pb de 13 muestras de pacientes, MP) Marcado de peso molecular de 50-2000pb Amershan Life Science.

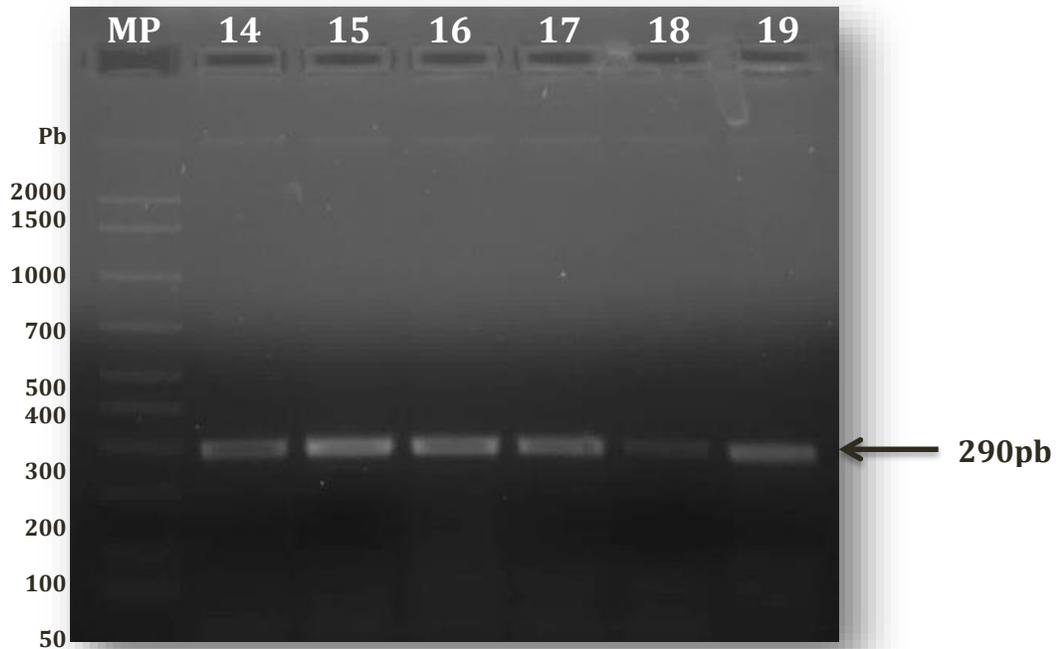


Figura 11. Detección del gen constitutivo *ABL* en muestras de pacientes con LLA. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (O-T) producto de PCR del gen constitutivo *ABL* de 290 pb de 6 muestras de pacientes con LLA. MP) Marcado de peso molecular de 50-2000pb Amershan Life Science.

Esto se realizó para evitar falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de PCR en las muestras, la comisión Europea (JCR, 2010a; JCR2010c) recomienda efectuar un experimento de control de la inhibición de la PCR, que suele hacerse mediante una PCR específica de un gen constitutivo de la especie de interés. Un gen constitutivo, es un gen que se encuentra en un organismo en condiciones naturales y cumple una función específica dentro de él (Van Etten y col., 1999).

Tal es el caso del gen *ABL*, que de manera normal funciona señalizando y modificando el citoesqueleto de actina en células hematopoyéticas humanas y neuronales; a nivel celular, está involucrada en la regulación del ciclo celular en varios puntos de control, que afectan la proliferación celular y la genotoxicidad (Wang, 1998). El propósito de haber realizado una PCR punto final para este gen de referencia, fue con el objetivo de determinar si el cDNA sintetizado amplificaba correctamente.

11.4 Verificación de la metodología en muestras de pacientes diagnosticados con LLA.

Con finalidad de verificar la metodología desarrollada en las líneas celulares, se procedió a realizar una PCR punto final para la detección de cada transcrito quimérico en muestras de los 19 pacientes con LLA, utilizando como control positivo su línea celular correspondiente al transcrito. Se realizó una PCR para la detección de *BCR-ABL menor* que corresponde la a translocación t(9;22), como resultado se obtuvo que, dos de los 19 pacientes diagnosticados con LLA, fueron positivos para este transcrito quimérico *BCR-ABL menor* (Figura 12).

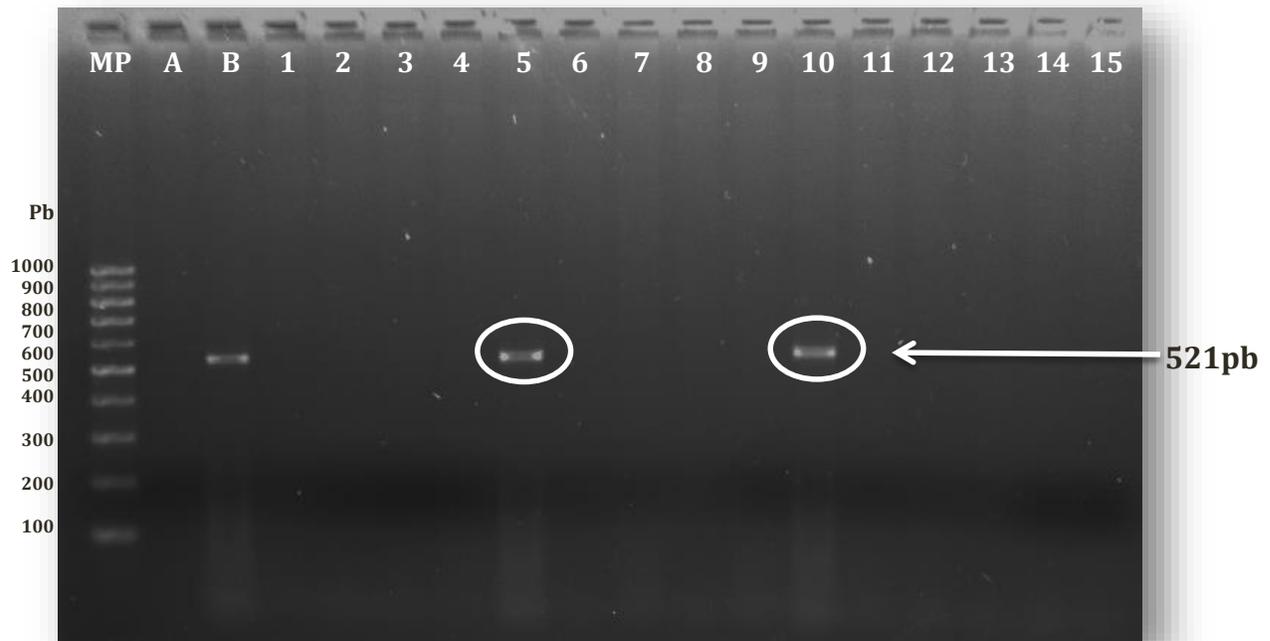


Figura 12. Detección del transcrito quimérico *BCR-ABL menor* en pacientes con LLA. A) Control negativo línea celular HL-60, B) Control positivo línea celular Sup-B15 positivo para *BCR-ABL menor*, 1- 4) Muestras de pacientes con LLA negativos para *BCR-ABL menor*, 5 y 10) muestra de pacientes con LLA positivo para *BCR-ABL menor*, 6-9, 11-15) Muestras de pacientes con LLA negativos para *BCR-ABL menor*, MP) Marcador de peso molecular Data Sheet 100pb a 1Kb. Caso 16-19 muestras negativas para esta translocación (datos no mostrados).

El transcrito quimérico de *BCR-ABL menor* se ha reportado en población Mexicana adulta en una frecuencia de 11-29% (Mrózek y col., 2009), el pronóstico para los pacientes con

Ph+ es adverso, aun con tratamientos de quimioterapia intensiva, por lo que el trasplante alogénico de médula ósea o el trasplante de células progenitoras de sangre periférica es indicado en estos casos (Pui y col., 2012; Teachey y Hunger, 2013).

Este transcrito codifica para una proteína, la cual aumenta la actividad tirosina cinasa (Pieters y Carroll, 2008), además induce resistencia a la apoptosis, altera las interacciones célula-célula y la interacción célula-matriz (Bedi y col., 1994). De ahí que los pacientes positivos con el transcrito *BCR-ABL* menor, tengan un alto recuento de leucocitos WBC (número promedio de WBC = $212 \times 10^9 / L$) en comparación con los pacientes negativos para esta translocación. La frecuencia de esta translocación en nuestro estudio, estuvo dentro de los rangos reportados por Jiménez y col., 2008, aun cuando solo se presentaron en dos casos.

Para la detección de *TEL-AML1* el cual corresponde la translocación t(12;21), se puede observar que ninguno de los 19 pacientes presentaron ser positivos para esta translocación (Figura 13).

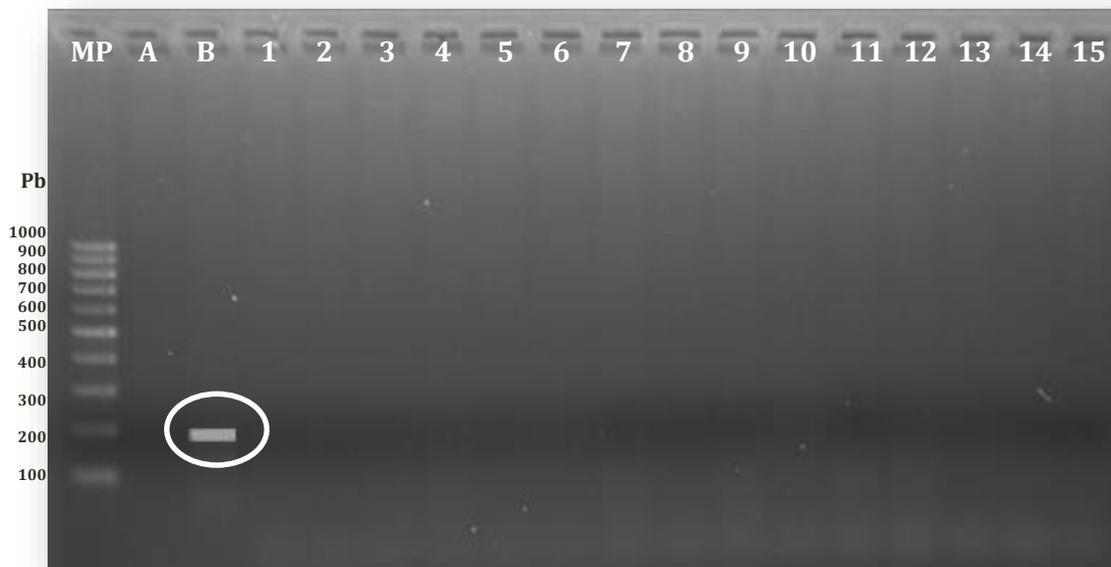


Figura 13. Detección del transcrito quimérico *TEL-AML1* en pacientes con LLA. A) Control negativo línea celular HL-60, B) Control positivo línea celular REH positivo para *TEL-AML1*, 1-15) muestras de pacientes negativos para *TEL-AML1*, MP) Marcador de peso molecular Data Sheet. 100pb a 1Kb. Caso 16-19 muestras negativas para esta translocación (datos no mostrados).

Con respecto a la frecuencia de *TEL-AML1* en población adulta se reporta de 0 a 4% (Mrózek y col., 2009), este subgrupo está caracterizado por tener un inmunofenotipo pre-B (CD10+) con morfología L1, un recuento de leucocitos de $3 \times 10^9/L$ e hiperdiploidía (Codrington y col., 2000). El transcrito *TEL-AML1* es posiblemente un suceso iniciador para la LLA en niños (Wiemels y col., 1999), comúnmente aparece in útero y es probablemente el evento inicial de la génesis de la LLA de estirpe B (Pieters y Carroll, 2008).

En el presente estudio no se encontraron positivos, lo cual concuerda con lo reportado por Jiménez y col., 2008, esta translocación se presenta en mayor frecuencia en edad pediátrica (Mrózek y col., 2009). *TEL-AML1* se ha reportado en una frecuencia de un 25% de la LLA infantil, dando un pronóstico favorable, con buena respuesta al tratamiento (Romana y col., 1995; Loh y Rubnitz 2002). La translocación $t(12; 21)(p13;q22)$ está asociada con alteraciones como: trisomía 21, pérdida del cromosoma X y tetraploidías, en ocasiones los blástos de pacientes con síndrome de Down presentan esta alteración (Loncarevic y col., 2001).

TEL-AML1 rara vez se detecta por análisis citogenéticos convencionales, se requieren de otras técnicas más sensibles para su identificación, tales como: Hibridación fluorescente in situ (FISH) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Curry y col., 2001; Hany y col., 2003).

La identificación de dicho transcrito es de gran importancia, ya que es un factor pronóstico independiente de bajo riesgo, que determina la asignación de tratamientos menos intensivos, para disminuir los efectos adversos y mejoras de la calidad de vida de los pacientes (Hany y col., 2003).

Para la detección de *E2A-PBX1* el cual corresponde a la translocación $t(1;19)$, se puede observar que ninguno de los 19 pacientes presentaron ser positivos para esta translocación (Figura 14).

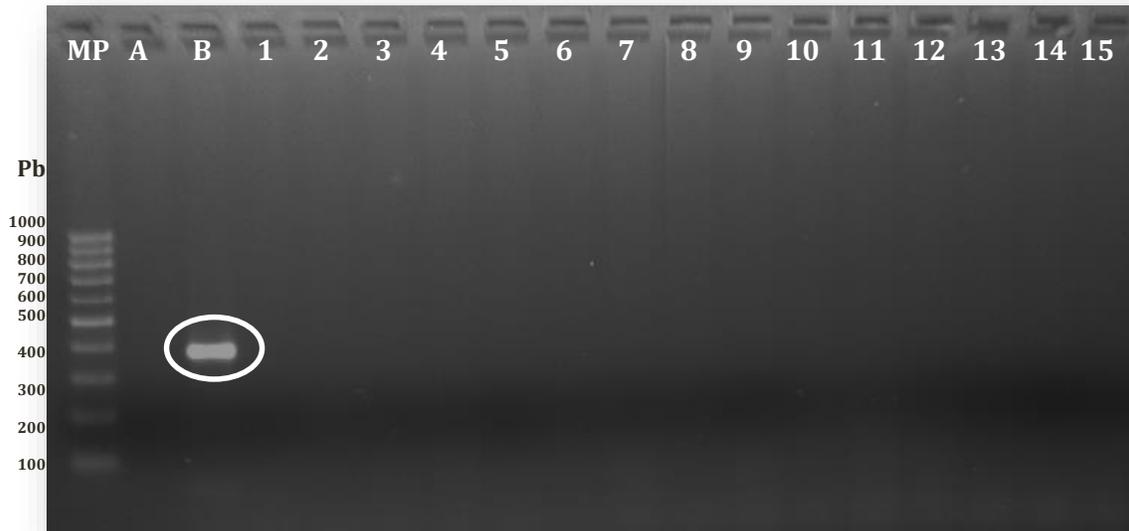


Figura 14. Detección del transcrito quimérico *E2A-PBX1* en pacientes con LLA. A) Control negativo línea celular HL-60, B) Control positivo línea celular 697 positivo para *E2A-PBX1*, 1-15) muestras de pacientes negativos para *E2A-PBX1*, MP) Marcador de peso molecular Data Sheet 100pb a 1Kb. Caso 16-19 muestras negativos para esta translocación (datos no mostrados).

Esta translocación se ha reportado que es de origen posnatal, con un recuento de células blancas de $21-28 \times 10^9 / L$ (Crist y col., 1990), su frecuencia es de 1 a 3% en población adulta (Mrózek y col., 2009) dando un pronóstico favorable al paciente con buen resultado en el tratamiento. Por el contrario la frecuencia reportada en población pediátrica en México es de un 11.5% dando un mal pronóstico al paciente (Jiménez y col., 2008). Para este estudio no se encontraron ninguna muestra positiva para esta alteración, lo cual se considera dentro de lo reportado en la literatura (Mrózek y col., 2009).

Para la detección de *MLL-AF4* el cual corresponde a la translocación $t(4;11)$, se obtuvo como resultado, que uno de los 19 pacientes, fue positivo para este transcrito quimérico (Figura 15).

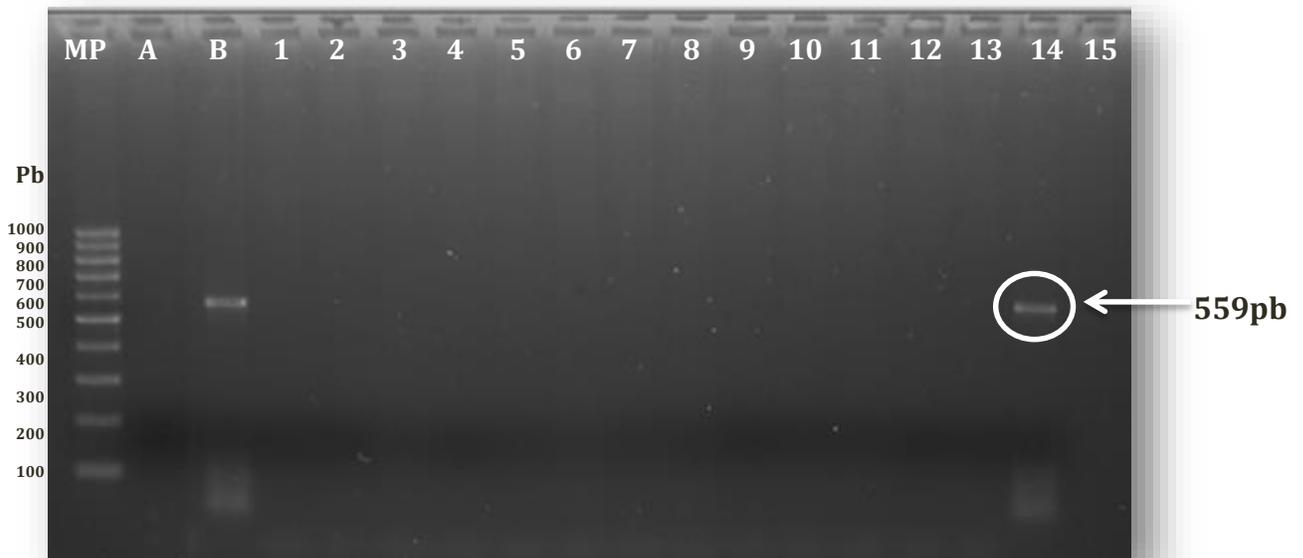


Figura 15. Detección del transcrito quimérico *MLL-AF4* en pacientes con LLA. A) Control negativo línea celular HL-60, B) Control positivo línea celular RS4 positivo para *MLL-AF4*, 1-13) muestras de pacientes con LLA negativos para *MLL-AF4*, 14) muestra de paciente con LLA positivo para *MLL-AF4*, 15) muestra de paciente con LLA negativa para *MLL-AF4* MP) Marcador de peso molecular Data Sheet 100pb a 1Kb. Caso 16-19 muestras negativas para esta translocación (datos no mostrados).

El gen *MLL* es un factor de riesgo importante en la leucemia aguda, se han identificado en diferentes estudios un total de 87 genes diferentes, de estos 51 han sido caracterizados a nivel molecular. Los 4 más frecuentes son: *AF4*, *AF9*, *ENL* y *AF10*; siendo el más frecuente el *MLL-AF4* hasta en un 50 a 70% en pacientes pediátricos menores de un año (Caslini y col., 2004).

La frecuencia reportada para esta translocación en población adulta es de 4 a 9%, dando como resultado un pronóstico adverso para el paciente, por lo que es importante su identificación del transcrito quimérico, para poderle asignar un tratamiento de quimioterapia intensiva, además de un trasplante hematopoyético (Mrózek y col., 2009). Para este estudio solo un paciente resultó ser positivo, lo cual concuerda con la frecuencia reportada por Cravioto y col., 2009.

La detección de la translocación t(4; 11) por citogenética convencional es difícil de detectar debido a la calidad inadecuada del material, ya que a menudo conduce a

resultados falsos negativos, por lo que es necesario realizar pruebas de biología molecular como es la PCR (Boomer y col., 2001)

11.5 Características clínicas de los pacientes

Se estudiaron en total 19 pacientes diagnosticados con LLA, cada paciente firmó un consentimiento informado (Anexo 1) para así permitir que se realizara la toma de muestra. El diagnóstico de LLA predominó en el sexo masculino con 10 pacientes (52.63%) y 9 (47.36%) para el sexo femenino (Figura 16).

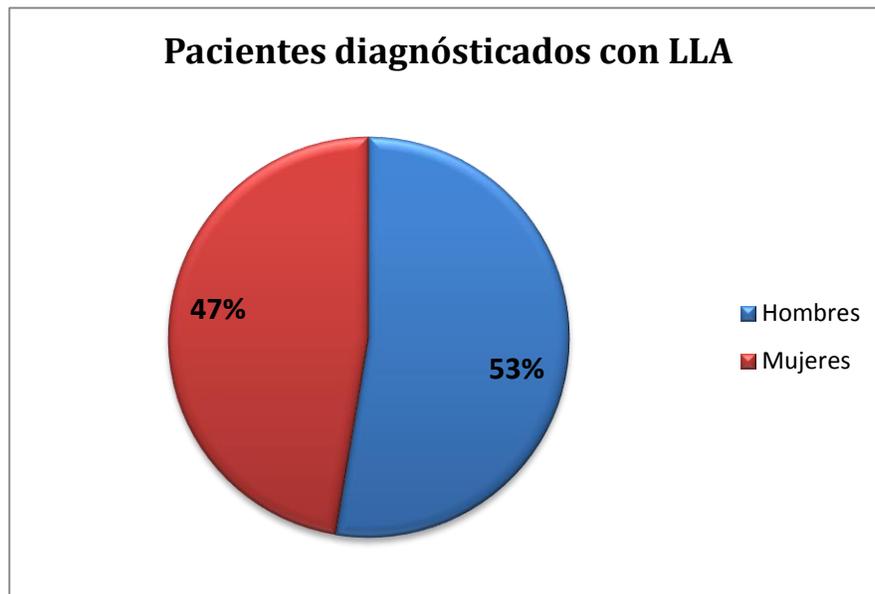


Figura 16. Diagrama de pastel representando en porcentaje la prevalencia en hombres y mujeres con LLA.

El grupo de edad con mayor incidencia fue entre 15 a 28 años de edad en 13 pacientes (78.94%), seguido del grupo de mayores de 30 a 60 años con 6 pacientes (31.57%). Las características generales de los pacientes se muestran el Cuadro 12. El promedio de cuenta de leucocitos al diagnóstico (WBC) fue de $82.12 \times 10^9/L$ (rango 7.000 a $469\,800 \times 10^9/L$). La morfología FAB que predominó fue L2 en 18 pacientes (94.73%), con inmunofenotipo Pre-B en el 100% de los pacientes. El promedio de deshidrogenasa láctica

(LDH) de los pacientes fue de 1160 UI/L (mínimo de 241 y máximo de 8400 UI/L). La mayoría de los pacientes fueron de *novo* y sólo 2 pacientes (10.52%) fueron de recaída los cuales ya presentaban una etapa de tratamiento quimioterapéutico.

Cuadro 12. Características clínicas de los pacientes con LLA

Pacientes		No. 19	
Género			
Femenino	9		
Masculino	10		
Edad (años)			
Rango	15-60		
Media	27.58		
Grupo de edad			
15-28	13		
30-60	6		
Clasificación FAB			
L2	18		
L3	1		
		% de Blastos	
		Rango	20-98
		Media	69
		Cuenta WBC (X10⁹L)	
		Rango	7- 469
		Media	82.12
		LDH (U/L)	
		Rango	241-8400
		Media	1160
		Inmunofenotipo (%)	
		Pre-B	100%
		Ingreso	
		<i>Novo</i>	17
		Recaída	2

El estudio citogenético (cariotipo) se reportó normal en 16 pacientes (84.21%), presencia de cromosoma Filadelfia en 1 paciente (5.2%), presencia de otra alteración en 1 paciente (5.2%) y 1 pacientes (5.2%) no se les realizó cariotipo o no presentó crecimiento celular, por lo cual no fueron reportados en los expedientes clínicos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Estudio citogenético y molecular de los pacientes con LLA

No. caso	Edad (años/Sexo)	Estudio citogenético	Estudio molecular
1	26/F	46,XX[20]	-----
2	18/F	46,XX[20]	-----
3	17/M	46,XY[20]	-----
4	18/M	46,XY[20]	-----
5	33/M	46,XY,t(9;22)(q34;q11)/46,XY	(<i>BCR-ABL</i> +)
6	15/F	46,XX[20]	-----
7	21/F	46,XX[20]	-----
8	17/M	46,XY[20]	-----
9	60/F	46,XX[20]	-----
10	17/M	Sin crecimiento celular	(<i>BCR-ABL</i> +)
11	17/M	45,XY dic (9:20)p(11.2q13.1)	-----
12	34/M	46,XY[20]	-----
13	41/F	46,XX[20]	-----
14	17/M	46,XY[20]	(<i>MLL-AF4</i> +)
15	57/F	46,XX[20]	-----
16	21/F	46,XX[20]	-----
17	46/M	ND	-----
18	21/M	46,XY[20]	-----
19	28/F	46,XX[20]	-----

De acuerdo a las características de los pacientes con LLA y a la revisión de sus expedientes clínicos, se pudo observar que el caso 10, el estudio citogenético no fue concluyente, debido a que no hubo suficiente crecimiento celular para realizar esta prueba, sin embargo; al realizar el estudio de Biología molecular mediante PCR presentó ser positivo para el transcrito quimérico *BCR-ABL menor* (Figura 12).

Así mismo el caso 14, el cual por citogenética convencional se reportó normal. Al realizar la PCR, se obtuvo como resultado la amplificación del transcrito *MLL-AF4* (Figura 15), lo que es de gran importancia para el médico tratante saber el resultado complementario con pruebas de biología molecular, tal como la PCR, para así designar una estratificación de riesgo, ya que esta translocación al paciente le da un pronóstico adverso con fallas al tratamiento quimioterapéutico (Hess, 2004).

La leucemia sigue siendo una de las primeras causas de muerte en población pediátrica y en la población adulta representa una de las 13 primeras causas de mortalidad (Globocan, 2012). México tiene dos principales problemas en relación con la leucemia, ya que presenta una de las mayores incidencias en el mundo (Pérez y col., 2011) y tiene tasas de mortalidad significativamente más altas para esta enfermedad en comparación con otros países (Curado y col., 2011).

Los factores relacionados para estos dos problemas en México no se entienden completamente; Sin embargo, se ha sugerido que uno de los factores en la prevalencia de la leucemia es la formación de transcritos quiméricos, asociados a la etiología y a un pronóstico en pacientes con LLA (Jiménez y col., 2008; Cravioto y col., 2009).

La LLA comprende varios subgrupos con influencia pronóstica, basados en algunas características como son la edad, cuenta de leucocitos, infiltración al sistema nervioso central, cariotipo, inmunofenotipo y estudios moleculares (Pieters y Carroll, 2008). El análisis citogenético de las células tumorales ha contribuido a la caracterización genética de la LLA, identificando alteraciones cromosómicas recurrentes con valor pronóstico y decisión terapéutica (Raimondi y col., 1993).

Los avances en el campo de la Biología molecular han permitido conocer a distintos genes implicados en el desarrollo de la leucemia, además de corroborar el diagnóstico y establecer la gravedad de la enfermedad (Raimondi y col., 1993).

Diversos grupos de investigación se han enfocado en la detección de estos transcritos quiméricos, países como la India, Republica Checa, Dinamarca, Malasia, Italia, USA, Taiwan, han basado sus pruebas moleculares en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estratificar el riesgo de los pacientes. (Pallisgaard y col., 1998; Trka y col., 1999 Ariffin y col., 2003; Hill y col., 2005). Ya que es una técnica de mayor sensibilidad y especificidad que permiten la identificación de los transcritos quiméricos que no son visibles por técnicas usuales, siendo esencial el análisis molecular para la detección de estos y monitorización de la enfermedad mínima residual (Rubnitz y Look, 1998; Nyvold y col., 2002; Mullighan y col., 2005).

Aunque a menudo se tiene problemas con la citogenética convencional (cariotipo), por la falta del crecimiento celular o por muestras de material inadecuado, los métodos basados en PCR, son más rápidos y más sensibles, el papel del cariotipo no puede ser reemplazado por completo. Esto es porque las técnicas basadas en PCR, no pueden detectar anomalías en el número cromosómico y translocaciones equilibradas desconocidas, las cuales también puede ser importante para el pronóstico del paciente. Así ambos métodos son complementarios entre sí (Hany y col., 2003).

12. CONCLUSIONES

- ❖ Se verificaron los iniciadores para la detección de los transcritos quiméricos *BCR-ABL menor*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX1* y *MLL-AF4*, con la herramienta bioinformática BLAST.
- ❖ Se estableció como prueba diagnóstica la detección de cuatro transcritos quiméricos más frecuentes *BCR-ABL menor*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX1* y *MLL-AF4* mediante PCR para los pacientes con LLA del servicio de Hematología del Hospital Juárez de México.
- ❖ Se logró estandarizar la metodología para la detección de transcritos quiméricos en líneas celulares leucémicas, para así establecerlos como controles.
- ❖ Se demostró la sensibilidad de la prueba en la detección del transcrito quimérico *BCR-ABL t(9;22)* y de *MLL-AF4 t(4;11)*, ya que por citogenética convencional no fueron detectados.
- ❖ De acuerdo a su sensibilidad y especificidad la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR, es más económica con respecto a otros métodos.

PERSPECTIVAS

1. Se clonarán las líneas celulares leucémicas para utilizarlas como controles positivos en cada determinación de transcritos quiméricos.
2. Se incrementará el número de translocaciones para tener mayores posibilidades de detección.
3. Implementar la técnica de detección de transcritos por PCR en tiempo real, ya que nos diría el número de copias de mRNA quiméricos, lo cual hace más sensible la detección, además se tendrían otras aplicaciones como la detección de enfermedad mínima residual.

13.REFERENCIAS

- ❖ Abkowitz J., Catlin S., McCallie M., Gutter P. (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*. 100:2665.
- ❖ Alcalay M., Orleth A., Sebastiani C., Meani N., Chiaradonna F., Casciari D. (2001). Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*; 20(40):5680-5694.
- ❖ Ariffin H., Chen S., Wong H., Yeoh A. (2003). Validation of a multiplex RT-PCR assay for screening significant oncogene fusion transcripts in children with acute lymphoblastic leukemia. *Singapore Med J*: 44(10):517-520.
- ❖ Artigas A., Cabrera C., Melo A., Paez F., Arriagada M., Astete A. (2006). Frecuency of TEL/AML1 and BCR/ABL fusión genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Med Chil*; 134(11) 1367-1376.
- ❖ ATCC (American Type Culture Collection). Disponible en: http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx
- ❖ Ayton P., Clearly M. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*: 20:5695-707.
- ❖ Baens M. (1996). Genomic organization of TEL: the human ETS- variant gene 6. *Genome Res* 6(5):404-413.
- ❖ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Disponible en : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- ❖ Bassan R. (2005). Evolving strategies for the management of high-risk adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 90(10):1299.
- ❖ Bedi A., Zehnbauser B., Barber J., Sharkis S. and Jones R. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83, 2038–2044.
- ❖ Bellantuono I. (2004). Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:607-620.
- ❖ Bleyer A. (1988). Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am* 35:789-814.
- ❖ Bondurant M., Koury M. (1999). Origin and development of blood cells. In: Lee G., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J., Rodgers G. editors. *Wintrob's Clinical Hematology*. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. 145: 168.
- ❖ Boomer T., Varella M., McGavran L., Meltesen L., Olsen A., Hunger SP. (2001). Detection of E2A translocations in leukemias via fluorescence in situ hybridization. *Leukemia*. 15: 95-102.
- ❖ Borowitz M., Chan J. (2008). B Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC.
- ❖ Bose S., Deininger M., Gora T. (1998). The presence of typical and atypical bcr-abl fusion genes in leukocytes of normal individuals: Biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*. 92: 3362-3367.
- ❖ Caldwell G., Kelley D., Heath C. (1980). Leukemia among participants in military maneuvers at a nuclear bomb test *JAMA* 244: 1575-8.
- ❖ Cannistra S. (1990). Chronic myelogenous leukemia as a model for the genetic basis of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*; 4: 337-357.
- ❖ Caslini C., Serna A., Rossi V., Introna M., Biondi A. (2004). Modulation and cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia*. 18: 1064-71.
- ❖ Codrington R., O'Connor H., Jalali G., Carrara., Papaioannou M., Hart S. (2000). Analysis of ETV6/AML1 abnormalities in acute lymphoblastic leukaemia: incidence, alternative spliced forms and minimal residual disease value. *Br J Haematol*; 11(4):1071-1079.
- ❖ Copelan E., McGuire E. (1995). The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 85: 1151-1168.
- ❖ Cortes E., Kantarjian H. (1995). Acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 76: 2393-2417.
- ❖ Cravioto D., González R., Mejia M. (2009). Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico city. *Leukemia and lymphoma*, vol.50, no.8: 1352-1360.

- ❖ Crist W., Carroll A., Shuster J., Behm F., Whitehead M., Vietti T. (1990). Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23,p13). A pediatric Oncology Group Study. *Blood*; 8: 1380-1384.
- ❖ Curado M., Pontes M., Guerra E., Camargo M. (2011). Leukemia mortality trends among children, adolescents, and Young adults in Latin America. *Revista Panamericana de Salud Pública* vol. 29 no.2: 96-102.
- ❖ Curry J., Glaser M., Smith M. (2001). Real time reverse transcription polymerase chain reaction detection and quantification of t(1;19) (E2A-PBX1) fusion genes associated with leukemia. *Br Haematol*; 115:826-30.
- ❖ Daser A., Rabbitts TH. (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol*; 15(3): 175-188.
- ❖ Deininger M., Goldman J., Melo J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*; 96(10): 3343: 3356.
- ❖ Diekmann D., Brill S., Garrett MD., Totty N., Hsuan J., Monfries C. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*; 351(6325): 400-402.
- ❖ Dördelmann M., Reiter A., Borkhardt A., Ludwig W., Götz N., Viehmann S. (1999). Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; 94 (4):1209-1217.
- ❖ Dorothy L., Williams A., Look T., Susan L. Melvin, Paula K., Roberson. (1984). New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell*. 36; 101-9.
- ❖ Faderl S., Kantarjian H., Talpaz M. (1998). Clinical significance of cytogenetics abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 9: 3995-4019.
- ❖ Fajardo A., Juárez S., González G., Palma V., Cerrón R., Ortega M., Mejía J. (2007). Incidence of cancer in children residing in the jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the cancer registry (a population-based study). *BMC Cancer*; 197:68-72.
- ❖ Fong C., Brodeur G. (1987). Downps syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mecanismos of leukomogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 28: 55-76.
- ❖ Ford A., Fasching K., Pamzer E., Koenig M., Haas O, Greaves M. (2001). Origins of late relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion genes. *Blood*. 98(3); 558-564.
- ❖ Fu X., McGrath S., Pasillas M. (1999). EB-1, a tyrosine kinase signal transduction gene, is transcriptionally activated in the t(1;19) subset of pre-B ALL. Which express oncoprotein E2A-PBX1. *Oncogene*: 18: 4920-4929.
- ❖ Gaussmann A., Wenger T., Elberle I., Bursen A., Brachartz S., Herr I. (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL-AF4 and AF4-

MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene*. 26: 3352-63.

- ❖ Giménez A. (1986). Sarcoma granulocítico o cloroma. *Cancer* 58: 2697-2709.
- ❖ Ginebra A. (1984). International Vocabulary of Basic and General Terms used in Methods. Organización Internacional de Normalización, 26-28.
- ❖ Globocan (2012): Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- ❖ Golub T., Barker G., Lovett M., Gililand D. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5:12) chromosomal translocation. *Cell*; 77(2): 307-316.
- ❖ Golub E., Diaz De Pagan T., Sun I., Hall A., Crane F., Isom G. (1998). Can opioids regulate hematopoietic differentiation? *Ann N Y Acad Sci*. 521: 123.
- ❖ Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell*. 71(4):701-708.
- ❖ Gutierrez A., Cantú O., Lano O., González R., Salazar R., Martínez O., Jaime J., Morales A., Tarín L., Ruiz G, Gómez. (2007). Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation is of limited value in advanced or refractory acute myeloblastic leukemia. The Mexican experience. *Hematol*. 12:193.
- ❖ Hanahan D., Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 7: 57-70.
- ❖ Hany A., Chen S., Wong H., Yeoh A. (2003). Validation of Multiplex RT-PCR Assay for Screening Significant Oncogene Fusion Transcripts in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Med J*. 44(10): 517-520.
- ❖ Harbott J., Ritterback V., Lych E. (1993). Clinical significance and cytogenetics studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM trial. *Recent Results Cancer Res* 131: 123-132.
- ❖ Heim S., Mitelman F. (1995). Acute lymphoblastic leukemia in: *Cancer cytogenetic* (ed2). New York, NY, Wiley-Lis. pp 141.
- ❖ Hess J. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med*. 10(10):500-507.
- ❖ Hill A., Short M., Varghese C., Kusumakumary P., Kumaru G., Morgan G. (2005). The t(12:21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Kerala, Southern India. *Haematologica*; 90(3): 414-416.
- ❖ Hromas R., Busse T., Carroll A., Mack D., Shopnick R., Xhang DE. (2001). Fusion AML1 transcript in a radiation-associated leukemia results in a truncated inhibitory AML1 protein. *Blood*; 97(7): 2168-2170.
- ❖ Hunger S. (1996). Chromosomal translocations involving the E2A gene in ALL: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*. 87:1211-1224.

- ❖ Hughes N And Wickramasingh E. (1991). Lecture notes on hematology. Blackwell Scientific Publications, London, pp 225.
- ❖ Ibrahim K., Daud S., Seah Y., Yeoh A., Ariffin H. (2008). Rapid Detection of Prognostically Important Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Chimeric Transcripts Using Multiplex SYBR Green Real-Time Reverse Transcription PCR. *Annals of Clinical & Laboratory Science*.
- ❖ Inaba T., Roberts WM., Shapiro LH., Jolly KW, Raimondi SC., Smith SD., Look AT. (1992). Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science*. 257; 531-4.
- ❖ Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2009). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. Disponible en: www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/.../cancer0.doc
- ❖ ISCN. (2013). Guidelines for cancer cytogenetics, supplement to an international system for human cytogenetics nomenclature. Basel: Karger.
- ❖ Jiménez S., Miranda E., Saldaña Y. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: Prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leukemia Research*, vol. 32, no. 10: 1518-1522.
- ❖ Kamps M. (1997). E2A-Pbx1 induces growth, blocks differentiation, and interacts with other homeodomain proteins regulating normal differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 220: 25-43.
- ❖ Kantarjian H., Dison D., Keating M., Taláz M., Walters R., McCredie K., Freireich E. (1988). Characteristics of accelerate disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 61:1441-1446.
- ❖ Kaufman D., Hanson E., Lewis R., Auerbach R., Thomson J. (2001). Hematopoietic colony forming cells derives from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98; 10716.
- ❖ Kersey J., Wang D., Oberto M. (1998). Resistance of t(4:11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress induced cell death: possible mechanisms for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia*. 12: 1561-64.
- ❖ Kipreos E., Wang J. (1994). Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science* 248: 217-220.
- ❖ Kurzrock R., Kantarjian H., Druker B., Talpaz M. (2003). Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*; 138(10):819-830.
- ❖ Labardini J. (2006). Leucemia aguda mieloblástica. *Hematología actualización*. ED AMEH A.C. pp. 63-66.
- ❖ Larsson J., Karlsson S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 24:56-76.

- ❖ Levi M., Michael P., Garson O. (1984). Clinical pathological characteristics of acute lymphoblastic leukemia with the 4;11 chromosomes traslocation. *Pathology* 16:63-66.
- ❖ Lewis J., Schwartz M. (1998). Integrins regulate the association and phosphorylation of paxilin by c-Abl. *J Biol Chem* 273: 14225-14230.
- ❖ Lo CF., Pisegna S., Diverio D. (1997). The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 82(3): 364-370.
- ❖ Loncarevic I., Roizheim B., Ritterbach J., Viehmann S., Borkhardt A., Lampert F., Harbott J. (2001). Trisomy 21 is a recurrent secondary aberration in childhood acute lymphoblastic leukemia with TEL/AML1 gene fusion. *Genes Chromosomes Cancer*; 24:272-7.
- ❖ Loh M and Rubnitz J. (2002). TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr. Opin. Hematol.* 9, 345–352.
- ❖ London S., Thomas D., Bownman J. (1991). Exposure to residential electric and magnetic field and risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol* 134: 923-937.
- ❖ Londoño J. (2004). Metodología de la investigación epidemiológica. 3ª ed. Ed. Manual Moderno.
- ❖ Look A. (1998). Aneuploidy and percentage of S-phase cell determined by cytometry correlated with cell phenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 60: 959-964.

- ❖ Lu Q., Wright D., Kamps M. (1994). Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the (1;19). *Mol Cell Bio*; 14: 3938-3943.
- ❖ Margolin J., Steuber C., Poplack D. (2001). Acute lymphoblastic leukemia. In: *Principles and practice of pediatric Oncology*, 4th ed, Pizzo PA, poplck DG (eds), Lippincott-Raven, Philadelphia p. 489.
- ❖ Marti R., Fernandez M., Barreiro M. (2001), Cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *An Esp Pediatr*; 55(1): 45-52.
- ❖ Maver A., Bowman W., Dow L. (1982). Acute lymphoblastic leukemia biological markers of clinical responser. *J cell Physiol (suppl)* 1:127-32.
- ❖ Mayani H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*. 34: 3.
- ❖ Mayani H., Flores E., Pelayo R., Montesino J., Flores P., Chávez A., (2007). Hematopoiesis. *Cancerología*. 2: 95-107.

- ❖ Mayani H. (2009). Células troncales y hematopoyesis. Ed. Mensaje bioquímico. Facultad de medicina, UNAM. Vol. XXXIII.
- ❖ Mayani H., Flores E., Chávez A. (2009). In vitro biology of human myeloid leukemia, *leuk Res.* 33:624-637.
- ❖ McWhirter J., Wang J. (1993). An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* 12: 1533: 1546.
- ❖ Metcalf D. (2001). Some general aspects of hematopoietic development hematopoiesis. A developmental approach. ED Oxford. 3-14.
- ❖ Meyer C., Schneider B., Jakob S., Strehl S., Attarbaschi A., Schnittger S. (2006). The MLL recombinome of acute leukemia. *Leukemia.* 20; 777-84.
- ❖ Mirro J., Kitchingman G., Williams D. (1996). Clinical and laboratory characteristics of acute lymphoblastic leukemia with the 4;19 translocation. *Blood* 67:689-697.
- ❖ Montesinos J., Mayani H. (2002). New concepts in the biology of acute myeloid leukemia. *Gac Med Mex* 138:67-76.
- ❖ Mrózek K., Heerema A., Blomfield D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood reviews.* 18;115-136.
- ❖ Mrózek K., Harper D., Aplan P. (2009). Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin Noeth Am;* 23(5): 19.
- ❖ Mullighan C., Flotho C., Downing J. (2005). Genomic assessment of pediatric acute leukemia. *The Cancer J;* 11(4): 268-282.
- ❖ Munker R. (2000). *Modern hematology.* 1ra ed. Hunan Press USA.
- ❖ National Cancer Institute. Disponible en: (<https://www.meb.uni-bonn.de/Cancernet/CDR0000062923.html>).
- ❖ Nyvold C., Madsen H., Ryder L., Seyfarth J., Svejgaard A., Clausen N. (2002). Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood;* 99 (4): 1253-1258.
- ❖ Oberlin E., Hafny B., Petit C., Souri M. (2010). Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression. *Int. J. Dev. Biol.* 54;116-73.
- ❖ O'Brien M., Lacayo N. (2008). Acute leukemia in children. *Dis Mon;* 54:202-225.
- ❖ Ogawa M., Matzunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cell. *Annu Acad Sci.* 872:17.
- ❖ Ottman O., Wassmann B. (2005). Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematology;* 118-122.

- ❖ Orkin S. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol. Chem.* 270:4955-4958.
- ❖ Orlic D and Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up?. *Blood.* 84: 3991.
- ❖ Pakakasama S., Kajanachumpol S., Kanjanapomkul S., Sirachainan N., Meekaewkunchorn A., Ningsanond V., Hongeng S. (2008). Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 30, 286-291.
- ❖ Pallisgaard N., Hokland P.m Riishoj D., Pedersen B., Jorgensen P. (1998). Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood:* 92(2): 574-588.
- ❖ Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F & Rotol B. (1996). Neutrophilic-chronic myelogenous leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with c3a2 junction). *Blood* 88: 2410.
- ❖ Peeters P., Raynaud SD., Cools J., Wlodarska I., Grosgeorge J., Philip P. (1997). Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood.* 90(7): 2535-2540.
- ❖ Pérez M., Fajardo R., Bernáldez R. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico city: descriptive epidemiology. *BMC cancer.* Vol. 11: 355.
- ❖ Pieters R, Carroll WL. (2008). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clin N Am;* 55:1-20.
- ❖ Piu C. (1992). Acute leukemia with the t(4;11)(q21;q23). *Leukemia and Lymphoma* 7:173-179.
- ❖ Pui C., Evans W. (1998). Acute Lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med;* 339-605-612.
- ❖ Pui C., John S., Pullen J. (1995). Childhood leukemias. *N Engl J Med;* 332:1618-1630.
- ❖ Pui C., Raimondi S., Hamcock M., Rivera G., Ribeiro R., Mahmoud H. (1994). Immunologic, cytogenetic and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1:19)(q23;p13) or its derivative. *J. Clin Oncol.* 12: 2601-6.
- ❖ Pui C., Relling M. (2004). Acute Lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* Apr 8; 350(15): 1535-48.
- ❖ Pui C., Pei D., Sandlund J., Ribeiro R., Rubnitz J., Raimondi S., Onciu M., Campana D., Kun L., Jeha S. (2010). Long-term results of St Jude total therapy studies 11,

- 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(2):371–382.
- ❖ Pui C., Mullighan W., Evans E., Relling V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?. *Blood*, vol 120 no. 6: 1165-1174.
 - ❖ Quintero M. (1999). Resultados del tratamiento de leucemia linfoblástica aguda en niños. *Colombia Med*; 30 (4): 148-156.
 - ❖ Raimondi S., Pui C., Head D., Rivera G., Behm F. (1993). Cytogenetically different leukemic clones at relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82(2):576-580.
 - ❖ Raimondi S. (1993). Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*; 81(9):2237-2251.
 - ❖ Rinsky R., Smith A., Hornung R. (1987). Benzene and leukemia: An epidemiologic risk assessment. *N Engl Med* 316:1044-50.
 - ❖ Rivera R. (1994). Diagnóstico del niño con cáncer, Mosby/doyna. México, 234-237.
 - ❖ Romana S., Poirel H., Leconiat M., Flexor MA., Mauchauffe M., Jonveaux P. (1995). High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 86(11):4263-4269.
 - ❖ Roper M., Crist WM., Metzgar R., Ragab AH., Smith S. Starling K. (1983). Monoclonal antibody characterization of surface antigens in childhood T-cell lymphoid malignancies. *Blood*. 61: 830-837.
 - ❖ Ross J., Davies S., Potter J., Robinson L. (1994). Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol Rev*; 16(2):243-272.
 - ❖ Rowley J. (1998). The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu Rev Genet*; 32:495-519.
 - ❖ Rowley J. (1999). The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin Hematol*. 36(4 Suppl 7): 59-72.
 - ❖ Rubnitz J., Look T. (1998). Molecular genetics of childhood leukemias. *J Pediatr Hematol Oncol*; 20 (1):1-11.
 - ❖ Rubnitz J., Look A. (1999). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia, en Pui CH: Childhood leukemias. EUA, Cambridge University Press, pp 197-218.
 - ❖ Rubnitz J., Pui C., Downing J. (1999). The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia*. 13(1):6-13.
 - ❖ Ruiz A., Rivadeneyra L., Duque R., Orfao A. (2006). Latin American Consensus Conference. Report on the second Latin American conference for flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Cytometry B Clin Cytom*. Jan;70(1):39-44.

- ❖ Ryan K., Phillips A., Voused K. (2001). Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *CurrOpin Cell Biol.* 13:332
- ❖ Saffroy R., Lemoine A., Brézillon P., Frénoy N., Delmas B., Goldschmidt E. (2000). Real-time quantitation of bcr-abl transcripts in haematological malignancies. *Eur J Haematol*; 65: 258-266.
- ❖ San M., Duque R. (1996). *Leucemias Agudas*. Ed. Panamericana. Pp 130.
- ❖ Sandler D., Ross J. (1997). Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol*; 24(1):3-16.
- ❖ Sawyer C., McLaughlin J., Goga A. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77: 121-131.
- ❖ Sawyers C., McLaughlin J., Goga A. (1997). Genetic requirement for RAS in the trnasformation of fibroblasts and hematopoyetic cell by the bcr-abl oncogene. *J Exp Med* 181:307-313.
- ❖ Secker W., Hawkins J., Janossy G. (1990). Independent prognosis significance of karyotype in adults with acute lymphoblastic leukemia and an increase in poor risk chromosome features with advancing age at diagnosis. *Blood.* 76:319-323.
- ❖ Secker W., Craig M. (1993). Pronostic implications of breakpoint and heterogeneity in Philadelphia-Positive in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 7:147-151.
- ❖ Secker W. (1997). *Chromosomes and genes in acute lymphoblastic leukemia*. Ed. Champam y Hall. New Yorck, pp 167.
- ❖ Seeger K., Hans P., Buchwald D., Beyermann B., Kremens B., Niemeyer C., Ritter J., Schwabe D., Harms D., Schrappe M., Henze G. (1998). TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 91: 1716-1722.
- ❖ Shaw M., Eden O., Grace E. (1992). Acute Lumphoblastic Leukemia and Klinefelter's syndrome. *Pediatr Hemat Oncol* 9:81-85.
- ❖ Shtivelman E., Lifshitz B., Gale RP., Canaani E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature*, 315: 550-554.
- ❖ Shurtleff SA., Buijs A., Behm FG., Raimondi SC., Hancock ML., Chan GC-F., Pui CH. Grosveld G. Downing JR. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from cryptic t(12:21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia.* 9:1985-1989.
- ❖ Smith M., Arthur D., Camitta B., Carroll A., Crist W., Gaynon P. (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignments in infant acute lymphoblastic leukemia. *J Clini Oncol*; 14(1):18-24
- ❖ Stone R., O'Donnell M., Sekeres M. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 98-117.

- ❖ Stong R., Korsmeyer S., Parkin J., Stong R., Parkin J. (1985). Human acute leukemia cell line with the t(4:11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. *Blood*; 65: 26-31.
- ❖ Sudhakar N., Rajalekshmy k., Rajkumar T., Karunakaran N. (2011). RT-PCR and real-time PCR analysis of E2A-PBX1, TEL-AML1, mBCR-ABL and MLL-AF4 fusion gene transcripts in de novo B-lineage acute lymphoblastic leukaemia patients in South India. *Journal of Genetics*, v. 90: 350-351.
- ❖ Teachey T and Hunger D. (2013). Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia. *British Journal of Haematology*, vol. 162 no. 5: 606-620.
- ❖ Trka J., Zuna J., Haskovec C. Brabencova A. Kalinova M., Muzikova K. (1999). Detection of BCR-ABL, MLL-AF4 and TEL-AML1 hybrid genes and monitoring of minimal residual disease in pediatric with acute lymphoblastic leukemia. *Cas Lek Cesk*: 138(1): 12-17.
- ❖ Van Dongen J., Macintyre E., Gabert J., Delabesse E., Rossi V., Saglio G. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 13(12):1901-1928.
- ❖ Van Etten R. (1999). Cycling stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*, 9(5); 179-186.
- ❖ Verfaille C., Hurley R., Lundell B., Zhao C., Bhatia R. (1997). Integrin-Mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors?. *Acta Haematol*; 97(1-2): 40-52.
- ❖ Wang J. (1998). Cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. 10(2): 240-247.
- ❖ Wang L., Swat W., Fujiwara Y., Davison L., Visvader J., Kuo F. (1998). TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev*: 12(15): 2392- 2402.
- ❖ Wang Y. (2000). Integrative signaling through c-Abl, en: Signaling network and cell cycle control cap. 16. (Eds). Silvio Gutkind J. ed. Human Press, Totowa, New Jersey.
- ❖ Wetzler M., Talpaz M., Yee G., Stass SA., Van Etten RA., Andreeff M. (1995). Cell cyclereLATED shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92(8): 3488-3492.

- ❖ Wiemels J., Cazzaniga G., Daniotti M., Eden O., Addison G., Masera G. et al. (1999). Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354, 1499–1503.
- ❖ Wintrobe M. (1981). *Clinical Hematology*. 8a ed. Philadelphia.
- ❖ Wlodska I., Starza R., Baens M., Dierlamm J., Uyttebroeck A., Selleslag D., Francine A., Mecuci C., Hagemeyer A., Vanden H., Maryen P. (1998). Fluorescence in situ hybridization characterization of new translocation involving TEL (ETV6) in a wide spectrum of hematologic malignancies. *Blood*. 91, 4, 1399-1406.
- ❖ Wong M. (2005). Real time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 39(1).
- ❖ Yin T., Li L. (2006). The stem cell niches in bone. *The journal of Clinical Investigation* 116: 1195-1201.
- ❖ Zambrano I., Santiago O., Weiss S., Caseres C. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Revista de Investigación Clínica*. 51: 53-66.

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA.

1. Información sobre el estudio.

Se conoce que el cáncer es producido por errores en la programación génica normal que guía la multiplicación, especialización y muerte celular. Por lo que en este estudio se trata de esclarecer los programas génicos y establecer cómo se alteran durante el desarrollo de la leucemia.

De acuerdo a esto se me ha invitado a participar en un estudio de investigación, éste involucra a personas afectadas con Leucemia aguda linfoblástica y donar una muestra de sangre periférica obtenida durante mi estancia en el hospital este conducto se solicita mi consentimiento para realizar el análisis genómico en el número de copias y los estudios que de ello deriven.

Procedimiento.

Se tomarán 5-10 mL de sangre periférica (dos tubos) antes del tratamiento y se tomarán cuando cumplan con las características necesarias para participar en el estudio.

a. Riesgos:

Son exclusivos de la punción venosa y se refiere a la necesidad de punción en más de una ocasión en casos excepcionales. También puede desarrollarse hematoma, mismo que se resuelve espontáneamente.

Beneficios:

Los resultados de este estudio ayudarán al diagnóstico, ya que aportará información útil a futuro para mejorar el entendimiento de esta enfermedad.

2. Confidencialidad.

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin mi consentimiento por escrito.

3. Participación / suspensión.

Mi participación en este estudio es voluntaria. Estoy en libertad de decidir no participar en el mismo al no autorizar el análisis molecular de la muestra de tejido tumoral obtenido en la biopsia. El rehusarme a participar en este proyecto de investigación no afectará mi atención médica.

4. Contacto

En caso de requerir más información o duda respecto a su participación y derechos, se puede contactar con la M en C. Mónica Sierra Martínez al tel: 57477634



5. Consentimiento.

La M en C. Mónica Sierra, investigador responsable del proyecto y la cual reconoce el compromiso que implica solicitar y aplicar la carta de consentimiento informado, se ha encargado de explicarme los pormenores del mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo alguna duda deberé comunicarme con ella al teléfono 57477560 ext 7330 o acudir personalmente a la Unidad de Investigación, laboratorio 3 de Genética y Diagnóstico molecular del Hospital Juárez de México.

Al firmar este documento, yo accedo voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Nombre del testigo: _____