



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**“Estandarización de una técnica molecular
para identificar los transcritos quiméricos
RUNX1-RUNX1T1, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-
MYH11*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

Presenta

Martínez Martínez Erick

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

ASESORA INTERNA: Biól. Reynalda Roldán Pérez



México, CDMX, Agosto 2016



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.

El presente 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.

Índice

Índice de figuras.....	1
Abreviaturas	2
Índice de cuadros.....	4
Resumen.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Generalidades de la leucemia mieloide aguda.....	7
3. Epidemiología y etiología	7
4. Cuadro clínico	9
4.1. Diagnóstico.....	9
4.2. Factores pronósticos	10
5. Clasificación de la leucemia mieloide aguda	11
5.1. Clasificación FAB	12
5.2. Clasificación OMS	13
5.2.1. LMA mínimamente o no diferenciada (M0).....	15
5.2.2. LMA sin maduración (M1).....	15
5.2.3. LMA con maduración (M2).....	16
5.2.4. Leucemia promielocítica aguda (M3).....	17
5.2.5. Leucemia mielomonocítica aguda (M4)	17
5.2.6. Leucemia monocítica aguda (M5).....	18
5.2.7. Leucemia eritrocítica aguda o eritroleucemia (M6)	18
5.2.8. Leucemia megacariocítica aguda (M7).....	19
6. La citogenética en la leucemia mieloide aguda	20
6.1. Alteraciones cromosómicas numéricas.....	21
6.2. Alteraciones cromosómicas estructurales	21
7. Alteraciones más frecuentes.....	22
7.1. LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	22
7.2. LMA con inv(16)(p13.1q22); <i>CBFB-MYH11</i>	24
7.3. LMA con t(9;22)(q34;q11); <i>BCR-ABL</i>	25
7.4. LMA con t(15;17)(q22;q21); <i>PML-RARα</i>	27

8.	Clasificación de grupos de riesgo en el pronóstico de la enfermedad.....	28
8.1.	Grupo de riesgo favorable	29
8.2.	Grupo de riesgo intermedio	29
8.3.	Grupo de riesgo adverso	30
9.	La genética molecular en la leucemia mieloide aguda	31
9.1.	Métodos moleculares aplicados al diagnóstico.....	31
9.1.1.	PCR.....	32
10.	Antecedentes.....	34
11.	Planteamiento del problema	35
12.	Justificación.....	35
13.	Hipótesis.....	36
14.	Objetivos	36
14.1.	Objetivo general	36
14.2.	Objetivos particulares	36
15.	Material y métodos	37
15.1.	Muestras clínica	37
15.2.	Extracción de ARN.....	37
15.2.1.	Integridad del ARN y síntesis de ADNc.....	37
15.3.	Obtención de líneas celulares.....	38
15.4.	Microscopia	39
15.5.	Consulta bibliográfica para la estandarización de los oligos para la detección de los transcritos quiméricos	40
15.6.	Evaluación para PCR en punto final.....	41
15.7.	Visualización de los productos de PCR	42
16.	Resultados	43
16.1.	Concentraciones de muestras para la estandarización de la detección de los transcritos quiméricos	43
16.2.	PCR <i>in silico</i> de los iniciadores para la detección de los transcritos quiméricos.....	44
16.3.	Características clínicas de las muestras de pacientes con LMA.	46
16.4.	Detección del gen endógeno ABL para validación del ADNc	48
16.5.	Detección del gen <i>BCR-ABL</i>	49
16.6.	Detección de gen <i>PML-RARα</i>	50

16.7.	Detección del gen <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	51
16.8.	Detección del gen <i>CBFB-MHY11</i>	52
17.	Discusión.....	55
18.	Conclusiones.....	59
19.	Perspectivas.....	59
20.	Referencias bibliográficas.....	60

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia de leucemia de acuerdo al género.....	8
Figura 2. Puntos de ruptura en los cromosomas 8 y 21	24
Figura 3. Isoformas del transcrito de fusión CFBF-MYH11	25
Figura 4. Localización de los puntos de rompimiento en los genes BCR y ABL.....	26
Figura 5. Localización de los genes PML y RAR α	28
Figura 6. Esquema general de la técnica de RT-PCR.....	33
Figura 7. Programa Blast utilizado para la verificación de los iniciadores	45
Figura 8. Porcentaje de relación de muestras de acuerdo al género.....	46
Figura 9. Detección del gen endógeno ABL en muestras de pacientes con LMA.....	48
Figura 10. Detección del gen endógeno ABL en muestras de pacientes con LMA.....	49
Figura 11. Detección del transcrito quimérico <i>BCR-ABL</i> Mayor para muestras de pacientes con LMA	50
Figura 12. Detección del transcrito quimérico PML-RAR α en muestras de pacientes con LMA.....	51
Figura 13. Detección del transcrito quimérico <i>RUNX1-RUNX1T1</i> para muestras de leucemia mieloide aguda.....	52
Figura 14. Detección del transcrito quimérico <i>CBFB-MHY11</i> para muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda	53
Figura 15. Detección del transcrito quimérico <i>CBFB-MHY11</i> para muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda.....	53

Abreviaturas

μl	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN Complementario
CBF	Core Binding Factor
CID	Coagulopatía Intravascular Diseminada
CM	Cariotipo Monosómico
CN	Cariotipo Normal
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
CTH	Células Troncales Hematopoyéticas
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FAB	Franco Américo Británico
FISH	Hibridación in situ con Fluorescencia
FLT3	Fms-Related Tyrosine Kinase 3
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
mARN	Ácido Ribonucleico Mensajero
MH	Microambiente Hematopoyético
MIC	Morfológica, Inmunológica y Citogenética
ml	Mililitro
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia gene

mm	Milímetro
MPO	Mieloperoxidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ph+	Cromosoma Filadelfia Positivo
RC	Remisión Completa
RPM	Revolución por Minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SMD	Síndromes Mielodisplásicos

Índice de cuadros

Cuadro 1. Factores pronósticos adversos en la LMA.	11
Cuadro 2. Clasificación de la FAB de las leucemias mieloides agudas (2008).	12
Cuadro 3. Clasificación de la OMS de la LMA y neoplasias mieloides.	13
Cuadro 4. Grupos de clasificación de la LMA de acuerdo a MIC, FAB y cariotipo.	14
Cuadro 5. Incidencia de subtipos en leucemia mieloides aguda.	20
Cuadro 6. Frecuencia de incidencias anuales de genes de fusión en LMA.	22
Cuadro 7. Clasificación de riesgos basados en citogenética y anomalías moleculares.	29
Cuadro 8. Mezcla para la síntesis del ADNc para realizar el PCR en punto final.	38
Cuadro 9. Condiciones para la síntesis de ADNc.	38
Cuadro 10. Características generales de las líneas celulares leucémicas de estudio.	39
Cuadro 11. Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de punto final para la detección de los transcritos quiméricos en LMA.	40
Cuadro 12. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para la detección de transcritos quiméricos.	41
Cuadro 13. Condiciones para la amplificación del gen endógeno ABL en muestras de LMA por PCR punto final.	42
Cuadro 14. Condiciones para la amplificación por PCR en punto final para la detección de los transcritos quiméricos en LMA.	42
Cuadro 15. Concentraciones obtenidas de las extracciones de ARN, visualizadas en espectrofotómetro.	43
Cuadro 16. Producto de PCR para las secuencias de iniciadores.	45
Cuadro 17. Características clínicas de los pacientes con LMA.	47
Cuadro 18. Diagnóstico inicial y resultado molecular de pacientes con LMA.	54

Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es el resultado de una alteración neoplásica, que lleva como resultado un incremento de células hemáticas inmaduras, presentando un incremento de números de casos en los últimos años, teniendo un mayor índice de mortalidad en personas mayores de 65 años.

La finalidad del presente trabajo fue estandarizar la detección de los transcritos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*, los cuales tienen un mayor índice de incidencia, por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que la identificación por medio de PCR es una herramienta que puede dar un resultado en menor tiempo, en contraste con otros métodos como lo es el cariotipo, el cual puede presentar en algunos casos fallas al momento del análisis, esto con el propósito de dar un mejor pronóstico a los pacientes que ingresen al servicio de hematología del hospital Juárez de México, lo que tendrá un mayor beneficio en costos y tiempo.

Se estandarizó la detección de los transcritos quiméricos para la detección en 19 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LMA. De las cuales se obtuvo 3 muestras positivas para el transcrito quimérico *PML-RAR α* . Es así como se puede demostrar la sensibilidad de la técnica, aun cuando el cariotipo sea normal, puede no detectarse por medio de PCR por lo que se tiene que hacer mejoras para usarla para completar el estudio para el diagnóstico de los pacientes con LMA.

1. INTRODUCCIÓN

En la sangre, donde las células maduras tienen una vida muy corta, se generan millones de células diariamente, originando grandes cantidades de 9 distintos tipos de células maduras (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos T, linfocitos B y células NK) (Wintrobe, 1981; Gordon Barret, 1985). Este proceso a través del cual se generan las células de la sangre se denomina hematopoyesis y ocurre bajo condiciones muy específicas en el interior de los huesos, en la llamada médula ósea (MO) (Torok, 1988) y está regulado por varios factores. Este sistema puede ser dividido en base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes que de él se generan, identificando cuatro compartimentos: el primero de ellos está constituido por las células troncales hematopoyéticas (CTH), el segundo por las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las células precursoras se encuentran en el tercer compartimento y por último las células sanguíneas circulantes en el cuarto compartimento (Wognum y Eaves, 2003) (Civin y Gore, 1993). Estas células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico denominado microambiente hematopoyético (MH) (Mayani y Guilbert, 1992), el cual consiste en una estructura tridimensional altamente organizada de células del estroma de la MO que regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas (Long y Wicha, 1993) (Perkins y Fleischman, 1988). Al ocurrir alteraciones en alguno de los compartimentos celulares del sistema hematopoyético, sobre todo en los más primitivos (Petzer y Gunsilius, 2003), la producción de células sanguíneas puede verse modificada, conduciendo a estados fisiológicos delicados (Mundle, 2003). Estas alteraciones pueden dar como resultado enfermedades como la anemia aplásica, las leucemias y los síndromes mielodisplásicos (SMD), derivadas específicamente de anomalías en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (Hope y Jin, 2003). En los últimos años se ha hecho más evidente la presencia de anomalías citogenéticas en estas enfermedades, algunas de ellas asociadas a un tipo morfológico y/o inmunofenotipo específico (Rojas y col., 2000). Una teoría con predicamento en los citogenetistas es que ciertas leucemias con cariotipo normal (CN) presentan alteraciones crípticas, por debajo del nivel de resolución del cariotipo, con lo que técnicas con mayor poder resolutivo pueden identificar nuevas alteraciones.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda (LMA) la cual tiene orígenes mielocitos o granulocitos (Cheson y Cassileth, 1990) representa, a su vez, un subgrupo heterogéneo de leucemias agudas con diferencias en la etiopatogenia, historia natural y pronóstico (Merino, 2010). Se caracterizan por una rápida expansión clonal de mieloblastos que se acumulan en médula ósea y sangre periférica, que lleva como resultado un incremento acelerado de la población de células hemáticas inmaduras que desplazan a la población celular normal con la consecuente falla medular; producen además infiltración extramedular como puede ser en bazo, hígado, piel, encías y sistema nervioso central (2010). La LMA es el tipo de leucemia aguda más común en adultos (Casanovas y Slimane, 2003; Fadoo y Mushtaq, 2012) y se ve incrementada de forma importante en personas mayores de 65 años (2010), con una incidencia mayor en varones que en mujeres (Romero, 2002). La tasa de supervivencia a largo plazo es de 25-70% en pacientes menores de 60 años y solo 10-15% en los pacientes de edad avanzada (Vardiman, 2008).

3. Epidemiología y etiología

De forma general, las leucemias se encuentran dentro de las principales causas de morbilidad y mortalidad relacionadas con el cáncer (Tirado y col., 2007). La incidencia de la leucemia aguda se ha incrementado a 30.9% en un lapso de 40 años, teniendo un incremento progresivo con la edad (Candelaria y col., 2009). En México, el Registro Epidemiológico de Neoplasias Malignas informa por cada 100, 000 habitantes de la población general una incidencia anual de leucemias agudas fue de aproximadamente el 2%; y la LMA represento el 0.7%, con mayor representación en varones (Figura 1) (Crespo, 2010).

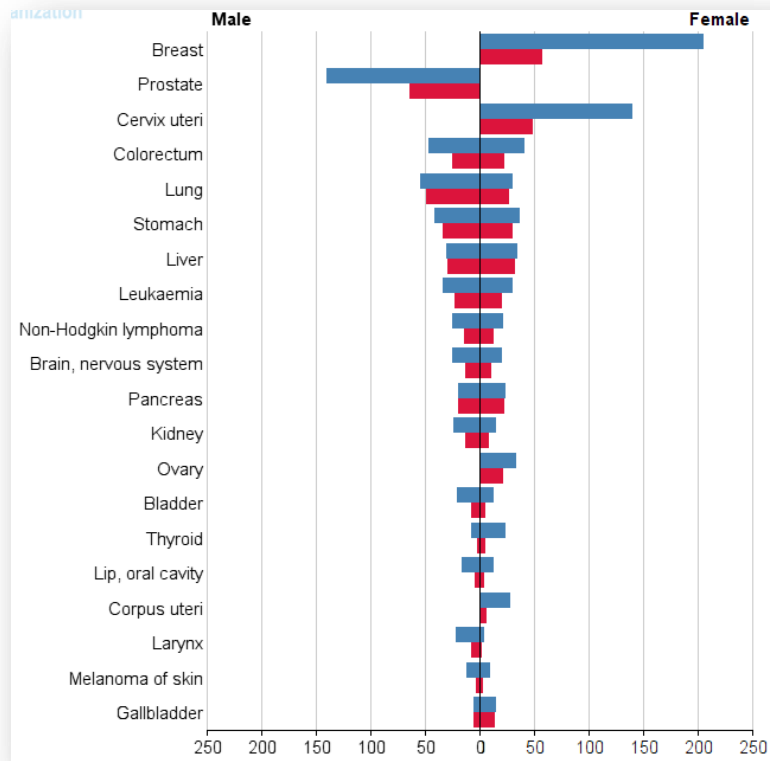


Figura 1. Incidencia de leucemia de acuerdo al género. Tomado de Globocan, 2012.

Entre los diferentes tipos de cáncer, la leucemia es la neoplasia que con más frecuencia se asocia a radiaciones ionizantes, y de estas la estirpe mieloide es la más frecuentemente afectada. El riesgo de desarrollar una leucemia aguda tras radiaciones esta en relación directa con la dosis, el tiempo de exposición y la superficie corporal expuesta.

También hay agentes químicos asociados con la génesis de algunos casos de LMA, entre estos destaca la exposición prolongada al benceno. Asimismo, se ha observado un incremento del riesgo de desarrollar una leucemia secundaria en pacientes tratados con quimioterapia por diferentes tipos de cáncer, hematopoyéticos o no. Entre los fármacos administrados a los pacientes con neoplasias destacan, por su asociación con mayor riesgo de leucemia secundaria, los agentes alquilantes (ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo o tiotepa), procarbazona, nitrosureas, antibióticos antitumorales (antraciclinas) y epidofilotoxinas. Las leucemias que aparecen en asociación con estos fármacos suelen ir precedidas de un período de pancitopenia o displasia y se asocian con un mal pronóstico.

Además de un componente de susceptibilidad individual, la LMA se ha descrito con una mayor incidencia en pacientes con cromosomopatías como el síndrome de Down (Hasle y col., 2000), con síndromes caracterizados por una reparación defectuosa del ADN (Taylor, 2001) o con el síndrome plaquetario familiar (Minelli y col., 2004).

4. Cuadro clínico

Los síntomas y signos que presentan los enfermos con LMA reflejan el fracaso de la hematopoyesis normal y la infiltración de los tejidos por la celularidad leucémica (Sanz, 2001). Debido a que el hallazgo de algunas células blásticas en medula ósea o sangre periférica no indica la existencia de leucemia aguda, para hacer el diagnóstico correcto se requiere de un examen simultáneo de sangre periférica y medula ósea (Sans, Besses y col., 2005). Entre el 30 y 80% de los enfermos presenta fiebre antes o en el momento del diagnóstico y el 40% refiere manifestaciones hemorrágicas en piel y/o mucosas debido al descenso de la cifra de plaquetas o a la existencia de coagulación intravascular. La infiltración leucémica en diferentes tejidos es responsable de algunos síntomas y signos como la hepatomegalia y/o esplenomegalia presente en una tercera parte de los pacientes. Aproximadamente en el 25% de los enfermos existen adenopatías, hipertofria gingival o infiltración amigdalal. Por último, pueden detectarse tumoraciones constituidas por blastos, que se denominan cloromas o sarcomas granulocíticos (5% de los casos). Alrededor del 30-40% de los enfermos con LMA presentan una infección en el momento del diagnóstico.

4.1. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en los criterios establecidos por el grupo FAB (Franco- Americano- Británico), que considera que la leucemia aguda es establecida cuando al menos el 30% de las células no eritroides totales en la medula ósea son blastos o tienen la característica de una leucemia promielocítica aguda (Bennett y Catovsky, 1985) con criterios citológicos y citoquímicos que se utilizan para distinguir los distintos tipos de LMA. Otros recomiendan que el criterio para el diagnóstico de leucemia aguda será aceptada cuando el porcentaje de blastos en sangre periférica sea mayor del 30% (Cason y Trujillo, 1989), mientras que la

clasificación de la OMS desde el 2001 utiliza el mayor al 20% de blastos en sangre periférica o medula ósea como criterio diagnóstico (Jaffe y col., 2001), excepto en el caso de las leucemias con translocaciones específicas, en las que se acepta una proporción inferior, y en la leucemia eritroide aguda que se define por la presencia de más de un 50% de precursores eritroides en la medula ósea asociada a más de un 20% de mieloblastos entre las células no eritroides, tomando en cuenta datos citológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos y genéticos (Owaidah y Al Beihany, 2006).

4.2. Factores pronósticos

En general, el pronóstico de los pacientes con LMA está condicionado por factores que pueden dividirse entre los relacionados con características del paciente y los relacionados con características biológicas de la leucemia, como son la edad, la cifra de leucocitos al momento del diagnóstico y el que se trate de una leucemia aguda de *novo* o secundaria, trastornos hematológicos previos, antecedentes de quimio/radioterapia, alteraciones moleculares, persistencia de enfermedad mínima residual (Dohner H., 2010). Los datos inmunofenotípicos también son importantes, especialmente durante el seguimiento de los pacientes mediante la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR). Los pacientes jóvenes tienen más probabilidades de alcanzar la remisión completa (RC) que los de edad avanzada, sobre todo porque la mortalidad en inducción y durante el tratamiento post-remisión es menor. Además, la edad avanzada se asocia de forma más frecuente a cariotipos complejos y a mayor resistencia a la quimioterapia como se muestra en el cuadro 1, donde se resumen otros factores pronósticos así como los previamente descritos, tanto para el fracaso al tratamiento como para presentar recaídas, y para la sobrevida.

El mal pronóstico de las LMA secundarias viene dado en muchos casos por su asociación a características citogenéticas de mal pronóstico, en particular anomalías de los cromosomas 5 y 7 en pacientes previamente tratados con alquilantes. Cifras elevadas de leucocitos se asocian a menor frecuencia de RC y sobre todo a recaídas de la enfermedad (Nguyen S., 2002). La facilidad en la obtención de la RC es también un factor pronóstico relevante (Wheatley K, Br J., 1999).

Una variable que recientemente se ha relacionado con la evolución de la LMA es el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad y el inicio del tratamiento, así como la edad del paciente, de tal manera que presentan mayor índice de alcanzar RC los pacientes menores de 60 años, en contraste con aquellos mayores (Sekeris MA., 2009).

Cuadro 1. Factores pronósticos adversos en la LMA.

Factores pronósticos adversos		
Para el fracaso de inducción	Para la recaída	Para la supervivencia
Cariotipo desfavorable	Cariotipo desfavorable	Cariotipo desfavorable
Edad \geq 60 años	Edad \geq 60 años	Edad \geq 60 años
Leucemia secundaria	Tardanza en la remisión	Tardanza en la remisión
ECOG desfavorable	EMR elevada	Alteraciones FLT3
Gen MDR1(+)	Alteraciones FLT3	Alteraciones MLL
Leucocitos \geq 20x 10 ⁹ /L	Alteraciones MLL	Mutaciones de c-kit en CBF
Inmunofenotipo desfavorable	Mutaciones de c-kit en CBF	
	Gen MDR1(+)	
	Leucocitos \geq 20x 10 ⁹ /L	
	LDH elevada al diagnóstico	
	Afección extramedular	

Tomado y modificado de Acosta, 2007.

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; MDR-1: gen de resistencia a multidroga.

5. Clasificación de la leucemia mieloide aguda

Las leucemias se clasifican de acuerdo a la etapa de diferenciación, aunque algunas son difíciles de identificar solo en base a las características morfológicas. Se propone que la clasificación aporte mayor entendimiento en la comprensión de la leucemia, así como su comportamiento clínico, y más indispensablemente para un mejor diseño en los tratamientos clínicos (Cheson y col., 1990).

5.1. Clasificación FAB

La primer clasificación internacional aceptada de leucemias agudas fue propuesta en 1976 por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) (Cuadro 2), basada en el criterio morfológico de la línea celular afectada, grado de maduración, tinciones citoquímicas e inmunofenotípicas para diferenciar los blastos, con el fin de valorar al paciente antes de iniciar el tratamiento (Bene y col., 1995).

Cuadro 2. Clasificación de la FAB de las leucemias mieloides agudas (2008).

Tipo	Nombre	Morfología	Histoquímica
M0	Indiferenciada	Blastos grandes, agranulares, indiferenciados. >90% blastos	MP- SN B ₁ ^b
M1	Mieloblástica aguda sin maduración	Indiferenciada, >90% blastos, < 10% promielocitos/monocitos	MP+, SN+, PAS-
M2	Mieloblástica aguda con maduración	> 30% y < 89% blastos; >10% promielocitos, mielocitos; < 20% monocitos	MP+, SN+, PAS-
M3	Aguda promielocítica hipergranular	>20% de promielocitos anormales hipergranulares, Cuerpos de Auer presentes	MP+, SN+, PAS-
M3v	Aguda promielocítica variante microgranular	Fina granularidad del citoplasma en los promielocitos, núcleos bilobulados	MP+, SN+, PAS-
M4	Aguda mielomonocítica	>30% blastos en serie no eritroide, >20% pero <80% monolitos. Monocitos en sangre periférica >5x10 ⁹ /L; lisozima >3v lo normal.	MP+, NASDA+
M4Eo	Aguda mielomonocítica con eosinofilia	>5% eosinófilos anormales con gránulos basófilos.	MP+, NASDA+, eosinófilos, PAS+
M5a	Monocítica aguda	>80% células monocíticas son monoblastos, resto son promonocitos/monocitos	MP+, NASDA+
M5b	Monocítica aguda con diferenciación	<80% células monolíticas son monoblastos, el resto son promonocitos/ monocitos	MP+, NASDA+
M6	Eritroleucemia	>30% de la serie no eritroide son blastos; >50% de la médula ósea son eritroblastos	PAS+, sideroblastos con tinción de Fe ²⁺
M7	Megacarioblástica Aguda	>30% de la serie no eritroide son megacarioblastos; mielofibrosis frecuente	MP-, SN-, NASDA, plaquetaria+, MP+

Tomado y modificado de CCN Clinical Practice Guideline in Oncology (NCCN Guidelines®), 2014.

Tinciones histológicas. NASDA: naftol ASD cloroacetato esterasa; PAS: ácido periódico Schiff; MP: Melfalán-Prednisona; SNB: Sudan Negro.

5.2. Clasificación OMS

La clasificación de la organización mundial de la salud (OMS), publicada en 1999, tiene en cuenta características morfológicas e inmunológicas, además de alteraciones cromosómicas y evidencia de displasia que influyen claramente en las características clínicas de la leucemia aguda (Cuadro 3) (Campo y Swerdlow, 2011) lo que permite a los pacientes beneficiarse de estrategias específicas de tratamiento (Harris y Jaffe, 1999).

La clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC) introducida en 1988, fue la primera en reconocer la utilidad de la citogenética para la identificación de los subgrupos de leucemia aguda. Aunque propone 10 subtipos de LMA, se aplica solo en el 50% de los pacientes con LMA al reconocer subgrupos discernibles en la clasificación FAB (Segundo Grupo de Estudio Cooperativo MIC, 1988).

Cuadro 3. Clasificación de la OMS de la LMA y neoplasias mieloides.

Característica principal	Subgrupo
LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes	LMA con t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	LPA con t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARα</i>
	LMA con t(9;11)(p22;q23); <i>MLL3-MLL</i>
	LMA con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
	LMA con inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i>
	LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i>
	Entidad provisional: LMA con NPM mutado
	Entidad provisional: LMA con CEBPA mutado
LMA con mielodisplasia	
Neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento quimioterápico previo	
	LMA mínimamente diferenciada
	LMA sin maduración
	LMA con maduración
	LMA mielomonocítica

LMA sin otras especificaciones	LMA monocítica
	LMA eritroide
	LMA megacariocítica
	LMA basofílica
	Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mieloide	
Proliferaciones mieloides relacionadas con el síndrome de Down	Mielopoyesis anormal transitoria
	Leucemia mieloide asociada con síndrome de Down
Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides	

Tomado y modificado de NCCN Clinical Practice Guideline in Oncology (NCCN Guidelines®). Acute Myeloid Leukemia (2014).

Estas clasificaciones facilitan las comparaciones entre los protocolos de tratamiento mediante una mejor definición de la frecuencia y los tipos de leucemias entre los pacientes que ingresaron en estos protocolos. De hecho, los protocolos de tratamiento de LMA actualmente incorporan la clasificación FAB con fines de estratificación de los pacientes. Incluso las clasificaciones actuales inmunológicas, citogenéticas, y los estudios moleculares (Cuadro 4) de las leucemias mieloides agudas están con frecuencia relacionados con los subtipos FAB estudiados.

Cuadro 4. Grupos de clasificación de la LMA de acuerdo a MIC, FAB y cariotipo.

Leucemia Mieloide Aguda (LMA)		
MIC	FAB	Cariotipo
M2/t(8;21)	M2	t(8;21)(q22;q22)
M3/t(15;17)	M3,M3v	t(15;17)(q22;q12)
M5a/del(11q23)	M5a (M5b,M4)	t/del(11)(q23)
M4Eo/inv(16)	M4Eo	del/inv(16)(q23)
M1/t(9;22)	M1 (M2)	t(9;22)(q34;q11)
M2/t(6;9)	M2 o M4 con basofilia	t(6;9)(p21-22;q34)
M1/inv(3)	M1 (M2, M4, M7) con trombocitosis	inv(3)(q21q26)
M5b/t(8;16)	M5b con fagocitosis	t(8;16)(p11;p13)
M2 Baso/t(12p)	M2 con basofilia	t/del(12)(p11-13)
M4/+4	M4 (M2)	+4

Tomado y modificado de Behm, 2003.

De esta manera fue posible sub-clasificar a las leucemias mieloides agudas (LMA) en ocho categorías con base en el grado de diferenciación: (M0-M3) mieloides; (M4-M5) monocítica; (M6) eritroide; y megacariocítica (M7) (Bennett y Catovsky, 1976) como las que se mencionan a continuación.

5.2.1. LMA mínimamente o no diferenciada (M0)

La LMA mínimamente diferenciada o M0 tiene una gran dificultad diagnóstica desde el punto de vista morfológico, dado que los blastos presentan rasgos morfológicos linfoides y mieloides. Constituye únicamente el 5% de las LMA en el adulto y tiene un mal pronóstico. Miembros del grupo FAB, utilizando citoquímica ultraestructural y anticuerpos monoclonales, demostraron que algunos casos con una cifra inferior al 3% de blastos mieloperoxidasa (MPO) positivos clasificados como LLA eran en realidad LMA con signos mínimos de maduración. Como resultado de estos estudios se propuso la denominación de M0 a las LMA mínimamente diferenciadas. En la M0 la morfología de los elementos blásticos es la siguiente: tamaño de pequeño a mediano, relación núcleo-citoplasmática elevada, núcleo de perfil regular (redondo u ovalado) de cromatina laxa e inmadura (uno o varios nucléolos) y citoplasma moderadamente basófilo, agranular y con ausencia de bastones de Auer. El análisis citoquímico muestra de 0-3% de blastos MPO o Negro Sudán B positivos. En el estudio inmunofenotípico al menos un marcador mieloides (MPO citoplasmática, CD13 o CD33) es positivo en los blastos. Los marcadores linfoides son negativos (CD3, CD22, CD79a) (Villamor y col., 1998).

5.2.2. LMA sin maduración (M1)

La leucemia mieloides aguda sin maduración constituye aproximadamente un 15-20% de todos los casos de LMA. En médula ósea se infiltran blastos poco diferenciados, con escasos gránulos azurofílicos (Hoffman y col., 2005). La M1 suele observarse un monomorfismo celular, caracterizado por la presencia en sangre periférica de blastos mieloides (>3%) en ausencia de otras células en estadios posteriores al mieloblasto. Los blastos son de tamaño mediano, con elevada relación núcleo-citoplasmática, contorno

nuclear redondeado, núcleo de cromatina laxa e inmadura con presencia de uno o varios nucleolos prominentes. Los blastos pueden presentar una fina granulación azurófila o algún bastón de Auer visible en el citoplasma. Desde el punto de vista citoquímico, una cifra superior al 3% de las células blásticas son MPO positivas. La fosfatasa ácida y la β -glucuronidasa muestran una positividad difusa. La reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) es positiva, débil y difusa. En el estudio inmunofenotípico se demuestra que los blastos expresan antígenos mieloides (CD33 y CD13) y pueden expresar también el antígeno CD34 (Lowenberg y col., 1999).

5.2.3. LMA con maduración (M2)

La leucemia mieloide aguda con maduración tiene como característica principal la evidencia de maduración al estadio de promielocito y estadios posteriores, este subtipo constituye alrededor del 30% de todos los casos de LMA (Hoffman y col., 2005). La leucemia aguda mieloide con maduración o M2, a diferencia de la M1, muestra un número mayor de células en estadios madurativos posteriores al mieloblasto (promielocitos, mielocitos y neutrófilos) en un porcentaje superior al 10%. El tamaño de los blastos en la M2 es de pequeño a mediano, con una elevada relación núcleo-citoplasmática y un perfil nuclear redondeado o angular, que a veces adopta una posición cuadrangular respecto al citoplasma. El núcleo muestra una cromatina laxa e inmadura, con uno o varios nucléolos visibles. El citoplasma es basófilo y puede contener un esbozo de granulación primaria azurófila, u ocasionalmente algún bastón de Auer. Los blastos de la M2 son positivos para la MPO y el Negro Sudán B y expresan los antígenos CD34, HLA-DR, CD13 y CD15. Una tercera parte de las M2 se asocian a la translocación entre los cromosomas 8 y 21 [t(8;21)]. Los casos con esta alteración citogenética presentan una supervivencia más prolongada. En este subtipo se observan blastos de tamaño pequeño junto a otros de mayor tamaño, núcleo de perfil más irregular y citoplasma moderadamente amplio, que puede contener una granulación muy marcada. Otras alteraciones son deleciones o translocaciones a nivel del cromosoma 12, y la t(6;9). Una asociación menos frecuente es la t(8;16)(p11;p13), caracterizada por la presencia de eritrofagocitosis, positividad para la MPO y esterasas

inespecíficas, negatividad para los antígenos CD34 y CD117, con positividad para el CD56 y reordenamiento de los genes MOZ/CBP (Stass y col., 1984).

5.2.4. Leucemia promielocítica aguda (M3)

La leucemia aguda promielocítica o M3 suele acompañarse de una cifra baja de leucocitos en sangre periférica, lo que dificulta su diagnóstico. Las células que proliferan muestran una morfología muy característica y se denominan promielocitos atípicos (hipergranulares). Puede cursar con accidentes hemorrágicos muy graves por coagulación intravascular diseminada. Los promielocitos atípicos presentan una granulación intensamente azurófila y muy abundante. El núcleo suele ser de aspecto monocitoide (reniforme) y con un perfil bilobulado (en hachazo) con la presencia de una hendidura amplia, o bien de perfil irregular. El citoplasma es poco basófilo debido al elevado contenido de granulación azurófila. Algunos de los promielocitos atípicos contienen además inclusiones citoplasmáticas cristalinas alargadas o astillas, específicas de este tipo de leucemia, que suelen disponerse en cúmulos y que difieren de los bastones de Auer por la detección de una subestructura tubular cuando se estudian mediante microscopía electrónica de transmisión. Los promielocitos atípicos son muy positivos para la MPO y Negro Sudán B. La reacción del PAS muestra positividad difusa y las fosfatasas ácidas son intensamente positivas. Son HLA-DR y CD34 negativos y son positivos para los anticuerpos monoclonales CD13 y CD33 (Cassinat y Chomienne, 2001).

5.2.5. Leucemia mielomonocítica aguda (M4)

En la leucemia aguda mielomonocítica (M4) se observan mieloblastos y monoblastos. Los blastos monocíticos son de gran tamaño, moderada relación núcleo-citoplasma y basofilia variable. El núcleo puede ser redondeado, arriñonado o de forma irregular. Los nucléolos acostumbran a ser prominentes. Así, la M4 tiene un componente granulocítico y otro monocítico, en proporciones variables y con diversos grados de maduración. En ocasiones los promonocitos muestran una granulación ligeramente marcada y no deben confundirse con promielocitos. Los blastos mieloides son positivos para la cloroacetatoesterasa y los

monocíticos para naftol As-D-acetatoesterasa o la α -naftilbutiratoesterasa. En la M4 los blastos son CD34 positivos y expresan marcadores mieloides (CD13, CD15 y CD33) y monocíticos (CD11b, CD11c, CD14, CD64 y CD4). Los pacientes presentan infiltración extramedular, más frecuentemente que en los subtipos anteriores (M0 a M2). A nivel de marcadores, comparten marcadores de precursores monocíticos y neutrofilicos (Hoffman y col., 2005).

5.2.6. Leucemia monocítica aguda (M5)

A nivel inmunofenotípico, las leucemias M5 expresan CD64, CD68, CD11b y CD14. Existen dos variantes de M5: leucemia monoblástica pobremente diferenciada (M5a) y leucemia monocítica diferenciada (M5b). Los pacientes con la variante M5a son más jóvenes, presentan un recuento blástico más alto en sangre periférica y médula ósea y tienen una supervivencia global más adversa que los pacientes con M5b (Haferlach y col., 2002). En general, la LMA del subtipo M5 tiene muy mala respuesta al tratamiento. A pesar de que la tasa de remisión completa es similar al resto de LMA, la supervivencia global es significativamente menor que en subtipos como la M2. El subtipo M5a constituye alrededor de un 58% de las LMA, está constituida por elementos blásticos de gran tamaño, con un núcleo de perfil redondeado de cromatina laxa e inmadura (1-3 nucléolos) y un citoplasma moderadamente amplio e intensamente basófilo; en el citoplasma es posible la observación ocasional de algún bastón de Auer y/o prolongaciones o mamelones. En la M5b (3-6% de las LMA) los promonocitos presentan un núcleo de perfil redondeado o arriñonado y un citoplasma menos basófilo, con mayor contenido de granulación que los monoblastos y con la presencia de alguna vacuola (Fung y col., 1995).

5.2.7. Leucemia eritrocítica aguda o eritroleucemia (M6)

La leucemia eritroide aguda representa un 3-5% de todos los casos de LMA. Es una enfermedad muy heterogénea, lo que dificulta en gran medida su diagnóstico. Existen varios marcadores positivos en la M6, como CD36 (puede aparecer positivo en M5 y M7), o glicoporina A (exclusiva de los neutrófilos). Existen dos subtipos de eritroleucemia:

eritroleucemia con mezcla de blastos granulocíticos (>20% de los mieloblastos) y células eritroblástica, y leucemia eritroide pura, con un 80% o más de componentes eritroblásticos (Cigudosa y col., 2003).

5.2.8. Leucemia megacariocítica aguda (M7)

La M7 representa un 3-5% de todas las leucemias. Se caracteriza por la presencia de unos blastos del linaje megacariocítico. Una característica de esta variante de LMA es la frecuente fibrosis medular asociada, que dificulta la extracción de la médula ósea, por lo que con relativa frecuencia se obtiene un aspirado seco. Los sistemas de clasificación señalan la dificultad de clasificar esta enfermedad usando morfología y citoquímica clásicas, por lo que se recomienda el uso de criterios inmunofenotípicos, como la expresión de CD42b o CD61.

A nivel clínico, el subtipo M7 tiene muy mala respuesta a tratamientos convencionales, presentando períodos muy cortos de remisión y muy baja supervivencia global (Athale y col., 2001). Los blastos muestran un aspecto morfológico muy indiferenciado o inmaduro y son muy polimórficos (forma y tamaño variables). El núcleo es excéntrico, de cromatina laxa y reticulada y con 1-3 nucléolos prominentes. El citoplasma es basófilo, agranular y muestra un aspecto muy similar a las plaquetas circulantes con presencia de mamelones o seudópodos. Se observan micromegacariocitos y fragmentos megacarioblásticos en sangre periférica, así como una gran dismorfia plaquetaria (plaquetas gigantes y algunas con marcada desgranulación). Los micromegacariocitos son células de pequeño tamaño, núcleo de perfil redondeado de cromatina condensada y citoplasma poco basófilo. Los neutrófilos pueden presentar también desgranulación.

Es así como en base a la clasificación de la FAB se puede establecer la incidencia como se muestra en el cuadro 5 de cada subtipo de LMA.

Cuadro 5. Incidencia de subtipos en leucemia mieloide aguda.

Subtipo	Nombre	Incidencia
M0	LMA con mínima diferenciación mieloide	2% a 5%
M1	LMA sin maduración	15% a 20%
M2	LMA con maduración	25% a 30%
M3	LMA promielocítica	10% a 15%
M3v	LMA promielocítica microgranular	
M4	M4 mielomonocítica aguda	25% a 30%
M4c	M4 variante con eosinofilia	
M5a	LMA monoblástica aguda	10% a 15%
M5b	LMA monocítica	
M6	Eritroleucemia	3% a 4%
M7	Megacarioblástica	1%

Tomado y modificado de <http://es.slideshare.net/jcustodio91/leucemia-a-aguda>.

6. La citogenética en la leucemia mieloide aguda

El estudio citogenético, además de completar la caracterización de la leucemia, se considera uno de los factores pronósticos más importantes en la LMA (Grimwade y Walker, 1998); para esto se han mejorado las técnicas de cultivo y métodos de bandedo, que han logrado identificar del 80% al 90% de anomalías cromosómicas (Van Lom y Hagemeijer, 1996), sin embargo la tasa de falla del crecimiento y obtención del cariotipo en pacientes con LMA es aproximadamente del 10% al 15% (Grimwade y Hills, 2010). Aunque este análisis es una de las herramientas más importantes para predecir la respuesta inicial a la terapia, duración de la remisión y supervivencia en pacientes con LMA (Grimwade y Hills, 2010), puede verse limitados por varios factores incluyendo una baja tasa de proliferación de blastos leucémicos en el cultivo, insuficiente número de metafases, una reducción de la viabilidad celular, una mala morfología cromosómica o la misma complejidad del cariotipo (Fischer y Scholl, 1996). Las leucemias con cariotipo normal son las más numerosas de todas las leucemias de *novo*, y representan aproximadamente el 45% de todas ellas. Es importante enfatizar que el proceso de transformación leucémica es un proceso múltiple

que no puede ser explicado solo con la presencia de un evento mutacional (Goasguen y Matsuo, 1992). Debido a que existe una gran cantidad de LMA sin patrones citogenéticos apreciables, se han realizado otras aproximaciones a nivel molecular, tales como mutaciones génicas o modificaciones epigenéticas, para explicar las diferencias en la evolución y en la respuesta al tratamiento observadas en este grupo (Mitelman y col., 2007). Estas alteraciones ocurren por el cambio en la estructura del material genético, ya sea de un simple gen (mutación génica) o del número o estructura del cromosoma (mutación cromosómica) (Romero y Jiménez, 2002).

6.1.Alteraciones cromosómicas numéricas

Entre un 60 y 75% de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas numéricas. Las más frecuentes en leucemia mieloide aguda son las pérdidas de los cromosomas 7, X y Y, así como ganancias del cromosoma 8 y 22. Se ha descrito una nueva categoría citogenética con un particular mal pronóstico: “cariotipo monosómico” (CM) el cual es definido por la presencia de al menos dos monosomías de autosomas o una monosomía autosómica en combinación con una alteración estructural. Otra alteración 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 hipodiploidías se caracterizan por tener menos de 44 cromosomas y se asocian con un pobre pronóstico (Martin y col., 2001).

6.2.Alteraciones cromosómicas estructurales

Las alteraciones estructurales pueden ser: translocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, isocromosomas, etc. Estas se detectan en más del 60 % de los casos en leucemias, se trata de alteraciones primarias que afectan a regiones cromosómicas que en la mayoría de los casos contienen oncogenes o genes supresores de tumores (Martin y col., 2001).

7. Alteraciones más frecuentes

La mayoría de los casos de LMA están asociados con translocaciones cromosómicas no aleatorias que a menudo resultan en arreglos de genes (cuadro 6) (Martens, 2010). Estas translocaciones no solo permiten un diagnóstico preciso, sino también proporcionan marcadores para la identificación de la enfermedad mínima residual o recurrente (Grimwade, 1999).

Cuadro 6. Frecuencia de incidencias anuales de genes de fusión en LMA.

Translocación	Gen de fusión	Frecuencia en LMA
t(8;21)	RUNX1-RUNX1T1	10%
t(15;17)	PML-RAR α	10%
inv(16)	CBFB-MYH11	5-10%
del(11q23)	MLL	4%
t(9;22)	BCR-ABL1	1-3%
t(6;9)	DEK-CAN	<1%
t(1;22)	OTT-MAL	<1%
t(8;16)	MOZ-CBP	<1%
t(7;11)	NUP98-HOXA9	<1%
t(12;22)	MN1-TEL	<1%
inv(3)	RPN1-EVI1	<1%
t(16;21)	FUS-ERG	<1%

Tomado y modificado de atlasgeneticsoncology.org/.

7.1.LMA con t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*

Las leucemias con t(8;21)(q22;q22) han sido clasificadas tradicionalmente como LMA del grupo M2 según la FAB (constituyendo el 40% de este grupo) (Bennett y col., 1985). Sin embargo, la OMS decidió situarla en un grupo aparte como leucemia con alteración

conocida (debido a las diferencias de pronóstico y la facilidad de ser diagnosticada con técnicas citogenéticas y moleculares) (Harris y col., 1999). A nivel molecular, la translocación t(8;21)(q22;q22) (figura 2) implica los genes *RUNX1* y *RUNX1T1* (Miyoshi y col., 1991). La unión de estos genes da como resultado una proteína de fusión, llamada *RUNX1-RUNX1T1*, si bien es capaz de unirse a la proteína CBF β , al que normalmente se une *RUNX1* para formar el *core binding factor* (CBF). El CBF es el responsable de la activación de múltiples genes necesarios para la mielopoyesis normal. En presencia de la proteína de fusión el CBF, pierde su capacidad para reclutar coactivadores, y a través de *RUNX1T1* recluta correpresores actuando la proteína de fusión como un factor de transcripción que reprime genes esenciales para la diferenciación hematopoyética, habitualmente regulados por la forma natural de *RUNX1* (Licht, 2001).

En estudios anteriores se ha informado que mutaciones en *c-KIT* están asociadas con un mal pronóstico en pacientes con translocaciones cromosómicas t(8;21). El gen *KIT* se localiza en la banda del cromosoma 4q11-12 y está asociado en la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (Paschka y Marcucci, 2006). Tanto la unión de los genes *RUNX1-RUNX1T1* (*AML-ETO*) como la unión de los genes *CBFB-MYH11* por inversión del cromosoma 16 [inv(16)] (Kohl y Schnittger, 2005), inducen la hiperactivación del receptor en el exón 8 que resulta en proliferación y resistencia hacia la muerte celular apoptótica (Jiao y Wu, 2009). Esta regulación selectiva podría ser un mecanismo que altera la expresión génica y promueva la leucemogénesis (Okumara AJ, 2008). En adición, la pérdida del cromosoma Y en pacientes masculinos con leucemia t(8;21) es un factor pronóstico negativo para la supervivencia general (Schlenk y col., 2004).

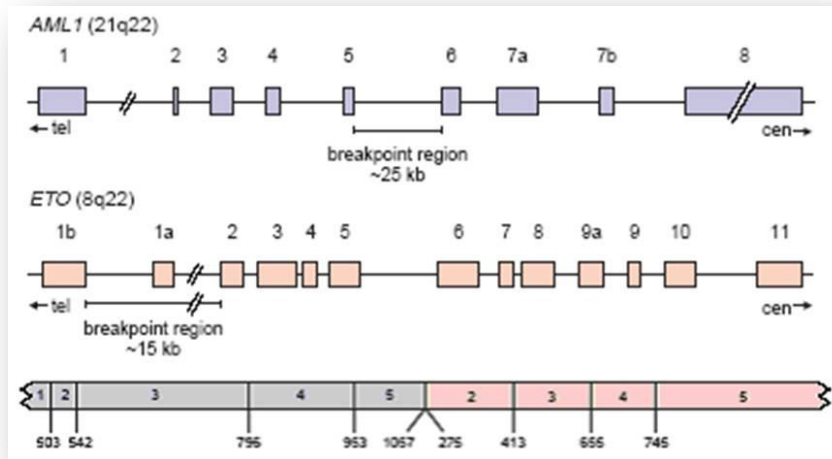


Figura 2. Puntos de ruptura en los cromosomas 8 y 21. Para la formación del gen de fusión *RUNX1-RUNXIT1* (*AML-ETO*). Tomado de bio-goods.com/.

7.2.LMA con *inv(16)(p13.1q22)*; *CBFB-MYH11*

Las LMA con *inv(16)(p13;q22)*, a pesar de formar un grupo independiente en la clasificación de la OMS (Harris y col., 1999), han sido tradicionalmente diagnosticadas dentro del subtipo M4 de la clasificación FAB debido a que presentan caracteres claramente mielomonocíticos típicos de la enfermedad M4. Sin embargo, debido a su principal característica, la eosinofilia, se las cataloga como LMA M4EO (M4 con eosinofilia) (Bennett y col., 1985). La *inv(16)(p13;q22)* produce el gen de fusión *CBFB-MYH11* que es un represor de la señal transcripcional activadora de AML1, aunque en el caso de *RUNX1-RUNXIT1* se requiere de alteraciones genéticas adicionales para la leucemogenesis (Castilla LH, 1999). Esta proteína de fusión produce un secuestro del cofactor CBF β en el citoplasma, impidiendo su paso al núcleo, lo que impide la formación del CBF, necesario para activar genes esenciales en la diferenciación mieloide. Diez diferentes transcritos de *CBF β -MYH11* han sido reportados (Figura 3) (Van Dongen JJ, 1999). Todos menos uno, el tipo I, contienen un sitio de unión de alta afinidad para RUNX1, el HABD. El HABD se considera que es uno de los dominios más importantes para la supresión dominante de RUNX1, ya que hace completa la unión completa de CBF β

con RUNX1 en el caso de *CBFB-MYH11* (Kamikubo Y, 2010), pero la frecuencia es variable, este transcrito es encontrado en aproximadamente del 10-12% de los casos de LMA, puede ocurrir en cualquier grupo de edad pero es predominante observarla en pacientes jóvenes. (Gabert y col., 2003).

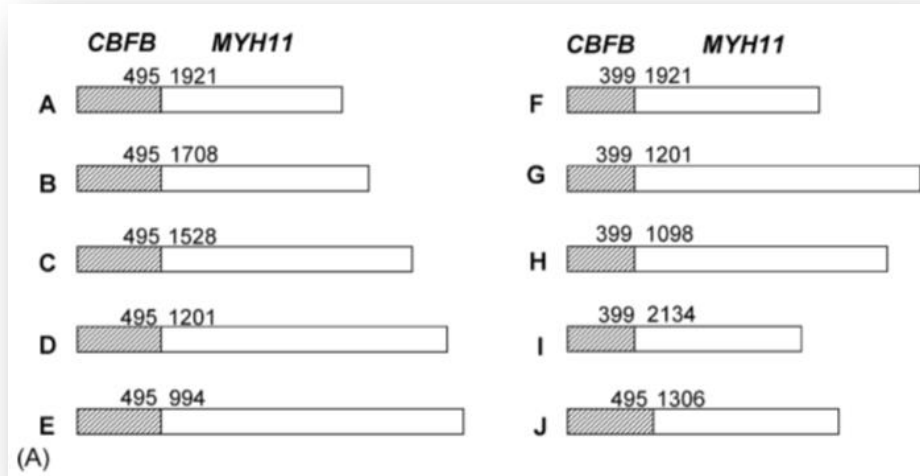


Figura 3. Isoformas del transcrito de fusión CBFB-MYH11. (A) muestra las 10 las diferentes isoformas, A-J, numeradas de acuerdo a la posición del nucleótido. Tomado de Reilly, 2004.

7.3.LMA con $t(9;22)(q34;q11)$; *BCR-ABL*

La alteración cromosómica característica de LMA es el denominado cromosoma filadelfia (Ph) (Rowley, 1973), que aparece en el 85% de los pacientes con LMC y se produce por la translocación adquirida ente los cromosomas 9 y 22. Esta anomalía se deriva de la ruptura de los brazos largos de estos dos cromosomas, dando como resultado la translocación secundaria recíproca cromosomal $t(9;22)(q34;q11)$, esta translocación yuxtapone el gen *ABL* localizado en el cromosoma 9(9q34) con el gen *BCR* en el cromosoma 22, generando el mRNA BCR-ABL (Lugo y col., 1990). En el gen *BCR* (“*breakpoint cluster region*”), localizado en el brazo largo del cromosoma 22 a nivel de 22q11 se han descrito tres regiones de ruptura distintas: 1) la región mayor o MBCR, localizada entre los exones 12 a 16 (originalmente descritos como exones b1-b5); 2) la región menor o mBCR, ubicada entre los exones e2' y e2 y; 3) la región micro o μ BCR, que se sitúa en el exón 19 (Radich, 2007). Los puntos de ruptura más frecuentes en el gen BCR

ocurren en los exones 1(e1), 12(b2), 13(b3) y 19(e19), mientras que el punto de rotura en el gen ABL habitualmente se produce en el exón 2 (a2), dando lugar a los reordenamientos e1a2, b2a2 o b3a2 y e19a2 como se representa en la figura 4 (Melo, 1996).

El reordenamiento e1a2 es característico de la LLA de precursores B, aunque puede encontrarse también de forma excepcional (<1%) en la LMC. Por el contrario, los reordenamientos b2a2, b3a2 son característicos de la LMC, detectándose únicamente en alrededor de 20-30% de las LLA de precursores B del adulto con t(9;22). A su vez, la variante del reordenamiento BCR-ABL en la que el punto de ruptura del gen BCR está situado en el exón e19 se ha asociado a una variante rara de la LMC, la LMC-neutrofílica (Radich, 2007). Ph+LMA es una entidad controversial y la cual no está descrita en la revisión del 2008 de acuerdo a la clasificación de Organización Mundial de la Salud (OMS) (Vardiman, 2009). Existe controversia sobre si esto representa una leucemia mieloide aguda o solo es representación de LMC en crisis blástica mieloide ya que podría representar solo una fase crónica asintomática. Algunos han sugerido que las aberraciones citogenéticas convencionales en LMC, tales como copias de más del cromosoma Ph y la trisomía 8, son menos recurrentes en Ph+LMA, así como un mayor número de metafases normales en Ph+LMA que en LMC (Berger, 1993).

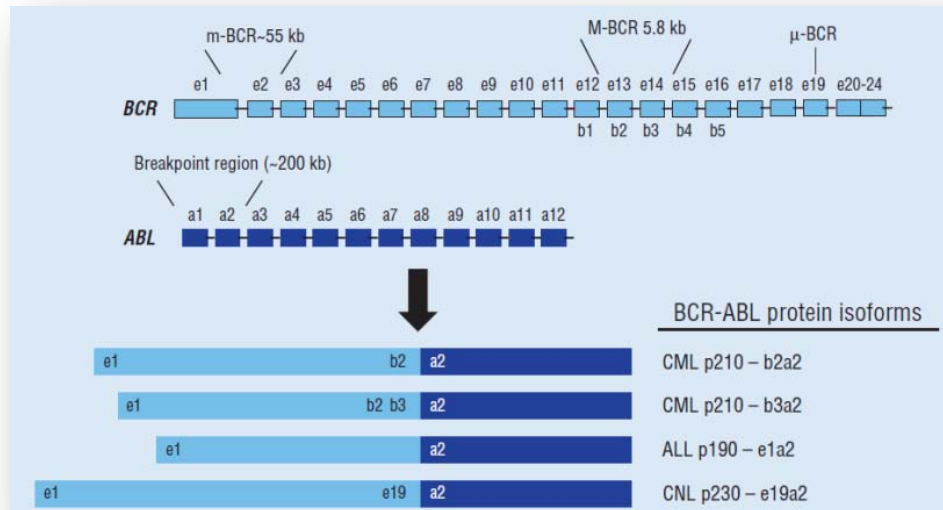


Figura 4. Localización de los puntos de rompimiento en los genes BCR y ABL. Estructura de los diferentes mRNA quiméricos derivados de las variaciones (Tomado de Hazlehurst L y col. 2009).

7.4.LMA con t(15;17)(q22;q21); *PML-RAR α*

Este grupo corresponde a la M3 de la FAB, aparece habitualmente en la edad adulta. Clínicamente, puede aparecer asociada a fenómenos de coagulopatía intravascular diseminada (CID) (Puccetti and Ruthardt, 2004). A nivel citogenético, en el análisis del bandeo cromosómico de los tipos M3 y M3v, está caracterizada por la presencia de la translocación equilibrada entre el brazo largo del cromosoma 15 y el brazo largo del cromosoma 17 que involucra las bandas cromosómicas 15q22 y 17q12-21 (Rowley y Golomb, 1977). Esta translocación da lugar a un reordenamiento del gen *PML* situado en el cromosoma 15 y del gen *RAR α* localizado en el cromosoma 17, que da lugar a dos genes de fusión: *PML-RAR α* derivado del cromosoma 15 y *RAR α -PML* del cromosoma 17 (Figura 5) (Kakizuka y Miller, 1991), el receptor del ácido retinoico, resulta modificado en esta translocación, lo que conlleva a una falta de respuesta celular al ácido retinoico, necesario para la diferenciación de los promielocitos (Grignani y col., 1998; Melnick and Licht, 1999) pero tienen capacidad de replicación. A niveles fisiológicos de ácido retinoico las proteínas de fusión que afectan a la proteína *RAR α* provocan una activación aberrante de complejos de supresión y de desacetilasas de histonas en los promotores de genes de respuesta, que conlleva al bloqueo de la diferenciación característico de la leucemia promielocítica aguda (LPA) (Grimwade D, 2002). Mediante citogenética convencional, la translocación típica t(15;17)(q22;q21) se observa en el 70% de los pacientes diagnosticados de LPA, aunque puede acompañarse de otras alteraciones como la trisomía 8 (la más frecuente), seguida del isocromosoma del brazo largo del derivativo 17, [ider(17)]; sin embargo, estas anomalías citogenéticas no aportan ningún significado pronóstico adverso a los pacientes (Hernández JM, 2001).

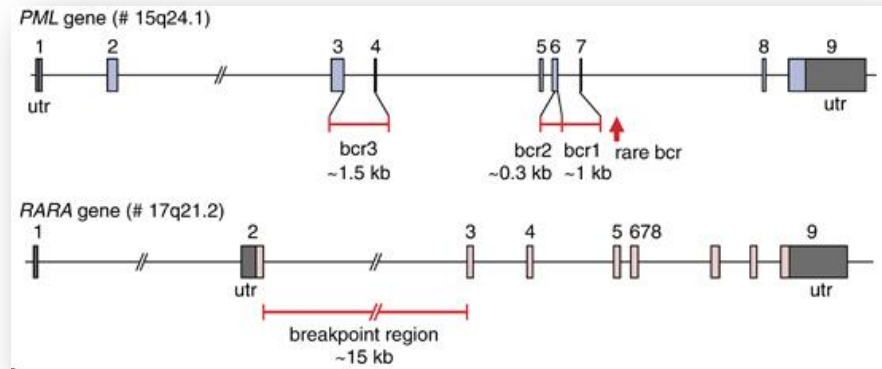


Figura 5. Localización de los genes PML y RAR α . En los cromosomas 15 y 17 respectivamente, en los cuales se muestra el punto de ruptura. Tomado de <http://atlasgeneticsoncology.org/>.

8. Clasificación de grupos de riesgo en el pronóstico de la enfermedad

De un modo general, la mayor parte de los estudios han coincidido en identificar tres grupos (favorable, intermedio y adverso) con distinta probabilidad de recaída y de supervivencia en función de los hallazgos del cariotipo (Grimwade y col., 2010). La verdadera importancia de estos hallazgos es que algunas alteraciones cromosómicas pueden estar relacionadas con un pronóstico adverso, donde se encuentran: inv(3), t(3;3), t(6;9), t(6;11), t(11;19), del(5q), -5, -7; cariotipos complejos que presentan un alto índice de resistencia al tratamiento de inducción de remisión, con elevada probabilidad de recaída y, en consecuencia, una supervivencia general de apenas 5-15% (Vardiman y col., 2008). Las alteraciones que se vinculan con un mejor pronóstico (Lowenberg y Downing, 1999) incluyen: t(8;21), t(15;17), inv(16) y t(16;16) con tasas de remisión completas mayores de 90% y supervivencia general de 60% (Cuadro 7) (Vardiman y Matutes, 2008).

Cuadro 7. Clasificación de riesgos basados en citogenética y anomalías moleculares.

Clasificación de riesgos	Citogenética	Anormalidades moleculares
Riesgo favorable (Pronóstico favorable)	Inv(16) o t(16;16) t(8;21) t(15;17)	Citogenética normal con mutación del NPM1 o mutación aislada del CEBPA en ausencia del FLT3
Riesgo intermedio	Citogenética normal +8 t(9;11) Otros no definidos	t(8;21), inv(16), t(16;16): con mutación del c-KIT
Riesgo adverso (Pronóstico desfavorable)	Cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones citogenéticas) -5,5q-, -7, 7q- 11q23 – no t(9;11) inv(3), t(3;3) t(6;8) t(9;22)	Citogenética normal: Con mutación FLT3-IDT en ausencia de mutación del NPM1

Tomado y modificado de Guidilne of Leukemias (2014)

8.1. Grupo de riesgo favorable

El grupo de riesgo favorable forma aproximadamente el 14-25% de todas las LMA de *novo*. Son leucemias caracterizadas por tener buena respuesta al tratamiento y un pronóstico general muy favorable. Estas leucemias se caracterizan por tener translocaciones equilibradas. En este grupo favorable se incluyen la LMA promielocítica con la t(15;17)(q22;q21). Estas se dan específicamente en pacientes jóvenes con LMA de *novo* asociadas a tasas de RC de alrededor del 90% y a una supervivencia global a los 5 años de aproximadamente 65%.

8.2. Grupo de riesgo intermedio

El grupo de riesgo intermedio es el más abundante en LMA. Representa aproximadamente el 60-75% de todas las leucemias, y se caracteriza por una supervivencia global a los 5 años de 24% (Grimwade D, 1998). Sin embargo este grupo es muy heterogéneo, ya que incluye

tanto pacientes con supervivencias similares a las del grupo favorable, como casos con mala respuesta al tratamiento y supervivencias muy reducidas. Además, no se han identificado alteraciones citogenéticas que los separen. Por otro lado, puede reducirse el riesgo de recaída utilizando diferentes estrategias post-remisión que incluyen dosis altas o intermedias de citarabina, pero la respuesta no es igual en todos los pacientes, esta variabilidad en la respuesta al tratamiento se debe a la heterogeneidad molecular de los pacientes con estudio citogenético normal (Slovak, 2000).

8.3. Grupo de riesgo adverso

En este grupo se encuentran los pacientes que presentan un cariotipo complejo, presentando al menos 3 anomalías cromosómicas en ausencia de la $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$ y la $t(15;17)$. Estas leucemias representan al menos el 10-12% de los casos y su incidencia aumenta con la edad. Esta LMA se caracteriza por la rara frecuencia de reordenamientos cromosómicos balanceados y por la baja frecuencia de mutaciones de los genes NPM1, FLT3, CEBPA, RAS o KIT tan frecuentemente mutados en otros tipos de LMA, lo que sugiere la alteración de otras vías moleculares. En este grupo predominan los desequilibrios cromosómicos, con más pérdidas cromosómicas que ganancias (Rücker FG., 2006). El gen p53 es la diana de las pérdidas que ocurren en 17p y estas mutaciones de p53 se han identificado en 2/3 partes de las LMA (Haferlach C., 2008). Se ha demostrado que la presencia de mutaciones en p53 es un factor de muy mal pronóstico, ya que la probabilidad de alcanzar la RC en estos pacientes es de solo el 28%, ya que muestran una tasa elevada de resistencia al tratamiento de inducción a lo que se suma una alta probabilidad de recaída y en consecuencia una corta supervivencia (Grimwade y col., 1998), por lo que podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas alternativas dirigidas contra esta vía alternada de p53 (Bowen D., 2009).

9. La genética molecular en la leucemia mieloide aguda

Debido a las limitaciones presentadas por la citogenética convencional, se han realizado diversos estudios buscando más marcadores genéticos que permitan una predicción de la enfermedad en aquellos casos sin pronóstico definido debido a que presentan un cariotipo normal. Actualmente, la mutación de la kinasa FLT3 en las leucemias mieloides, específicamente la duplicación en tándem interna de FLT3 (FLT3-ITD), es considerada un marcador de pronóstico adverso en leucemias con cariotipo normal (Yanada y col., 2005). Existen publicaciones que indican que la longitud de la duplicación es también un marcador pronóstico (Stirewalt y col., 2006), pero hay una gran controversia en este aspecto puesto que otros grupos han observado lo contrario (Ponziani y col., 2006). Aparte de esta mutación mayoritaria, existe otra mutación en FLT3, la mutación en el codón D835, cuyo efecto también parece adverso (Frohling y col., 2002; Whitman y col., 2007). Otras mutaciones genéticas están siendo estudiadas actualmente en el marco de la clínica. Se han asociado a buen pronóstico en el contexto de un cariotipo normal las mutaciones en NPM1 (nucleofosmina), en ausencia de mutaciones de *FLT3* (Dohner y col., 2005; Schnittger y col., 2005) o las mutaciones del gen CEBPA (Frohling y col., 2004). Otras aproximaciones han sido a través de la cuantificación de la expresión de genes como *BAALC*, cuya sobreexpresión está asociada a un peor pronóstico (Baldus y col., 2006).

Por otra parte, la genética molecular se está estableciendo como una herramienta de preferencia y referencia en la detección y cuantificación de transcritos de genes de fusión, tales como *PML-RARa*, *RUNX1-RUNX1T1* o *CBFB-MYH11*, de una manera independiente y más sensible que la citogenética convencional, pudiéndose utilizar esta tecnología no solo en el diagnóstico sino también en el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) (Mrozek y col., 2001).

9.1. Métodos moleculares aplicados al diagnóstico

Simultáneamente las técnicas de biología molecular como la PCR, han permitido la identificación de genes adyacentes a los puntos de ruptura de los diferentes rearrreglos cromosómicos (Leroy y de Botton, 2005) donde la mayoría de los reordenamientos en

LMA son balanceados o equilibrados y a los cuales se conoce su gen de fusión el cual puede ser detectado por la reacción en cadena de la polimerasa con el empleo de una transcriptasa inversa (RT-PCR), las translocaciones balanceadas pueden ser analizadas por citogenética clásica a través de bandas G (Han y Kim, 2007). La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) también es útil para detectar estas mismas alteraciones, y tiene la ventaja de poder realizarse en células en interfase (Milligan y col., 2006).

La fusión de genes se puede detectar en pacientes con blastos leucémicos, donde el 45% de los pacientes con LMA presenta un cariotipo “normal” (Grimwade y Hills, 2010), principalmente por la inserción criptica de segmentos cromosómicos muy pequeños que no cambia la morfología cromosómica y por lo tanto no pueden ser diagnosticadas por citogenética clásica (Baldus y Mrozek, 2007).

9.1.1. PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar secuencias de interés a partir de pequeñas cantidades de ADN de muestras biológicas. Con este método se obtienen millones de copias de las originales. El método comienza con la hibridación de un oligonucleótido sintético de 10-20 bases (sonda) a una secuencia de ADN específica, denominadas *Primers* o iniciadores, que flanquea en los dos extremos la secuencia de interés. Todo ello es posible mediante una ADN polimerasa termoestable (Taq-polimerasa) que hace copias de la secuencia elegida (Bej y col., 1991).

La repetición cíclica de la hibridación-extensión, con un termociclador automático, permite la gran amplificación (hasta un millón de veces) del segmento de ADN. En caso particular del ARN (Figura 6), se requiere un paso previo de conversión a ADN complementario (ADNc) por medio de una transcriptasa inversa, antes de aplicar la técnica estándar de PCR.

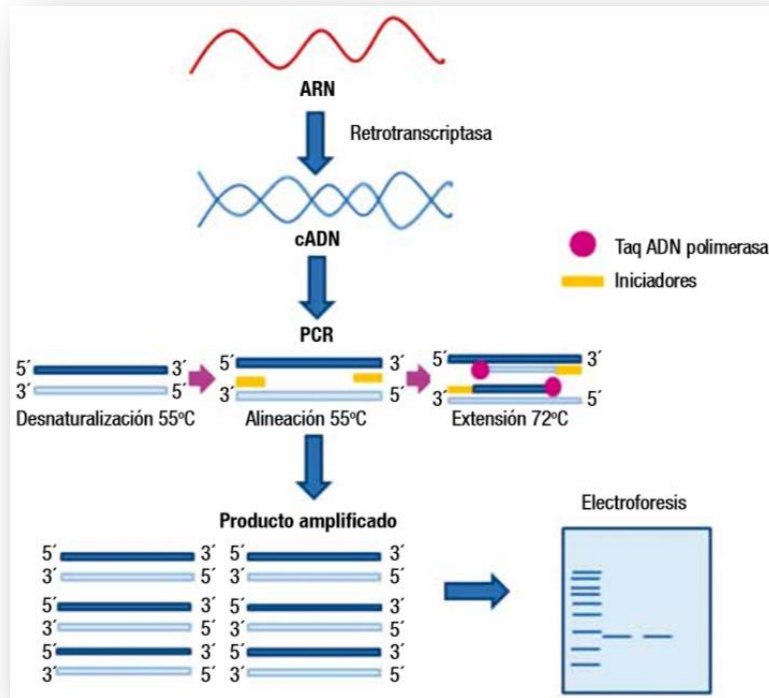


Figura 6. Esquema general de la técnica de RT-PCR. Se obtiene ADNc por medio de una transcriptasa inversa, que utiliza ARN como molde para la obtención de la molécula de ADNc, a partir de la cual se amplifica la secuencia de interés con una reacción de PCR convencional, y el fragmento es finalmente visualizado en un gel de electroforesis. Tomado de Pacheco, 2013.

10. Antecedentes

Medeiros y col., (2013) demostraron que el diagnóstico citogenético es la herramienta de oro para la identificación de las anomalías recurrentes en LMA, sin embargo, observaron que el diagnóstico citogenético en la estratificación de la enfermedad se ve limitado mayormente en pacientes mayores de 60 años por varios factores; por lo que se propuso el FISH como método alternativo al ser más sensible. Sin embargo, este requiere múltiples ensayos y se ve limitado por el número de sondas disponibles, y la consecuente no detección de aberraciones cromosómicas poco comunes.

Dolz y col., (2013) analizaron las muestras de 103 pacientes con LMA haciendo una comparación de los resultados obtenidos por los métodos FISH, citogenética clásica y PCR, obteniendo como resultado detección de translocaciones en todos los pacientes por PCR, las cuales solo algunas fueron detectadas previamente en estos pacientes usando técnicas como FISH y citogenética clásica. Además, fue más sensible en la detección de rearrreglos crípticos que no fueron detectados por las técnicas convencionales, siendo una técnica más sensible y fácil en el uso para el diagnóstico clínico en laboratorios. Por otro lado, King y col., (2011) demostraron la correlación que existe al utilizar técnicas como RT-PCR y citogenética convencional en la detección de anomalías en leucemia aguda en más de 442 casos de pacientes con una relación del 15.2% sobre el 74.7%. Buccisano y col., (2012) utilizaron PCR y citometría de flujo como los métodos más importantes para poder establecer la enfermedad mínima residual (EMR) al momento del diagnóstico del paciente con LMA para un mejor pronóstico y terapia hacia el paciente, ya que son técnicas que han sido establecidas como sensibles y específicas. Pakakasama y col., (2008) utilizaron la técnica de RT-PCR para identificar fusiones de transcritos más comunes, demostrando de esta manera un método más rápido y más efectivo, el cual puede ser usado como complemento al momento del diagnóstico.

11.Planteamiento del problema

Aunque la identificación de alteraciones cromosómicas mediante el estudio citogenético convencional en las leucemias agudas contribuye a tomar decisiones terapéuticas, además de que ayuda al diagnóstico y puede predecir la evolución de la enfermedad, la tasa de falla en la obtención de resultados del cariotipo en pacientes con LMA es del 10 al 15%. Por otro lado, el 45% de los pacientes que con un cariotipo normal, presentan rearrreglos cromosómicos crípticos detectables con otras técnicas como la citogenética molecular o de biología molecular (como la RT-PCR). Por ello, es necesaria la implementación simultánea de técnicas de biología molecular para poder identificar alteraciones no visibles por citogenética y con ello dar un mejor diagnóstico, respuesta al tratamiento, y supervivencia en los pacientes con LMA.

12.Justificación

La leucemia mieloide aguda es una de las principales causas de muerte en México, con una mortalidad muy alta en pacientes mayores de edad, quienes al momento del diagnóstico presentan factores pronósticos que influyen en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia. Con la ayuda de las técnicas de biología molecular (RT-PCR), se han identificado genes adyacentes a los puntos de ruptura de los diferentes rearrreglos cromosómicos. La identificación de estos rearrreglos en conjunto con el cariotipo, ayudará a una mejor estratificación del paciente durante la fase de diagnóstico. La implementación de técnicas que en la práctica clínica resulten ser altamente sensibles, específicas, rápidas y reproducibles, permitirá reducir el tiempo de obtención y entrega de resultados, así como la reducción en los costos posteriores. La implementación de la técnica de RT-PCR en casos del Hospital Juárez de México permitirá que se realice un diagnóstico más preciso en los pacientes con LMA.

13.Hipótesis

Debido a que en el porcentaje de pacientes con LMA, se presentan alteraciones que no pueden ser visibles por citogenética, la implementación de la técnica de biología molecular PCR como prueba diagnóstica para la detección de los transcriptos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*, permitirá identificar la fusión de estos genes en pacientes con estudio citogenético normal.

14.Objetivos

14.1. Objetivo general

Implementar la técnica de PCR como prueba diagnóstica para la detección de los transcriptos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*.

14.2. Objetivos particulares

- Revisión bibliográfica de los iniciadores para las translocaciones y verificar su utilidad a través del uso de herramientas bioinformáticas (BLAST).
- Realizar la estandarización para la detección de los transcritos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*, en líneas celulares leucémicas positivas para estas translocaciones.
- Identificar los transcriptos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11* en pacientes con diagnóstico de LMA y su correlación con los datos clínicos y hematológicos.

15. Material y métodos

15.1. Muestras clínica

Se obtuvieron 20 muestras de sangre periférica del servicio de hematología del Hospital Juárez de México, de pacientes de *novo* y/o recaída con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

15.2. Extracción de ARN

- a. Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos morados con EDTA y se centrifugaron a 4000 RPM durante 5 minutos obteniendo la fase leucocitaria, el plasma se desechó, y se colectó la fase con leucocitos.
- b. Posteriormente se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5ml, se eliminó el exceso de eritrocitos. Se adicionó 1ml de Buffer de lisis, e incubó durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 13000 RPM durante 15 min.
- c. Se adicionó a la fase de los leucocitos obtenidos 800µl de Trizol (Invitrogen LifeTech Inc, Carlsbad, CA, USA), resuspendiendo completamente el botón.
- d. Posteriormente se adicionó 200µl de cloroformo y se agitó vigorosamente incubando durante 15 minutos a 4°C.
- e. Se centrifugó a 13000 RPM durante 15 min, y se obtuvo la fase superior del ARN. La fase acuosa se colocó en un tubo Eppendorf estéril con 500µl de Isopropanol, y se mezcló por inversión y centrifugó a 13000 RPM por 15 minutos.
- f. Al botón obtenido se le adicionó 1 ml de etanol al 75%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 RPM por 5 minutos.
- g. Por último el botón se resuspendió en 30µl de agua libre de RNAsa. Y se almacenó a -70 para conservar el material genético hasta su uso.

15.2.1. Integridad del ARN y síntesis de ADNc

Se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro EPOCH (BioTek®) colocando en cada celda 2µl de la muestra con una longitud de onda de 260/280 nm, siendo los rangos de 1.8 a 2.0 los más óptimos en preparaciones puras de ARN.

Posteriormente se realizó la síntesis del ADNc utilizando una mezcla del Kit Promega® en un tubo Eppendorf estéril, con concentraciones previamente calculadas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Mezcla para la síntesis del ADNc para realizar el PCR en punto final.

Reactivo	Para 1 muestra
Buffer reacción improm 5x	4µl
Cloruro de magnesio	3 µl
Mezcla DNTP's	1 µl
Inhibidor de ribonucleasa	0.5 µl
Enzima RT	1 µl
Oligo DT	1 µl
total	10.5 µl

Donde el volumen de ARN tuvo variaciones dependiendo de la concentración obtenida, este volumen se ajustó a un volumen total de 20µl. Una vez obtenida la muestra se procedió a meter en un termociclador NYX Tecnnik® TC-412 en condiciones determinadas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Condiciones para la síntesis de ADNc.

Temperatura	Tiempo
42°C	60 minutos
95°C	5 minutos

Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

15.3. Obtención de líneas celulares

Estas líneas celulares (Cuadro 10) se obtuvieron del ATCC (American Type Culture Collection).

Cuadro 10. Características generales de las líneas celulares leucémicas de estudio.

Línea celular	Translocación	Característica	Alteración cromosómica
NB-4	PML-RAR α	Leucemia promielocítica aguda	t(15;17)
K-562	BCR-ABL Mayor	De leucemia mieloide crónica	t(9;22)

- Se observó el cultivo bajo el microscopio para verificar que se encontrara libre de agentes contaminantes y que tuviera una buena densidad, estas se resuspendieron sin hacer espuma, en forma suave y firmemente para obtener las células las cuales fueron colocadas en tubos cónicos de 15ml.
- Lo frascos Roux donde se colocaron se lavaron con 3ml de medio para recuperar todas las células, el tubo donde se colocó el botón celular se centrifugo a 2500 RPM/ 5 minutos.
- Durante el tiempo de centrifugado se preparó el medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium de Invitrogen GIBCO-BRL), para líneas NB-4, y medio RPMI-1640 (Invitrogen GIBCO-BRL) para K-562, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Invitrogen GIBCO-BRL HyClone) y 5 μ l de antibiótico: penicilina/estreptomicina.
- Al término del centrifugado se colocaron en frascos de Roux con capacidad de 5 ml, se resuspendió firme pero suave para tener una solución celular homogénea.
- Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y humedad saturante, a una densidad de 1X10⁵ células/ml para todas las líneas celulares, con una resiembra de cada 48 horas (ATCC). Hasta el momento de la extracción de ARN por el método de Trizol.

15.4. Microscopia

Las células fueron observadas regularmente con un microscopio óptico invertido para examinar la morfología, viabilidad, posibles contaminaciones, etc. Se tomaron 25 μ l del

medio con las células para tomar la alícuota para el conteo celular, junto con 25µl de azul de tripano para poder observar la viabilidad, la cual se realizó haciendo un conteo en la cámara de Neubauer contando sobre la cuadrícula de 0.25mm de lado. Una vez hecho el conteo se hizo el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ Células} = \frac{(\# \text{ Células contadas})(\text{Volumen del medio})(\text{Dilución c/azul de tripano})(10,000)}{\# \text{ Número de cuadrantes contados}}$$

La cual nos ayuda para tener la densidad de 150,000 cel/ml las cuales son requeridas para la resiembra. Se tomó el volumen con la densidad celular requerida, la cual se adicionó al frasco y se ajustó el volumen con el medio de cultivo requerido. Finalmente se observó el cultivo para verificar las células después de la siembra.

15.5. Consulta bibliográfica para la estandarización de los oligos para la detección de los transcritos quiméricos

Para poder detectar los genes quiméricos seleccionados se utilizaron secuencias de iniciadores (Cuadro 11), utilizando la herramienta bioinformática (Blast), para verificar que estas secuencias alinearan en los sitios específicos que se necesitaban amplificar, de acuerdo a la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Cuadro 11. Secuencia de iniciadores para la amplificación por PCR de punto final para la detección de los transcritos quiméricos en LMA.

Rearreglo	Nombre	Secuencia
<i>BCR-ABL</i> Mayor	BCR	5'-ACA GAA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG -3'
	ABL	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G -3'
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	RUNX1	5'-CTA CCG CAG CCA TGA AGA ACC-3'
	RUNX1T1	5'-AGA GGA AGG CCC ATT GCT GAA-3'
<i>CBFB-MYH11</i>	CBFB	5'-GCA GGC AAG GTA TAT TTG AAG G-3'
	MYH11	5'-TCC TCT TCT CCT CAT TCT GCT C-3'
<i>PML-RARα</i>	PML	5'-CAG TGT ACG CCT TCT CCA TCA-3'
	RARα	5'-GCT TGT AGA TGC GGG GTA GA-3'

15.6. Evaluación para PCR en punto final

Con el ADNc almacenado a -20°C , se realizó las mezclas para detectar los transcritos quiméricos, así como el gen endógeno ABL en las 19 muestras de pacientes con LMA, siguiendo concentraciones específicas para el caso del gen endógeno, mediante el Kit Invitrogen Platinum Taq Dna Polymerase (Cuadro 12). El termociclador utilizado fue SEE AMPTM (SEEGENE), con el siguiente procedimiento:

- 1) Se esterilizó debidamente el material necesario para el PCR punto final.
- 2) De acuerdo al número de muestras se preparó la reacción.
- 3) Utilizando condiciones específicas para la detección del gen endógeno.

Cuadro 12. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para la detección de transcritos quiméricos.

Reactivo	Cantidad para una muestra
Buffer 10x	2 μl
MgCl	0.6 μl
dNTP's	0.4 μl
Iniciador F	0.5 μl
Iniciador R	0.5 μl
Taq polimerasa	0.1 μl
ADNc	0.5 μl
H ₂ O	15.4 μl

Se obtuvo un volumen final de 20 μl por cada tubo, posteriormente se procedió a meter en un termociclador SEE AMPTM (seegene), con condiciones establecidas para el caso de la detección del gen ABL (Cuadro 13), así como la detección de los transcritos quiméricos (Cuadro 14), las cuales tuvieron variaciones en cuanto a temperaturas y tiempos.

Cuadro 13. Condiciones para la amplificación del gen endógeno ABL en muestras de LMA por PCR punto final.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 minutos	35
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Alineamiento	60°C	30segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	
	4°C	∞	

Cuadro 14. Condiciones para la amplificación por PCR en punto final para la detección de los transcritos quiméricos en LMA.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	3 minutos	35
Desnaturalización	94°C	45 segundos	
Alineamiento	63°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto 50 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	
	4°C	∞	

15.7. Visualización de los productos de PCR

Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 2%, colocado en una cámara de electroforesis Mini-sub cell GT (BIO-RAD).

- Se pesó 1g de agarosa y se disolvió en 50ml de TAE 1x por calor, agitando levemente. Se añadió 1.2µl de bromuro de etidio para permitir la visualización de las muestras.
- Se colocó 5µl de muestra con el buffer de carga, y un marcador de rango de 100pb a 1000pb.
- Se conectó la cámara a 90w aproximadamente una hora para llevar a cabo la electroforesis. Los productos de gel se analizaron en un transiluminador UV de Imager Gel Doctm Ez Imager (BIO-RAD).

16.Resultados

16.1. Concentraciones de muestras para la estandarización de la detección de los transcritos quiméricos

Para poder realizar la detección de los transcritos se necesitó tener controles positivos para cada uno de los genes que se detectaron, por lo que se cultivaron líneas celulares las cuales se mantuvieron una densidad de 5×10^5 , con resiembras cada 48 horas. Una vez obtenidas las densidades deseadas se prosiguió a realizar las extracciones de ARN. De las muestras y las líneas celulares, se obtuvo para el ARN las siguientes concentraciones (cuadro 15).

Cuadro 15. Concentraciones obtenidas de las extracciones de ARN, visualizadas en espectrofotómetro.

Muestra	ng/ μ l	260/280 nm
2	351.365	1.972
3	2707.885	1.163
4	368.245	1.897
5	2304.485	1.879
6	465.525	1.981
7	2762.85	1.458
8	1142.565	2.009
9	752.85	2.042
10	2289.68	2.02
11	1221.68	2.07
12	1688.8	2.06
13	2806.6	1.11
14	422.96	1.9

15	152.96	1.856
16	108.16	1.80
17	668.16	2.045
18	941.92	2.274
19	148.32	1.797
20	858.64	1.878
NB-4	1832.96	1.978
K-562	1523.6	2.026

16.2. PCR *in silico* de los iniciadores para la detección de los transcritos quiméricos

De la consulta bibliográfica de los iniciadores se procedió a realizar un PCR *in silico*, con la finalidad de verificar que realmente esos iniciadores se estaban alineando en las secuencias específicas de las alteraciones que se necesitaban visualizar por PCR, ambos pares de iniciadores se verificaron por medio del programa “BLAST Assembled Ref Seq Genomes” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Figura 7). Esto con la finalidad de comprobar que estos iniciadores fueran los óptimos de acuerdo a las revisiones bibliográficas realizadas para la detección de los transcritos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*, así como del gen constitutivo *ABL*.

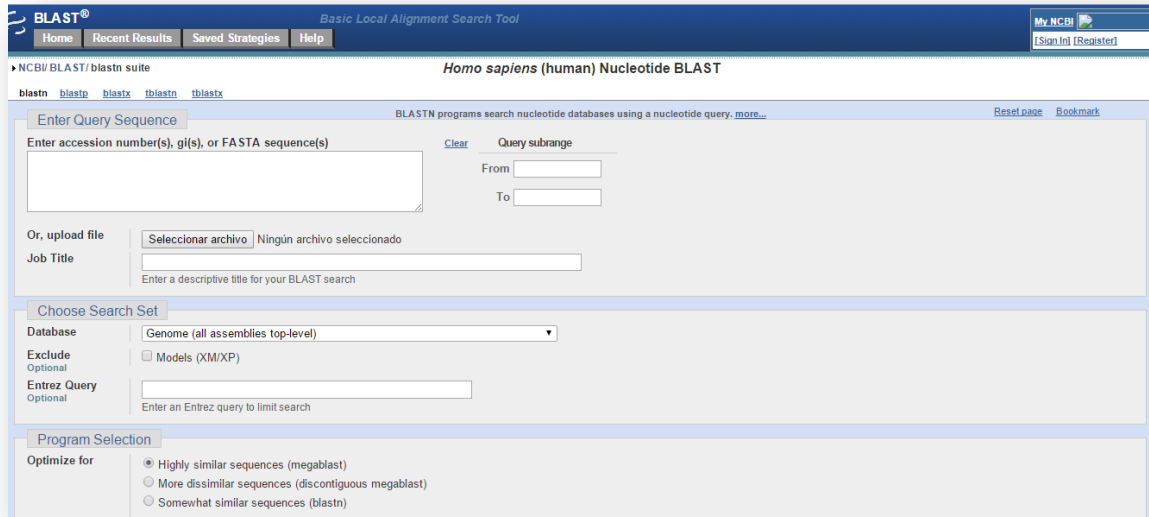


Figura 7. Programa Blast utilizado para la verificación de los iniciadores.

Una vez realizado el PCR *in silico* se pudo obtener de las secuencias previamente establecidas por las referencias bibliográficas el producto de PCR (Cuadro 16) para con esto poder proseguir en la detección de los transcritos.

Cuadro 16. Producto de PCR para las secuencias de iniciadores.

Transcripto	Iniciadores	Producto de PCR (pb)
ABL	5'-GGCCA GTA GCATCTGACTTTG-3'	290
	5'-ATGGTACCA GGA GTGTTTCTCC-3'	
RUNX1-RUNX1T1	5'-CTA CCG CAG CCA TGA AGA ACC-3'	395
	5'-AGA GGA AGG CCC ATT GCT GAA-3'	
PML-RARα	5'-CAG TGT ACG CCT TCT CCA TCA-3'	381
	5'-GCT TGT AGA TGC GGG GTA GA-3'	
CBFB-MHY11	5'-GCA GGC AAG GTA TAT TTG AAG G-3'	418
	5'-TCC TCT TCT CCT CAT TCT GCT C-3'	
BCR-ABL	5'-ACA GAA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG -3'	385

16.3. Características clínicas de las muestras de pacientes con LMA.

De las muestras clínicas se obtuvieron 20 muestras de pacientes con pronóstico de LMA de las cuales 13/20 del total de las muestras correspondieron al género masculino representando de esta manera un porcentaje mayor (65%) que el obtenido con las muestras del género femenino con un total de 7/20 (Figura 8) del total de las muestras con un porcentaje del 35%.

Grafica de Género

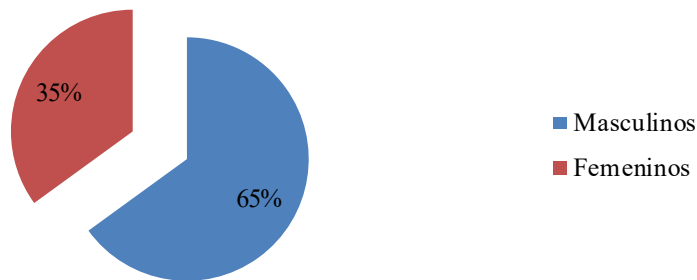


Figura 8. Porcentaje de relación de muestras de acuerdo al género.

Del total de pacientes que se obtuvieron 17 de ellos fueron de novo (85%), y solo tres de ellos (15%) ingresaron por recaída después de haber pasado la etapa de inducción a quimioterapia.

Estos pacientes al momento de ingresar tenían características clínicas como fue su cuenta de leucocitos (WBC) al momento del diagnóstico la cual tuvo un promedio de 25090.76 de glóbulos blancos por μl . El promedio de deshidrogenasa láctica (LDH) fue de 460.28 u/L, así como la cuenta de blastos que presentaban la cual tuvo un promedio de 41%, lo que les confería un estado más delicado al momento del diagnóstico (Cuadro 17).

Cuadro 17. Características clínicas de los pacientes con LMA.

Muestras totales	20	Cuenta de WBC	
Genero		Rango	Promedio
Masculinos	Femeninos	4.2- 103000	25090.76
13(65%)	7(35%)	LDH	
% De blastos		Rango	Promedio
Rango	Promedio	300- 856	460.28
1-93%	41%	Edad	
		Rango	Promedio
Recaída	Novo	16- 87	44.76
3(15%)	17(85%)		

Rangos normales de WBC 4,500- 10,000 glóbulos blancos por μ l; LDH de 105-333 u/L en personas sanas

16.4. Detección del gen endógeno ABL para validación del ADNc

Del total de las 19 muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda estas se corrieron en un PCR de punto final con los iniciadores que amplifican para la detección del gen endógeno ABL, el cual nos aseguró la integridad de las extracciones, y lo que nos ayudó para comprobar que el ADNc que se realizó de las muestras tuvieran una amplificación adecuada.

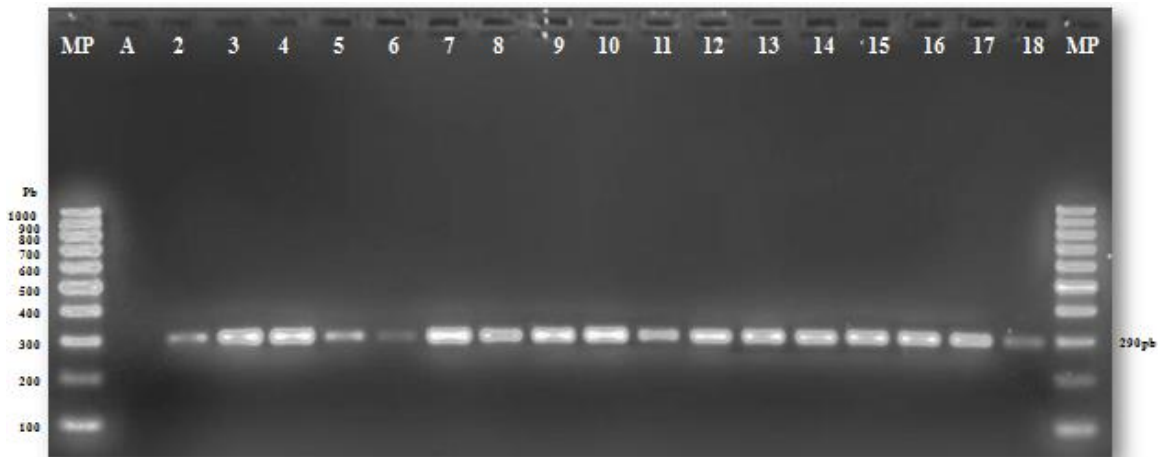


Figura 9. Detección del gen endógeno ABL en muestras de pacientes con LMA. Por medio de electroforesis del PCR con un producto de 290pb. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; carril A para control negativo; Carril 2-18 Muestras de pacientes con LMA. *LMA, Leucemia mieloide aguda.

En base a las características de los iniciadores el producto esperado fue de 290pb, esto se pudo observar al momento visualizar las muestras en un gel de agarosa al 2% como se puede observar en las figuras 9 y 10 respectivamente, donde se tuvo la amplificación correcta de las 19 muestras, lo que nos confirma que se realizó una correcta extracción de las muestras.

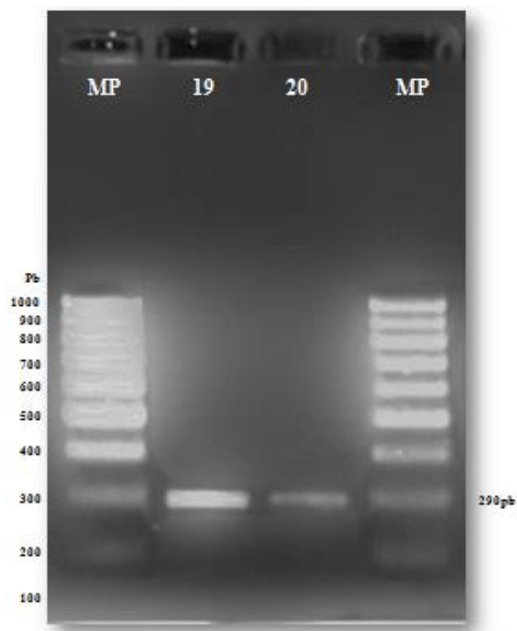


Figura 10. Detección del gen endógeno ABL en muestras de pacientes con LMA. Por medio de electroforesis del PCR con un producto de 290pb. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; Carril 19-20 Muestras de pacientes con LMA.

16.5. Detección del gen *BCR-ABL*

Al comprobar la visualización en el gel de agarosa al 2% de los productos de PCR para la detección del transcrito *BCR-ABL* se observó que para el total de las 19 muestras de LMA, no se detectó amplificación para este gen, presentando solamente la amplificación del control positivo que se utilizó del cual se obtuvo un producto de 385pb. Por lo tanto, el 100% de las muestras fue negativo a la presencia del transcrito.



Figura 11. Detección del transcrito quimérico *BCR-ABL* Mayor para muestras de pacientes con LMA.
 Carril MP; Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; carril A para control negativo; carril B para control Positivo de la línea celular K-562; Carril 2-17 Muestras de pacientes con LMA; Muestras 18-20 no mostradas.

16.6. Detección de gen *PML-RAR α*

Para la visualización del transcrito *PML-RAR α* , en las 19 muestras se esperó una amplificación de 381pb, lo cual se confirmó como se muestra en la figura 12, donde se observa que las muestras 2, 11 y 14 tuvieron una amplificación para este transcrito, junto con el positivo que se utilizó en este caso, teniendo de esta forma 3 muestras positivas para este gen de fusión.

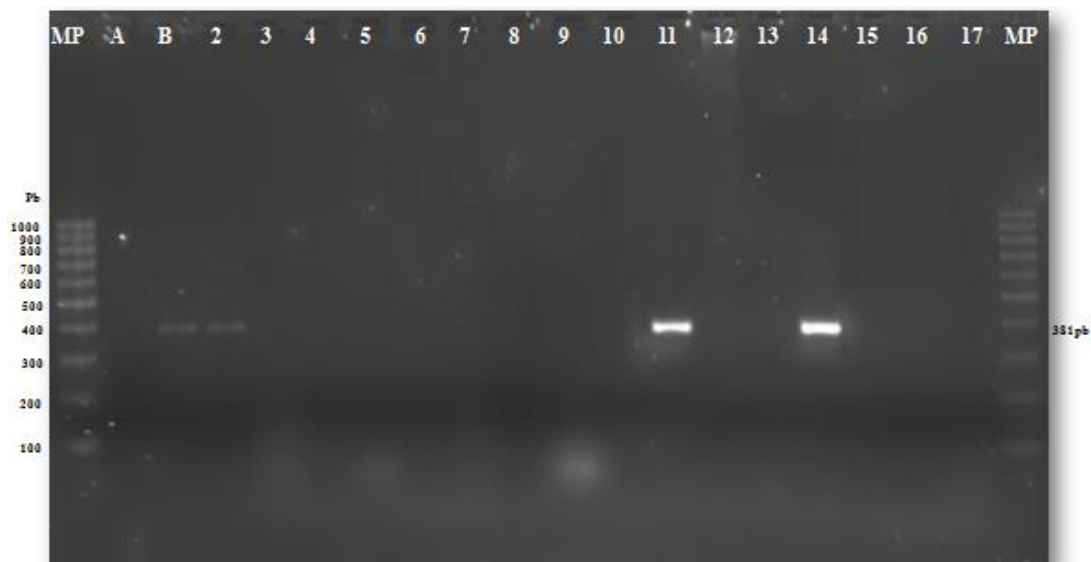


Figura 12. Detección del transcrito quimérico PML-RAR α en muestras de pacientes con LMA. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb, carril A para control negativo, carril B de control positivo para la línea celular NB4; Carril 2-17 Muestras de LMA; Muestras 18-20 no mostradas; carril 2,11 y 14, muestras positivas para el transcrito quimérico.

16.7. Detección del gen *RUNX1-RUNX1T1*

Posteriormente para la detección del transcrito quimérico *RUNX1-RUNX1T1* se tomó en cuenta un total de 16 muestras, excluyendo de esta manera las muestras 2, 11 y 14 las cuales resultaron positivas para *PML-RAR α* . El producto de PCR esperado para este transcrito fue de 395pb lo que se puede observar en la figura 13, donde se muestra que del total de las muestras no se pudo obtener ninguna muestra positiva para este gen, ya que solo se tuvo la amplificación del control positivo.

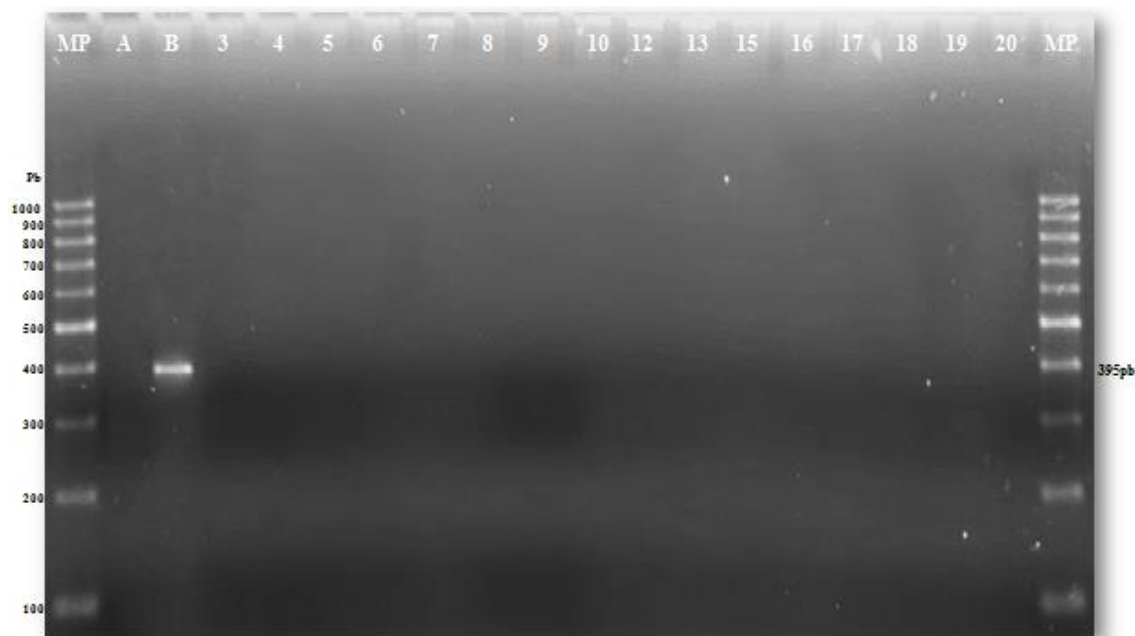


Figura 13. Detección del transcrito quimérico *RUNX1-RUNX1T1* para muestras de leucemia mieloide aguda. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; carril A para control negativo; carril B para control positivo; Carril 3-20 muestras de LMA.

16.8. Detección del gen *CBFB-MHY11*

Para la detección del transcrito quimérico *CBFB-MHY11* no se obtuvieron de igual manera muestras positivas para este transcrito, en el cual se esperaba tener un producto de 418pb, lo que se puede observar en las imágenes 14 y 15 donde solo se tuvo la amplificación del control positivo utilizado.

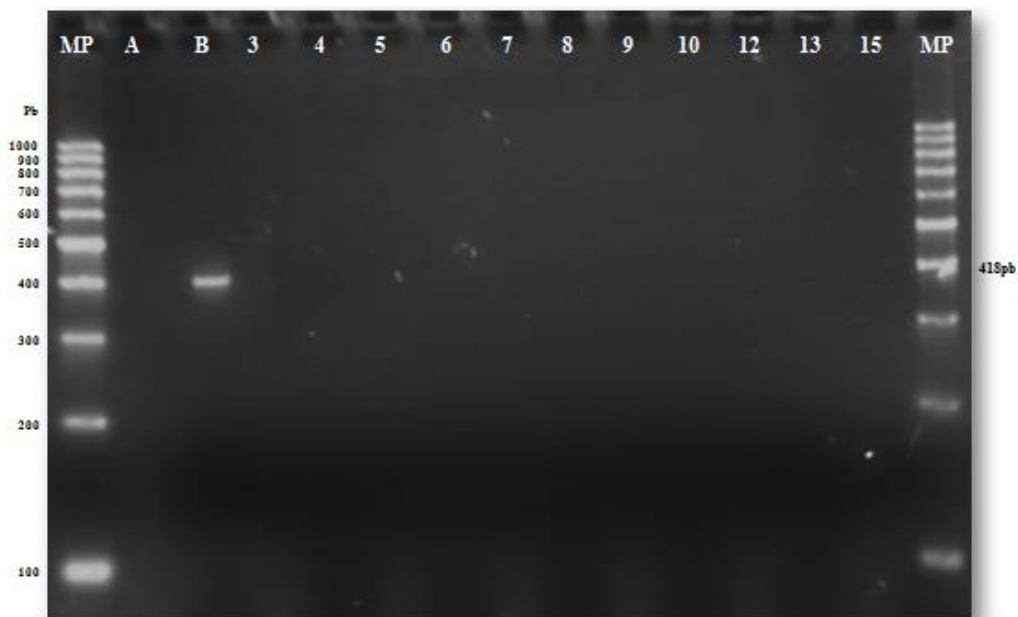


Figura 14. Detección del transcrito quimérico *CBFB-MHY11* para muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; carril A para control negativo; carril B con el control positivo; Carril 3-15 muestras de pacientes con LMA negativas.

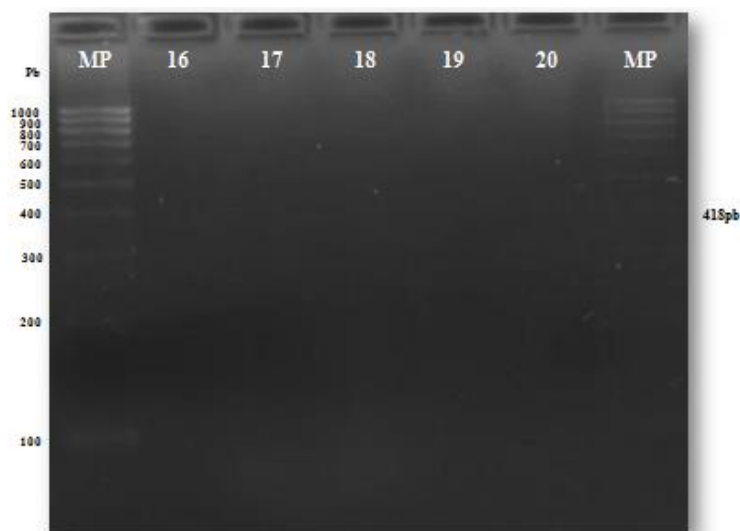


Figura 15. Detección del transcrito quimérico *CBFB-MHY11* para muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda. Carril MP, Marcador de peso molecular de 100pb a 1000pb; Carril 16-20 muestras de pacientes con LMA negativas.

Para el total de las muestras colectadas en el periodo de este trabajo se reportó como diagnóstico inicial en una muestra (5%) un tipo de LMA M1, de igual manera la LMA M5 estuvo presente en otro paciente (5%), mientras que la LMA M2 se mostró en 2 pacientes (10%), teniendo en mayor porcentaje los tipos de LMA M3 y M4 en 4 pacientes (20%) y con 3 pacientes (15%) respectivamente, aunque en 7 pacientes (35%) solamente se trabajó como un tipo probable de LMA y solo en dos pacientes (10%) no se pudo tener un diagnóstico del paciente (Cuadro18).

Cuadro 18. Diagnóstico inicial y resultado molecular de pacientes con LMA.

Caso	Diagnóstico Inicial	Estudio Molecular
1	MLA (M5)	-
2	LMA (M3)	PML-RAR α
3	LMA	Negativo
4	LMA (M1)	Negativo
5	LMA	Negativo
6	LMA	Negativo
7	LMA (M2)	Negativo
8	LMA (M2)	Negativo
9	LMA (M3)	Negativo
10	LMA (M4)	Negativo
11	LMA	PML-RAR α
12	LMA	Negativo
13	LMA (M3)	Negativo
14	LMA (M3)	PML-RAR α
15	LMA	Negativo
16	-	Negativo
17	LMA (M4)	Negativo
18	-	Negativo
19	LMA (M4)	Negativo
20	LMA	Negativo

17. Discusión

La leucemia en adultos, es un cáncer que en la mayoría de los casos no se puede curar, especialmente entre mayores de 40 años, grupo de individuos donde se comporta con mayor agresividad y que en caso de recaídas tras un tratamiento inicial no se cuenta con muchas opciones de atención. También se encuentra entre las primeras causas de mortalidad relacionadas con el cáncer, y de acuerdo con las estadísticas del GLOBOCAN 2012 (IARC) el número de muertes estimadas para el año 2012 fue de 4264 en ambos géneros de la población mexicana, el cual tuvo un cambio demográfico estimado de 376 para el año 2015 representando un total de 4640 muertes.

Respecto al total de las 20 muestras de sangre periférica recolectadas de pacientes de LMA, se obtuvo un mayor número de muestras de pacientes varones (65%) que en pacientes femeninos con el 35% del total de muestras recolectadas, esta incidencia se correlaciona con los datos de nuevos casos presentados en México por el GLOBOCAN 2012 (IARC), donde establece que el número de nuevos casos para el año 2015 represento un total de 6857, prevaleciendo en mayor medida en pacientes masculinos con un porcentaje del 52% del total de casos reportados sobre el 48% de pacientes femeninos, los cuales de acuerdo a los datos clínicos obtenidos de las pacientes del servicio de hematología del hospital Juárez de México, se presentaron en mayor medida en los pacientes que tuvieron edades por debajo de los 65 años.

Después de tener los datos clínicos se prosiguió a realizar la amplificación del gen endógeno ABL en todas las muestras, ya que con este se descartó la posibilidad de falsos negativos, debido a la probable presencia de inhibidores de PCR en las muestras, tal como la recomendación de la comisión Europea (JCR, 2010a; JCR 2010c), la cual sugiere que se debe efectuar un experimento de un control de la inhibición de la PCR mediante un gen constitutivo que se encuentra en un organismo en condiciones normales (Van Etten y col., 1999), tal es el caso del gen ABL, ya que de manera normal funciona señalizando y modificando el citoesqueleto de actina en las células hematopoyéticas humanas; y a nivel celular está involucrado en la regulación del ciclo celular en varios puntos de control, que afectan la proliferación celular y la genotoxicidad (Wang, 1998).

Posteriormente se realizó el análisis de las cuatro translocaciones de nuestro estudio en las 19 muestras, encontrando primero que para el transcrito quimérico *PML-RAR α* , 3 de 19 muestras fueron positivas para este transcrito, representando de esta forma tan solo el 15.8% del total de las muestras analizadas del servicio de hematología. Esto coincide con otros resultados como los obtenidos por Cho Y-U (2012) donde con una población de 77 muestras de pacientes con diagnóstico de LMA obtuvo ocho muestras con el transcrito quimérico *PML-RAR α* el cual represento un porcentaje del 9% en comparación del total de las muestras. Otro aspecto es que de acuerdo a mismos resultados obtenidos por Cho, sugiere que en raros casos de leucemia aguda promielocítica (APL) la inserción submicroscópica de *RAR α* en *PML* conduce a la expresión del transcrito *PML-RAR α* .

Para la detección del gen *BCR-ABL* en las muestras de pacientes, esta incidencia del cromosoma filadelfia en leucemia mieloide aguda de *novο* es baja, representa aproximadamente del 0.3-4%, lo que es muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo, ya que ninguna de las 19 muestras que se obtuvieron para el análisis de esta translocación amplificó para este transcrito. Según lo reportado por Emilie y col. (2015) es su estudio de una población de 400 pacientes con diagnóstico de LMA encontró dos casos de Ph+LMA, lo que representó al 0.5%. Al igual que Cho Y-U (2012) solo obtuvieron un paciente que presentó tanto el transcrito *PML-RAR α* como el *BCR-ABL1*, alcanzando el 1%. Esto se relaciona a que hay criterios que sugieren el poder diferenciar Ph+LMA de LMC que van desde las ausencias hematológicas ausentes, fases aceleradas características de la LMC después de una inducción a quimioterapia, y la falta de características clínicas y de laboratorio como esplenomegalia y basofilia. Para aumentar las posibilidades de detección, se requiere aumentar el número de muestras.

De las 19 muestras de LMA que se utilizaron para realizar la detección del transcrito quimérico *RUNX1-RUNX1T1 (AML-ETO)* no se detectaron muestras positivas para este transcrito. Esta anomalía cromosómica t(8;21) es la más frecuentemente asociada con sarcoma granulocítico (GS) y ocurre en un 18% de los pacientes con AML t(8;21), y de acuerdo a lo reportado por Fujieda (2006) en Japón de 79 casos reportados en su estudio con LMA, solo 5 de ellos (que representaron el 7%) presentaron esta anomalía. Estos datos indican que la frecuencia con la que se detecta este transcrito, representa un bajo

porcentaje. En comparación con los resultados de este trabajo, donde no se obtuvo la amplificación del transcrito en alguna de las 19 muestras analizadas.

En contraste el último análisis en las muestras para la detección del gen *CBFB-MYH11*, esta frecuencia de la Inv(16) en el trabajo de Fujieda (2006), solo 12 casos de los 79 presentaron esta anomalía, equivalente al 15%. Por otra parte, diez diferentes tipos del transcrito de fusión *CBFB-MYH11* han sido identificados por RT-PCR, donde aproximadamente el 85% de estos pertenece al tipo A; la significancia clínica o biológica no ha sido clara hasta el momento. En este trabajo, no se detectó amplificación del transcrito quimérico *CBFB-MHY11* en ninguna de las muestras, lo que sugiere una variación amplia en los tipos probables que se están presentando en las muestras colectadas del hospital Juárez de México o de igual manera debido al tamaño de muestras analizadas. Estos bajos porcentajes de detección se encuentran correlacionados con los reportes de Monma (2007) que es su estudio para 224 muestras por medio del análisis de RT-PCR detectó 17 casos (7.6%) que tenían transcrito de fusión *CBFB-MHY11*.

Por último se pudo observar en relación al diagnóstico inicial que la muestra 2 y la muestra 14 las cuales tenían reportado una pro- LMA M3 se pudo corroborar mediante el estudio por PCR que estas muestras fueron positivas para el transcrito quimérico *PML-RAR α* el cual es característico en LMA M3, al igual que en la muestra 11 donde solo se reportó como pro- LMA, también fue positiva para este gen el cual presenta la translocación t(15;17). Se puede comprobar que los métodos moleculares basados en PCR, pueden acelerar el diagnóstico, dando un mayor grado de confiabilidad, pudiendo así complementar los estudios de inmunofenotipo y citogenético para el diagnóstico de la LMA, además de que reduce el tiempo del mismo, ya que por este método se pudieron obtener 3 muestras las cuales fueron positivas para el transcrito quimérico *PML-RAR α* . Una de las limitantes que pueden ser factor en la detección de los transcritos quiméricos fue la cantidad de muestras de que procesaron en el periodo que comprendió este trabajo, donde se pudo obtener un total de 20 muestras, de las cuales solo 19 de ellas fueron viables para seguir el procedimiento, ya que la primera de estas muestras clínicas al momento de la extracción no se tuvo un correcto manejo de la muestra, lo que impidió el poder realizar la amplificación de los transcritos.

Debido a la diversidad de puntos de rompimiento asociados y a las variantes en cada cromosoma implicado en los sitios de unión, un subconjunto de defectos genéticos podría permanecer sin ser detectados por análisis de PCR, a pesar de un aparente resultado citogenético normal. Sin embargo, un esfuerzo para la modificación de la técnica será obligatorio para obtener la mejora continua en el rendimiento para el diagnóstico de los pacientes con LMA, basándose en los ensayos por PCR.

Por otra parte, es importante mencionar que en la mayoría de las instituciones de nuestro país la atención de los pacientes con este tipo de neoplasias ha sido enfocada a la restauración del daño, debido a que se carece de programas de tipo preventivo, por lo que resulta urgente evaluar alternativas concretas tanto de prevención primaria como de detección oportuna, las cuales permitan contener el peso de ellas sobre la salud de la población y la modificación de factores de riesgo de alta prevalencia. Desafortunadamente, existen limitaciones para obtener un cariotipo en algunos de los casos (Borowitz y Chan, 2008). Aunado a que en muchos de los casos esta técnica de análisis del bandeo cromosómico puede llevar semanas para el análisis completo de las metafases, por lo que se requiere la implementación junto con otras técnicas para poder dar una valoración más rápida a los pacientes. Es así como la técnica de PCR se coloca como una alternativa para la citogenética ya que provee una rápida detección de los transcritos quiméricos clínicos más importantes, además de que las translocaciones crípticas proporcionan información genética adicional que es de utilidad clínica. La PCR es una herramienta de detección útil en la leucemia aguda, ya que proporciona la detección rápida y fiable de transcritos clínicamente importantes. Aunque la PCR no puede sustituir totalmente a la citogenética convencional, sirve como una prueba de diagnóstico auxiliar, además que puede ser utilizada como una plataforma para la estratificación del riesgo en la leucemia aguda.

18. Conclusiones

- ❖ Se edificaron los iniciadores para la detección de los transcritos quiméricos *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RAR α* , *BCR-ABL* y *CBFB-MYH11*, con la herramienta bioinformática BLAST.
- ❖ Con esta metodología pudo identificarse solo la t(15;17)(q22;q21) en tres pacientes para el transcrito *PML-RAR α* .
- ❖ Aunque se estandarizo la técnica de identificación de los diferentes transcritos esta no pudo ser corroborada debido a que en algunos casos faltó el control positivo en línea celular por lo que se utilizaron solo muestras positivas.
- ❖ Esta técnica tiene un mayor grado de sensibilidad, y es más económica con respecto a otros métodos utilizados.

19. Perspectivas

- ❖ Corroborar por diferentes técnicas la identificación de las translocaciones propuestas para validar la técnica.
- ❖ Se incrementara el número de muestras de pacientes así como el número de translocaciones para tener mayores posibilidades de detección.
- ❖ Siendo una institución abierta, donde se reciben pacientes provenientes de toda la república, se tendrá un diagnóstico más rápido y eficaz en pacientes con LMA.

20.Referencias bibliográficas

- (1988). "Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group." *Br J Haematol*68(4): 487-494.
- Acosta E. (2007). Protocolo de tratamiento con el esquema NOPHO-AML93 modificado en pacientes pediátricos del HIMFG con leucemia mieloide aguda. hospital infantil de México Federico Gómez departamento de oncología.
- Alvarez S, Cigudosa JC. 2005. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 23(1):18-25.
- American Type Culture Collection. The Global Bioresource Center. Disponible en : <http://www.atcc.org/>.
- Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, Tong X, Behm FG, Head DR, Srivastava DK, Rubnitz JE, Bowman L, Pui CH and others. 2001. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood* 97(12):3727-32.
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Disponible en: <http://atlasgeneticsoncology.org/>.
- Baldus, C. D., K. Mrozek, G. Marcucci and C. D. Bloomfield (2007). "Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review." *Br J Haematol*137(5): 387-400.
- Behm F. (2003). Classification of Acute Leukemias. Perspective. *Current Clinical Oncology: Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research*.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 1995;9:1783-6.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Galnick and C. Sultan (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." *Br J Haematol*33(4): 451-458.

- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick and C. Sultan (1985). "Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group." *Ann Intern Med*103(4): 620-625.
- Berger R. Differences between blastic chronic myeloid leukemia and Ph-positive acute leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1993;11(suppl 1):235-237.
- Bio excellence. Disponible en: <http://bio-goods.com/>.
- BLAST. Basic Local Alignment Search Tool. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Borowitz MJ, Chan JKC. (2008). B Lymphoblastic Leukaemia/Lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. *Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC.
- Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, Gale RE, Hills R, Linch DC. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* 2009; 23: 203-206.
- British Committee for Standards in, H., D. W. Milligan, D. Grimwade, J. O. Cullis, L. Bond, D. Swirsky, C. Craddock, J. Kell, J. Homewood, K. Campbell, S. McGinley, K. Wheatley and G. Jackson (2006). "Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults." *Br J Haematol*135(4): 450-474.
- Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein and E. S. Jaffé (2011). "The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications." *Blood*117(19): 5019-5032.
- Candelaria M, Luna-Ochoa E, Labardino-Méndez J, Herrera-Aguilar A, Gutiérrez-Hernández O, SerranoOlvera A. Virus y neoplasmas hematológicos. *Cancerología* 2009;(4):217-225. Disponible en <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1272302647.pdf>
- Casanovas, R. O., F. K. Slimane, R. Garand, G. C. Faure, L. Campos, V. Deneys, M. Bernier, A. Falkenrodt, G. Lecalvez, M. Maynadie and M. C. Bene (2003). "Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome." *Leukemia*17(3): 515-527.

- Cason, J. D., J. M. Trujillo, E. H. Estey, Y. O. Huh, E. J. Freireich and S. A. Stass (1989). "Peripheral acute leukemia: high peripheral but low-marrow blast count." *Blood*74(5): 1758-1761.
- Cassinat B, Chomienne C. 2001. Biological features of primary APL blasts: their relevance to the understanding of granulopoiesis, leukemogenesis and patient management. *Oncogene* 20(49):7154-60.
- Castilla LH, Garrell L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Liu PP. The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia. *Nat Genet* 1999; 23: 144-146.
- Cheson, B. D., P. A. Cassileth, D. R. Head, C. A. Schiffer, J. M. Bennett, C. D. Bloomfield, R. Brunning, R. P. Gale, M. R. Grever, M. J. Keating and et al. (1990). "Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia." *J Clin Oncol*8(5): 813-819.
- Cigudosa JC, Odero MD, Calasanz MJ, Sole F, Salido M, Arranz E, MartinezRamirez A, Urioste M, Alvarez S, Cervera JV and others. 2003. De novo erythroleukemia chromosome features include multiple rearrangements, with special involvement of chromosomes 11 and 19. *Genes Chromosomes Cancer* 36(4):406-12.
- Civin, C. I. and S. D. Gore (1993). "Antigenic analysis of hematopoiesis: a review." *J Hematother*2(2): 137-144.
- Crespo-Solís E. Epidemiología de las leucemias agudas. *Rev Hematologia* 2010;11(Supl 1):37-39.
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Frohling S, Dohner H. 2005. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics - interaction with other gene mutations. *Blood*.
- Fadoo, Z., N. Mushtaq, S. Alvi and M. Ali (2012). "Acute myeloid leukaemia in children: experience at a tertiary care facility of Pakistan." *J Pak Med Assoc*62(2): 125-128.

- Fischer, K., C. Scholl, J. Salat, S. Frohling, R. Schlenk, M. Bentz, S. Stilgenbauer, P. Lichter and H. Dohner (1996). "Design and validation of DNA probe sets for a comprehensive interphase cytogenetic analysis of acute myeloid leukemia." *Blood*88(10): 3962-3971.
- Frohling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2002. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 100(13):4372-80.
- Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Dohner H, Dohner K. 2004. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 22(4):624-33.
- Fung H, Shepherd JD, Naiman SC, Barnett MJ, Reece DE, Horsman DE, Nantel SH, Sutherland HJ, Spinelli JJ, Klingemann HG and others. 1995. Acute monocytic leukemia: a single institution experience. *Leuk Lymphoma* 19(34):259-65.
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V. H. J., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J. M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J. L. E., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., & van Dongen, J. J. M. (2003). Standardization and quality control studies of /real-time/ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, Vol. 17, No.12, 2318-2357, 0887-6924.
- Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Goasguen, J. E., T. Matsuo, C. Cox and J. M. Bennett (1992). "Evaluation of the dysmyelopoiesis in 336 patients with de novo acute myeloid leukemia: major importance of dysgranulopoiesis for remission and survival." *Leukemia*6(6): 520-525.
- Gordon, M. Y. y Barret, M. J. (1985) Blackwell Scientific Publications, UK. p.3.

- Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I and others. 1998. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391(6669):815-8.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal normalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.
- Grimwade D, Lo Coco F. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1959-1973.
- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
- Grimwade, D. (1999). "The pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease." *Br J Haematol*106(3): 591-613.
- Grimwade, D., H. Walker, F. Oliver, K. Wheatley, C. Harrison, G. Harrison, J. Rees, I. Hann, R. Stevens, A. Burnett and A. Goldstone (1998). "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties." *Blood*92(7): 2322-2333.
- Grimwade, D., R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett and G. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working (2010). "Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials." *Blood*116(3): 354-365.

- Guía práctica clínica; Diagnóstico y tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda; México: Secretaria de Salud; 2010.
- Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008; 22 :1539-1541.
- Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. 2002. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol* 118(2):426-31.
- Han, J. Y., K. E. Kim, K. H. Kim, J. I. Park and J. S. Kim (2007). "Identification of PML-RARA rearrangement by RT-PCR and sequencing in an acute promyelocytic leukemia without t(15;17) on G-banding and FISH." *Leuk Res*31(2): 239-243.
- Harris, N. L., E. S. Jaffè, J. Diebold, G. Flandrin, H. K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T. A. Lister and C. D. Bloomfield (1999). "World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997." *J Clin Oncol*17(12): 3835-3849.
- Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 2000;355:165-169
- Hazlehurst Lori A., PhD, Bewry Nadine N., PhD, Nair Rajesh R., PhD, Pinilla-Ibarz Javier, MD, PhD. Signaling Networks Associated With BCR-ABL–Dependent Transformation. *Cancer Control*, 2009;16,(2): 100-107.
- Hernández JM, Martín G, Gutiérrez NC, Cervera J, Ferro MT, Calasanz MJ, Martínez-Climent JA, Luño E, Tormo M, Rayón C, Díaz-Mediavilla J, González M, González-San Miguel JD, Pérez-Equiza K, Rivas C, Esteve J, Alvarez Mdel C, Odriozola J, Ribera JM, Sanz MA; PETHEMA Cooperative Group, Spain. Additional cytogenetic changes do not influence the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with an ATRA plus anthracyclin based protocol. A report of the Spanish group PETHEMA. *Haematologica* 2001; 86: 807-813.

- Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, McGlave P. 2005. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Hope, K. J., L. Jin and J. E. Dick (2003). "Human acute myeloid leukemia stem cells." *Arch Med Res*34(6): 507-514.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC, 2001.
- Jiao, B., C. F. Wu, Y. Liang, H. M. Chen, S. M. Xiong, B. Chen, J. Y. Shi, Y. Y. Wang, J. H. Wang, Y. Chen, J. M. Li, L. J. Gu, J. Y. Tang, Z. X. Shen, B. W. Gu, W. L. Zhao, Z. Chen and S. J. Chen (2009). "AML1-ETO9a is correlated with C-KIT overexpression/mutations and indicates poor disease outcome in t(8;21) acute myeloid leukemia-M2." *Leukemia*23(9): 1598-1604.
- Kakizuka, A., W. H. Miller, Jr., K. Umesono, R. P. Warrell, Jr., S. R. Frankel, V. V. Murty, E. Dmitrovsky and R. M. Evans (1991). "Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML." *Cell*66(4): 663-674.
- Kamikubo Y, Zhao L, Wunderlich M, Corpora T, Hyde RK, Paul TA, Kundu M, Garrett L, Compton S, Huang G, Wolff L, Ito Y, Bushweller J, Mulloy JC, Liu PP. Accelerated leukemogenesis by truncated CBF β -SMMHC defective in high-affinity binding with RUNX1. *Cancer Cell* 2010; 17: 455-468.
- Kohl, T. M., S. Schnittger, J. W. Ellwart, W. Hiddemann and K. Spiekermann (2005). "KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor." *Blood*105(8): 3319-3321.
- Leroy, H., S. de Botton, N. Grardel-Duflos, S. Darre, X. Leleu, C. Roumier, F. Morschhauser, J. L. Lai, F. Bauters, P. Fenaux and C. Preudhomme (2005). "Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21)." *Leukemia*19(3): 367-372.
- Leucemias agudas. Disponible en : <http://es.slideshare.net/jcustodio91/leucemia-aguda>.

- Licht JD. 2001. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 20(40):5660-79.
- Long W M, Wicha MS. *The hemopoietic Microenvironment*. John Hopkins, 1993.
- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341(14):1051-62.
- Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett (1999). "Acute myeloid leukemia." *N Engl J Med* 341(14): 1051-1062.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-Abl oncogene products. *Science* 1990; 247:1079-82.
- Martens JHA, Stunnenberg HG. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett.* 2010;584:2662-9.
- Martin R., fernandez M., Barreiro M. (2001). cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *An Esp Pediatr*; 55 (1): 45-52.
- Mayani, H., L. J. Guilbert and A. Janowska-Wieczorek (1992). "Biology of the hemopoietic microenvironment." *Eur J Haematol* 49(5): 225-233.
- Melnick A, Licht JD. 1999. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93(10):3167-215.
- Melo Junia V. The diversity of BCR - ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88(7): 2375-84.
- Merino A. Clasificación de las leucemias agudas mieloides. *Rev Lab Clín.* 2010; 3(3):139-47 doi: 10.1016/j.labcli.2010.05.002.
- Minelli A, Maserati E, Rossi G et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;40:165-171
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:233-45.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. 1991. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10431-4.

- Mrozek K, Prior TW, Edwards C, Marcucci G, Carroll AJ, Snyder PJ, Koduru PR, Theil KS, Pettenati MJ, Archer KJ and others. 2001. Comparison of cytogenetic and molecular genetic detection of t(8;21) and inv(16) in a prospective series of adults with de novo acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 19(9):2482-92.
- Mundle, S. D. (2003). "Lingering biologic dilemmas about the status of the progenitor cells in myelodysplasia." *Arch Med Res*34(6): 515-519.
- NCCN Clinical Practice Guideline in Oncology (NCCN Guidelines®). Acute Myeloid Leukemia. Version 2.2014. NCCN.org. 2014.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). national comprehensive cancer network. Disponible en: <http://www.nccn.org/>.
- Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fièrè D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socié G, Dombret H. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloide leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood* 2002; 99: 3517-3523.
- Okumura AJ, Peterson LF, Okumura F, Boyapati A, Zhang DE. t(8;21)(q22;q22) fusion proteins preferentially bind to duplicated ARM1/RUNX1 DNA-binding sequences to differentially regulate gene expresion. *Blood* 2008; 112: 1392-1401.
- Owaidah, T. M., A. Al Beihany, M. A. Iqbal, N. Elkum and G. T. Roberts (2006). "Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system." *Leukemia*20(4): 620-626.
- Pacheco. A., Guerrero S., Sanson A., (2013). Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *Gaceta Mexicana de Oncología*; 12(3):162-173.
- Paschka, P., G. Marcucci, A. S. Ruppert, K. Mrozek, H. Chen, R. A. Kittles, T. Vukosavljevic, D. Perrotti, J. W. Vardiman, A. J. Carroll, J. E. Kolitz, R. A. Larson, C. D. Bloomfield, Cancer and B. Leukemia Group (2006). "Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study." *J Clin Oncol*24(24): 3904-3911.

- Perkins, S. and R. A. Fleischman (1988). "Hematopoietic microenvironment. Origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice." *J Clin Invest* 81(4): 1072-1080.
- Petzer, A. L. and E. Gunsilius (2003). "Hematopoietic stem cells in chronic myeloid leukemia." *Arch Med Res* 34(6): 496-506.
- Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, Leoni F, Ciolli S, Guglielmelli P, Antonioli E, Longo G, Bosi A, Vannucchi AM. 2006. The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 20(11):2074-6.
- Puccetti E, Ruthardt M. 2004. Acute promyelocytic leukemia: PML/RARalpha and the leukemic stem cell. *Leukemia* 18(7):1169-75.
- Radich Jerald P. The Biology of CML Blast Crisis. American Society of Hematology, 2007; 384 -391.
- Reilly T. (2004). Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?. Blackwell Publishing Ltd, *British Journal of Haematology*, 128, 18–34.
- Rojas A, Pineda L, González S, Soto M, Avila E, Urdaneta B, PrietoCarrasquero M, y González R. *Acta científica Venezolana*, 2000, 51:109-114.
- Romero A, Jiménez RM. Leucemias agudas. *Med Fam*. 2002; 3:40-48
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa stainig. *Nature* 1973; 243: 290-3
- Rowley, J. D., H. M. Golomb and C. Dougherty (1977). "15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia." *Lancet* 1(8010): 549-550.
- Rucker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Fröhling S, Bentz M, Miller S, Scholl C, Schlenk RF, Radlwimmer B, Kestler HA, Pollack JR, Lichter P, Döhner K, Döhner H. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3887-3894.

- Sans-Sabrafén J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL. Hematología Clínica, 5ª Ed. Editorial Elsevier. Madrid, España, 2005: pp. 409-421.
- Sanz MA. Leucemia mieloblástica aguda. Prous Science, Barcelona, 2001.
- Schlenk, RF., Benner, A., Krauter, J., Büchner, T., Sauerland, C., Ehninger, G., Schaich, M., Mohr, B., Niederwieser, D., Krahl, R., Pasold, R., Döhner, K., Ganser, A., Döhner, H. & Heil, G. (2004). Individual Patient Data–Based Meta-Analysis of Patients Aged 16 to 60 Years With Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol*, Vol. 22, No.18, 3741-50.
- Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM, Estey E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2009; 113: 28-36.
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075-4083
- Stass SA, Lanham GR, Butler D, Williams DL, Peiper SC, Kalwinsky DK, Dahl GV. 1984. Auer rods in mature granulocytes: a unique morphologic feature of acute myelogenous leukemia with maturation. *Am J Clin Pathol* 81(5):662-5.
- Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, Slovak ML, Willman CL, Radich JP. 2006. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107(9):3724-6
- Taylor AM. Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14:631-644.
- Tirado-Gómez L, Mohar-Betancourt A. Epidemiología de las neoplasias hematooncológicas. *Cancerología* 2007; (2):109-120.
- Torok-Strob B. Cellular interactions. *Blood* 1988; 72: 373-385.
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti G, Griesinger F, Parreira A, Gameiro P, Díaz MG, Malec M,

- Langerak AW, San Miguel JF, Biondi. 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* 1999; 13: 1901-1928.
- Van Etten R. (1999). Cycling stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*, 9(5); 179-186.
 - van Lom, K., A. Hagemeijer, F. Vandekerckhove, E. M. Smit and B. Lowenberg (1996). "Cytogenetic clonality analysis: typical patterns in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia." *Br J Haematol* 93(3): 594-600.
 - Vardiman JW, Matutes E, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A, et al. Therapy related myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: IARC, 2008;127-129.
 - Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.
 - Villamor N, Zarco MA, Rozman M, Ribera JM, Feliu E, Montserrat E. 1998. Acute myeloblastic leukemia with minimal myeloid differentiation: phenotypical and ultrastructural characteristics. *Leukemia* 12(7):1071-5.
 - Wang J. (1998). Cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*. 10(2): 240-247.
 - Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, Rees JKH, Stevens RF, Walker H. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. *Br J Haematol* 1999; 107; 69-79.
 - Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, Baldus CD, Wen J, Racke F, Powell BL and others. 2007. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct

geneexpression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*.

- Wintrobe MM. *Clinical Hematology*. 8th ed. Philadelphia Lea & Febiger. 1981, p35.
- Wognum, A. W., A. C. Eaves and T. E. Thomas (2003). "Identification and isolation of hematopoietic stem cells." *Arch Med Res*34(6): 461-475.
- Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. 2005. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19(8):1345-9.