



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"
SERVICIO DE ONCOLOGÍA PEDIATRICA



**ESTUDIO PILOTO DE TRASLOCACIONES RELEVANTES INVOLUCRADAS EN
LOS PACIENTES PEDIATRICOS MEXICANOS CON LINFOMA HODGKIN Y NO
HODGKIN DEL ÁREA DE ONCOLOGÍA PEDIATRICA, CENTRO MÉDICO
NACIONAL LA RAZA**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE ONCOLOGÍA
PEDIATRICA

PRESENTA

DRA. ELEONOR HIDALY RODRIGUEZ SANCHEZ
RESIDENTE DE ONCOLOGIA PEDIATRICA DE SEGUNDO AÑO

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

DRA. SUSANA ELIZABETH ANAYA AGUIRRE

INVESTIGADORES ASOCIADOS

DRA SANDRA ALICIA SANCHEZ FELIX
DRA. VILMA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ
DR. MIGUEL ANGEL VILLASIS KEVEER

MEXICO, DISTRITO FEDERAL A 05 DE AGOSTO DEL 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

Dra. Susana Elizabeth Anaya Aguirre

Enc. Jefatura de Oncología Pediátrica del Hospital Dr. Gaudencio González Garza del CMN La Raza

Teléfono: 5544633333

Correo electrónico: s311276@hotmail.com

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

Enc. Unidad de investigación biomédica del CMN La Raza

E-mail: bekkermendez@yahoo.com

Teléfono: 55 16 45 92 45.

Dra. Sandra Alicia Sánchez Félix

Enc. División de Pediatría del HG del CMN la Raza

E-mail: polosan@infosel.net.mx

Teléfono: 555 451 0690

Dr. Miguel Ángel Villasis Kever

Investigador Titular A

Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica CMNSXXI

E-mail: miguel_villasis@hotmail.com

Teléfono: 55 40 67 28 32

Dra. Eleonor Hiday Rodríguez Sánchez.

Residente del segundo año de Oncología Pediátrica de la UMAE Hospital General. Gaudencio González Garza CMN La Raza, IMSS.

Teléfono 017919133906.

Correo electrónico: howdy_eleo@hotmail.com.

H O J A D E F I R M A S

Dra. María Teresa Ramos Cervantes
Directora de Educación e Investigación en Salud

Dra. Susana Elizabeth Anaya Aguirre
Tutor de Tesis
Enc. De la Jefatura de Oncología Pediátrica

Dra. Sandra Alicia Sánchez Félix
Profesor titular del curso de oncología pediátrica
Enc. De la División de Pediatría Médica

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez
Enc. Unidad de investigación biomédica del CMN La Raza

Dr. Miguel Ángel Villasis Keever
Investigador Titular A del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI

Dra. Eleonor Hiday Rodríguez Sánchez
Residente de Segundo Año de Oncología Pediátrica

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
HOSPITAL GENERAL GAUDENCIO GONZALEZ GARZA**

INDICE

1. Resumen.....	5
2. Marco teórico.....	6
2.1 Linfoma de Hodgkin.....	11
2.1.1 Linfoma de Hodgkin Nodular de Predominio Linfocítico.....	12
2.1.2 Linfoma de Hodgkin Clásico.....	12
2.2 Linfoma No Hodgkin.....	16
2.2.1 Linfoma de Burkitt.....	17
2.2.2 Linfoma de Células B Grandes.....	19
2.2.3 Linfoma Linfoblástico.....	21
2.2.4 Linfoma Anaplásico.....	22
3. Justificación.....	25
4. Planteamiento del Problema.....	25
5. Objetivos.....	26
5.1 Objetivos Generales.....	26
5.2 Objetivos Específicos.....	26
6. Hipótesis.....	26
7. Condiciones generales de Trabajo.....	26
8. Consideraciones éticas y regulatorias.....	26
8.1 Regulaciones nacionales e internacionales.....	26
8.2 Confidencialidad.....	27
8.3 Consentimiento informado.....	27
9. Metodología.....	28
9.1 Población de estudio.....	28
9.2 Lugar de estudio.....	28
9.3 Período de estudio.....	28
9.4 Variables.....	28
9.6 Análisis estadístico.....	31
9.8 Logaritmo metodológico.....	31
9.9 Procesamiento de muestras.....	32
9.10 Extracción del RNA.....	33
9.11 Síntesis de DNA (retrotranscripción).....	33
9.12 Oligonucleótidos.....	34
10. Resultados.....	34
10.1 Discusión.....	38
10.2 Conclusión.....	39
12. Anexos.....	41
13. Bibliografía.....	45

ESTUDIO PILOTO DE TRASLOCACIONES RELEVANTES INVOLUCRADAS EN LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON LINFOMA HODGKIN Y NO HODGKIN DEL ÁREA DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA, CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

Autores: Anaya-Aguirre Susana, Sánchez-Félix Sandra, Rodríguez-Sánchez Eleonor Hidaly, Villasis-Keever Miguel Ángel, Bekker-Méndez Vilma Carolina.

1. RESUMEN

Los linfomas ocupan el segundo lugar en frecuencia a nivel internacional de los tumores sólidos en la edad pediátrica y el segundo lugar en las estadísticas mexicanas. El grupo etario más afectado es el de 10 a 14 años con el 60.4% de los linfomas reportados. La etiología de los linfomas puede ser desconocida, sin embargo, se presentan distintos factores que pueden condicionar la enfermedad, tal es el caso de las traslocaciones cromosómicas. Uno de los objetivos de este protocolo consistió en estandarizar la prueba de PCR para traslocaciones específicas: BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t t(12;21).

El análisis citogenético de tumores ha proporcionado valiosa información sobre la biología del Cáncer. Se ha establecido que más de la mitad de los tumores presentan alteraciones cromosómicas; por lo tanto, el análisis citogenético es de gran utilidad para el diagnóstico y el pronóstico en el paciente oncológico.

En este contexto de estudio; una serie de líneas celulares linfoides están disponibles para proporcionar el material para el análisis genético. Su detallada caracterización citogenética puede ser esperada para identificar nuevos sitios vulnerables de suma importancia para la linfopoyesis.

En México, cuando un niño es diagnosticado con linfoma la detección de rearrreglos genéticos no forma parte de la rutina diagnóstica. Sin embargo, la determinación de estas podría orientar al médico para el manejo que se ofrecerá, en cuanto a la terapia blanco establecida.

Aquí, se presenta el análisis de la línea celular de los pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin en el periodo comprendido de enero a junio 2016, en el Hospital General de Centro Médico Nacional La Raza, los cuales fueron sometidos a pruebas citogenéticas (específicamente reacción en cadena de polimerasa) con la finalidad de identificar las traslocaciones más frecuentes.

Los resultados obtenidos se recolectaron y fueron procesadas 10 muestras del servicio de Oncología pediátrica del Centro Médico Nacional “La Raza”. Se estandarizó la detección de las 3 traslocaciones propuestas en este estudio, y se encontró que el 30%(3/10) de los pacientes presentaron la traslocación TEL-AML1, ninguno para BCL-2 ni para Myc.

Este trabajo logro comprobar la importancia del estudio molecular, para confirmaciones diagnósticas. Por lo que deberá debe ser parte del estudio de extensión además de ser necesario correlacionar de forma individual con cada uno de los casos.

2. MARCO TEÓRICO

Las neoplasias infantiles, han adquirido a lo largo de las últimas décadas una importancia progresiva en el ámbito de la pediatría.⁶

Se estima que en el mundo existen 12 millones de personas diagnosticadas con cáncer, de los cuales el 3% son niños. Asimismo el cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial. Cada año, más de 160 000 menores de 20 años son diagnosticados con cáncer en países desarrollados en donde 3 de cada 4 niños sobreviven al menos 5 años después de iniciar su tratamiento, a diferencia de los países en vías de desarrollo en los cuales más de la mitad (60%) mueren.¹

México no es la excepción, y aproximadamente cada año 7 000 niños adquieren la enfermedad, dichos casos incidentes, sumados a los prevalentes, hacen que anualmente cerca de 18 000 niños y adolescentes requieran atención oncológica.¹

La tercera parte de los casos con cáncer detectados en Europa, Asia y América, corresponden a Leucemia Linfoblástica aguda, seguidos por los tumores del Sistema Nervioso Central y Linfomas.¹ En lo que respecta a nuestro país, de acuerdo con los casos inscritos en el registro epidemiológico en México, la segunda causa en importancia corresponde a los linfomas y neoplasias retículo-endoteliales, con 394 casos de los 2 303 registrados, es decir un peso relativo de 17.1%.²

EPIDEMIOLOGÍA EN MEXICO

En lo que se refiere a los linfomas y la frecuencia global, la situación es similar entre los niños mexicanos y norteamericanos (10.8 % *adversus* 10.5 %), la mayor frecuencia fue para el linfoma no Hodgkin con 62.7 %, situación muy similar a lo que se informa para los niños norteamericanos (64.8 %). En relación con la incidencia global de linfomas es un poco menor en los niños mexicanos (12.8 *versus* 16.1) y la mayor diferencia se encuentra principalmente en los menores de un año.² En lo que respecta a los linfomas Hodgkin, la incidencia entre niños mexicanos y estadounidenses es muy similar. Y en los linfomas no Hodgkin, la incidencia es similar a la de los niños estadounidenses.²

ETIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES ONCOLOGICAS INFANTOJUVENIL

El conocimiento del cáncer como una forma maligna de crecimiento descontrolada ha existido por más de un siglo. Numerosos agentes biológicos, químicos, y físicos han sido implicados como agentes causales del cáncer. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta proliferación desinhibida seguidos de la lesión inicial, aun son objeto de intensas investigaciones.³

El primer estudio documentado sobre el cáncer fue realizado hace más de un siglo en animales domésticos. Con el tiempo, la falta de conocimientos teóricos y tecnológicos deterioraban la formulación de conclusiones sobre el cáncer.³ Entonces se establece su origen multifactorial, que se desarrolla tras largos periodos de latencia. En todas las edades, el cáncer, similarmente a todos los procesos fisiológicos y patológicos que se originan en los seres vivos, son el resultado final de la interacción de dos clases de determinantes, el genético (endógeno) y el ambiental (exógeno). A su vez cada determinante está constituido por una gama de factores de riesgo, siendo la mayoría desconocida.⁵

Desde que se identificaron los primeros oncogenes mutados en el cáncer hasta nuestros días, ha habido un crecimiento exponencial en el conocimiento de los genes implicados en el desarrollo tumoral.⁶ En la actualidad numerosos estudios en humanos establecen una clara asociación de las alteraciones cromosómicas con los tumores sólidos y blandos de diferente origen histológico. Muchas de ellas se consideran marcadores específicos para un gran número de neoplasias. Lo anterior no sólo es importante para un mejor diagnóstico clínico, sino también para el pronóstico y el tratamiento de determinada entidad. Entre los diferentes mecanismos en la etiología del Cáncer, las alteraciones cromosómicas juegan un papel importante, puesto que la mayoría de los tumores exhiben un cariotipo anormal.^{3,4.}

El análisis citogenético de las células malignas de los niños con cáncer ha identificado numerosas alteraciones cromosómicas recurrentes, adquiridas o correlacionadas específicamente con los distintos subtipos de neoplasias hematológicas y tumores sólidos, cuyo estudio proporciona una valiosa información con aplicaciones clínicas muy significativas.^{6.}

FACTORES GENETICOS

La carcinogénesis, por lo tanto es iniciada por una lesión genética, resultado de un error que ocurrió durante las funciones de una célula normal, de un daño físico o químico irreparable. En otras ocasiones, la alteración genética es inherente, resultado del incremento en la susceptibilidad a cáncer en todos los miembros de una familia, quienes tienen ya un gen alterado. Dicho evento inicial provee de un incremento en las oportunidades de desarrollar una lesión genética adicional, la cual se presentará durante su vida, obteniendo como resultado una lesión maligna.⁴

Así, el cáncer, es una enfermedad genética, caracterizada por la acumulación de mutaciones en dos grandes grupos de genes que controlan el crecimiento celular: los oncogenes, los cuales en su versión mutada se encuentran en una forma activa que favorece el desarrollo del tumor, y los genes supresores de tumores, en los que su inactivación mediante una mutación favorece la aparición del tumor.³ La gran mayoría de las alteraciones genéticas o epigenéticas aparecen en células somáticas, y por lo tanto se encuentran en las células neoplásicas, pero en raras ocasiones, aparecen en las células germinales y las alteraciones están presentes en todas las células del organismo. Los progresos en la biología molecular durante la última década han permitido identificar la mayoría de genes implicados en estos cánceres, permitiendo realizar estudios en pacientes y familiares directos para ofrecer consejo genético y establecer medidas de prevención.⁵

BIOLOGIA MOLECULAR EN EL CANCER PEDIATRICO

Para que una célula normal de lugar a un clon tumoral son necesarios unos requisitos mínimos, siendo el primero de ellos que la primera o primeras alteraciones genéticas confieran a dicha célula una ventaja respecto a las no mutadas. Además es imprescindible que se acumulen diferentes mutaciones en distintos genes, lo cual sería bastante difícil a efectos de probabilidad si consideramos las tasas individuales de mutación de los genes, y que la acumulación de mutaciones llega a darse debido a que las células tumorales poseen una inestabilidad genética incrementada causada por alteración de los sistemas de reparación y de inestabilidad cromosómica. El nivel de inestabilidad genética de los tumores humanos puede dividirse en dos tipos: inestabilidad de microsatélites, que se debe a errores en las polimerasas, y la inestabilidad cromosómica que puede ser resultado de errores en el posicionamiento de los cromosomas. Parece lógico pensar que cualquiera de estos dos tipos de inestabilidad sea secundario a otro tipo primario manifestado por la presencia de diversas mutaciones puntuales esparcidas por todo el genoma.⁵

Las manifestaciones de la inestabilidad genética son diferentes, por tanto, a nivel cromosómico; como: aneuploidías, traslocaciones, deleciones, inserciones, amplificación, inestabilidad de microsatélites y alteraciones de la reparación.⁵

Estos genes participan en vías o mecanismos generales de carcinogénesis, estando uno o varios de los mismos implicados en la génesis tumoral de cada tipo celular concreto, según su modelo particular de alteración. Dichos mecanismos generales de carcinogénesis se detallan a continuación.⁵

ALTERACIONES GENÉTICAS EN TUMORES PEDIÁTRICOS: IMPLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO, EL PRONÓSTICO Y LA ELECCIÓN DEL TRATAMIENTO.

La identificación de determinadas alteraciones cromosómicas, y en concreto la identificación de translocaciones cromosómicas específicas del tumor, ha

resultado un gran avance en el diagnóstico diferencial de numerosas neoplasias infantiles. Estas translocaciones dan lugar, en la mayoría de los casos, aunque no siempre, a la aparición de proteínas quiméricas (o de fusión) que funcionan como oncogenes, fomentando el crecimiento descontrolado de las células.³

En las leucemias de la infancia, sobre todo en las linfoblásticas, se ha demostrado que determinadas anomalías cromosómicas tienen un claro significado pronóstico, y condicionan el tipo de tratamiento que el paciente recibirá en cada caso.³

La identificación de alteraciones cromosómicas en tumores sólidos ha resultado también ser fundamental para una correcta clasificación del tumor y, por tanto para la elección del protocolo terapéutico.³

TECNICAS PARA EL ANALISIS DE LOS TUMORES PEDIATRICOS

El amplio conocimiento actual del genoma humano ha elevado las expectativas de poder traducir todo este conjunto de conocimientos moleculares en la práctica clínica. Sin embargo, la aplicación de esta información a pacientes pediátricos con cáncer está limitada por el conocimiento de las características moleculares del tumor y por las armas diagnósticas disponibles en la actualidad.^{5, 14}

Recientemente los avances en la genética estructural y en la proteómica han sido utilizados para la obtención de un mejor entendimiento de los procesos neoplásicos, con la esperanza de determinar los mecanismos que determinan el desarrollo tumoral, proporcionándonos un horizonte clínico y biológico de cada una de las neoplasias, que nos permita desarrollar terapias blanco.⁴

Las técnicas diagnósticas, tanto las que están bien establecidas en los laboratorios como las nuevas tecnologías emergentes tienen numerosas ventajas que se discutirán a continuación, pero el diagnóstico actual de los tumores pediátricos es aún muy dependiente de la morfología de las células tumorales.^{5, 15}

A continuación describimos brevemente las principales opciones de estudio, sin embargo, nos detendremos en el entendimiento específicamente en la reacción en cadena de polimerasa, ya que es el método de estudio en la que basamos nuestra investigación, por lo que es la técnica que se describe a continuación.

- a. Análisis convencional del cariotipo
- b. Hibridación in situ (FISH, Fluorescence in situ Hybridization)
- c. Cariotipo espectral (SKY, spectral Karyotyping)
- d. Hibridación genómica comparativa
- e. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction)
- f. RT-PCR (retro-transcripción seguida de PCR)
- g. PCR cuantitativa
- h. Análisis del perfil de expresión mediante microarrays o chips de ADN

FUNDAMENTOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La tarea de encontrar una mutación en un gen del genoma humano equivale a hallar una falta ortográfica en una página de un libro de una biblioteca con 27000

ejemplares. Con esto en mente, la estrategia de búsqueda de una mutación puede realizarse de forma dirigida a un nucleótido específico, en un exón específico de un gen de interés, en caso de tratarse de una mutación conocida.¹¹

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde las primeras observaciones de Gregorio Mendel hasta la actualidad, se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del ADN (ácido desoxirribonucleico). Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del ADN; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento. Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y manipular mejor al ADN, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular.^{8, 14}

DEFINIENDO LA PCR

Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.⁸ Por lo tanto, se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.^{9,11}

En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc.⁹

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.^{8, 10}

ANÁLISIS MOLECULARES DE LOS LINFOMAS HODGKIN Y NO HODGKIN

La importancia histórica de la citogenética de linfoma se acentúa por el hecho de que una anomalía cromosómica "14q", fue identificada por primera vez y se asocia al linfoma de Hodgkin. Esto dio lugar a numerosas investigaciones en busca de anomalías cromosómicas específicas en diversos tumores malignos. Sin embargo, el éxito vino de estudios cromosómicos en neoplasias hematológicas, ya que fácilmente se prestaron a análisis citogenético. La caracterización de t(8; 14) y su asociación con el linfoma de Burkitt llevó a estudios genéticos que se centraron en diversos subtipos de linfomas. Desde entonces, la citogenética ha jugado un papel crucial en la prestación de una comprensión sustancial de los mecanismos genéticos de linfogénesis.¹²

La integración de datos genéticos y moleculares ha permitido validar muchas de las entidades propuestas, y al mismo tiempo matizar algunos aspectos, reconociendo también el valor práctico y potencial de marcadores moleculares para prever la conducta clínica y respuesta al tratamiento de las neoplasias hematológicas. De hecho, en la actualidad existe una gran aceptación de la necesidad absoluta de complementar los estudios morfológicos y fenotípicos con técnicas moleculares en el diagnóstico rutinario de los linfomas. El valor potencial de estos marcadores moleculares modificará a medio plazo nuestra forma de estudiar a los linfomas.⁷

LINFOMA DE HODGKIN

El linfoma de Hodgkin se subdivide en dos entidades: 1. Nodular de predominio linfocítico 2. Linfoma de Hodgkin clásico. Estas dos entidades tienen presentaciones morfológicas e inmunológicas diferentes.²¹

Los eventos que conducen al desarrollo de la enfermedad de Hodgkin son desconocidos. Sin embargo se han reportado en algunos protocolos de estudio genes supresores de tumor tales como p53 y RB involucrados. Estudios genéticos de hibridación comparativa han identificado un amplio número de anomalías cromosómicas recurrentes.^{21,23}

Existe evidencia convincente que sugiere las células de HRS patognomónicas son consecuencia de un clon maligno derivado de una célula B "reprogramada" en el centro germinal (GC) que deja de expresar genes de linaje B específico, tales como POU2F2, POU2AF1, y PU.1; y puede expresar marcadores genéticos característicos de otros linajes hematopoyéticos como IL21 (interleucina), CCL17, CSF1, ID2, CD3, y CD4.¹⁷

Alteraciones genéticas recurrentes en factores de transcripción han conducido al descubrimiento de que la activación constitutiva de la vía de señalización NF-κB es esencial para la supervivencia y la proliferación celular HR. En particular, las ganancias de REL y de supresiones o inactivación mutaciones de TNFAIP3 (proteína de TNF-α); genes implicados en la vía de señalización NF-κB, han sido detectado en aproximadamente 40% de HL clásico.^{17,23}

Ganar una mayor comprensión de la patogénesis de la HL y su linaje, así como la caracterización genómica completa de las células de Reed Sternberg, es necesario; sin embargo, la escasez de células HRS en las lesiones HL sigue siendo un factor limitante clave para entender los mecanismos moleculares consecuencias de este tipo de cáncer.¹⁷

Los cariotipos moleculares de las células HRS revelaron el predominio de las ganancias recurrentes sobre las pérdidas debido a la variación de la ploidía asociada con las células mononucleadas de Hodgkin y multinucleadas de Reed-Sternberg. Estudios previos han demostrado que las múltiples vías de señalización y factores de transcripción están desreguladas, incluyendo NF - κB , JAK y PI3K, AKT.¹⁷

LINFOMA DE HODGKIN NODULAR DE PREDOMINIO LINFOCITICO

Representa aproximadamente el 5% de todos los linfomas de Hodgkin. El linfoma de Hodgkin nodular de predominio linfocítico es una neoplasia de células B, caracterizada por la proliferación nodular o difusa linfocítica de células de Reed Sternberg, o ambas. Hay una superposición en la presentación morfológica del linfoma de Hodgkin nodular de predominio linfocítico y el linfoma de células B grandes. Las translocaciones que involucran al BCL6 con IG, IKAROS Y ABR se han detectado. Además se ha asociado un peor pronóstico con las deleciones del 13q.¹²

LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO

Representa el 95% de todos los linfomas de Hodgkin (HL). Se caracteriza por células multinucleadas de Reed-Sternberg en un fondo de células no neoplásicas. Se clasifica en 4 subtipos:

1. Esclerosis nodular
2. Celularidad mixta
3. Rico en linfocitos
4. Depleción linfocítica¹²

HL se ha demostrado que tienen una predisposición genética, aunque esto no se entiende completamente. Los hermanos de los pacientes HL tienen de dos a nueve veces mayor riesgo de desarrollar HL.¹³

Pese a que los inmunofenotipos de las células tumorales son los mismos, los cuatro subtipos de Linfoma de Hodgkin varían en sitios específicos, patrones de crecimiento y fondo celular. Los estudios citogenéticos convencionales y el FISH han mostrado aneuploidias e hiperploidias, sin embargo se han denotado aberraciones cromosómicas no recurrentes. Algunas veces la translocación t(14;18) se ha apreciado en casos con linfoma folicular. Las alteraciones genéticas que involucran a IGG se han visto involucrados en algunas células de Reed Stenrberg. Las regiones frecuentemente afectadas son 2p16 (REL), 3q27 (BCL6), 8q24 (MYC), 16p13 (C2TA), 17q12 y 19q13 (BCL3). Estudios CGH muestra ganancias del 4p16, 4q23-24 y 9p23-24.^{12, 16}

Debido a que las células neoplásicas son muy raras y dispersas en un trasfondo inflamatorio, los estudios citogenéticos con frecuencia producen cariotipos normales. Sin embargo, las investigaciones que utilizan técnicas citogenéticas de inmunofluorescencia y de inter-fase citogenética como herramienta para la investigación de neoplasias han demostrado que las células HRS se componen de cariotipos muy complejos con múltiples alteraciones cromosómicas.¹²

Algunos de los genes implicados con frecuencia en los puntos de interrupción reportados incluyen 1p36, 6q15, 6q21, 7q22, 7q32, 8q24, 11q23, 12q24, 13p11, 14p11, 14q32, 15p11 y 19p13.¹² (Ver tabla adjunta)

Lymphoma Subtype	Recurrent Chromosome Abnormalities ^a	Chromosome Abnormalities with Prognostic Relevance ^b
Hodgkin Lymphoma		
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin Lymphoma (NLPHL)	Similar rearrangements as in DLBCL t(3q27)(BCL6) rearrangements Polyploid (triploid to tetraploid)—complex karyotypes	Poor prognosis: del(13q)
Classical Hodgkin (cHL)	Gains: 4p16, 4q23–q24 and 9p23–p24 Monosomy/deletions/loss: 1p, 3p, 6q, 7q Rearrangements: 1p36, 6q15, 6q21, 7q22, 7q32, 8q24, 11q23, 12q24, 13p11, 14p11, 14q32, 15p11, 19p13 Translocation: t(14;18)(q32;q21) and other 14q32 (IGH) translocations with 2p16, 3q27, 8q24, 16p13, 17q12, 19q13 Polyploid (triploid to tetraploid)—complex karyotypes	ND

En un estudio realizado en la Universidad de Perugia, Italia, en donde se buscaba la inestabilidad genética y puntos de ruptura citogenética más frecuentemente encontrados en la enfermedad de Hodgkin, se analizaron 14 casos con alteraciones genéticas y se obtuvieron los siguientes resultados; 7 correspondieron a diploidía o hiperdiploidía y cinco a trí o tetraploidía. Las aberraciones numéricas más frecuentes fueron las ganancias, como son: Trisomías del cromosoma X, 8 y 10, cada uno con frecuencia de dos casos. Solo en un caso de celularidad mixta fue posible detectar monosomía del cromosoma 22, como única alteración. En lo concerniente a anomalías estructurales 12/14 fueron deleciones, 10/14 translocaciones, 6/14 iso-cromosomas y 2/14 otras

aberraciones. Todos los cromosomas excepto Y, 19 y 22 se encontraban involucrados. Los cambios estructurales más frecuentes fueron la delección del cromosoma 7q y 6q. Rupturas cromosómicas recurrentes fueron identificadas en 3 casos en las bandas 7q22, 15p10-11, mientras que las bandas 1p36, 4q33, 6q15, 6q21, 7q31, 7q32, 11q13, 12q24, 13p11, 14p10-11, 17p11 y 20q13 fueron involucrados en dos ocasiones cada uno. Este concluye que los cambios estructurales consistentes en el linfoma de Hodgkin aun no han sido identificados; sin embargo resulta interesante denotar, que las banas cromosómicas mas frecuentemente involucradas se asocian con cambios en el locus de la IgH del cromosoma 14q32, y en la banda 8q24, los cuales denotan la naturaleza linfoide de estirpe B. La banda 11q23 contiene un número de genes candidatos a ser relevantes en la génesis de linfoma de Hodgkin como es el gen BOB-1., el ATM que es el gen de la ataxia telangiectasia (un desorden genético frecuentemente asociado al desarrollo de los linfomas).¹⁸

Los diferentes estudios de investigación han sido realizados con la finalidad de determinar el origen genético de esta entidad. Incluso se han buscado alteraciones genéticas específicas como la inactivación del gen supresor de tumores RASSF1 estableciendo a estos como uno de los mecanismos por los cuales las células de Reed Sternberg evaden los mecanismos apoptóticos, seguidos de re-arreglos en los genes de las inmunoglobulinas, tal es el caso de un estudio publicado en la revista Clinical Lymphoma en diciembre 2004, en el cual, ya entonces fueron evaluados los reordenamientos genéticos de la cadena pesada de inmunoglobulina en los pacientes pediátricos con linfoma de Hodgkin clásico tanto CD20 positivos como CD20 negativos, en donde se concluyó que el estudio de regiones específicas en la cadena pesada de la inmunoglobulina V(D) J podría ser utilizado en el seguimiento de los pacientes para determinar enfermedad mínima residual, dando importancia a futuros estudios de investigación genética de importancia clínica.^{19,20}

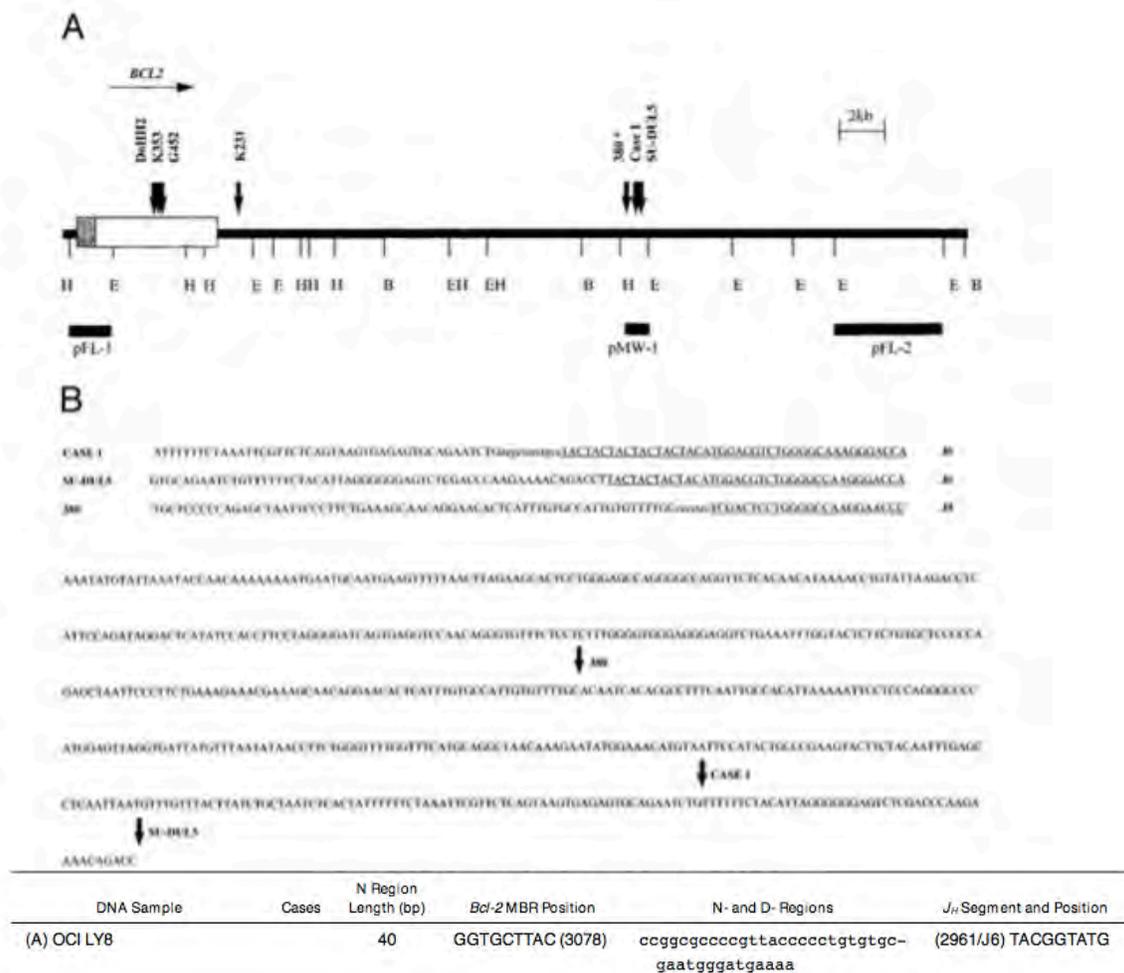
ASOCIACION BCL-2 t(14;18)(q32;q31) Y LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO

Como ha sido mencionado previamente; a pesar de la presencia de múltiples alteraciones genéticas, el análisis citogenético de la enfermedad de Hodgkin ha generado resultados contradictorios, ya que parece caracterizarse por aneuploidía y reordenamientos estructurales complejos asociados a múltiples puntos de ruptura. A diferencia de otros principales neoplasias hematopoyéticas cuya etiología se encuentra reservado a un solo oncogen, la fusión de genes en el linfoma de Hodgkin se a atribuido a una constelación de fusiones genéticas, lo que conlleva a una serie de problemas técnicos en los que se incluye la escasas de células de Reed Sternberg así como la complejidad en su cariotipo. Sin embargo, teniendo en cuenta las translocaciones detectadas en los diferentes estudios, parece cada vez más probable que estas desempeñen un papel importante el su patogénesis.^{42,43,44,45}

En lo que respecta a la detección de las translocaciones detectadas por PCR,

algunos investigadores han encontrado re-arreglos en el gen *bcl-2*/*J_H* en donde la *t*(14;18)(q32;q21) ha sido detectada entre el 10 al 40% de los casos. Incluso existen algunos reportes de estudios en los cuales la expresión del *bcl-2* se encuentra en las células de Reed Sternberg en un 20 al 60% de los casos de Linfoma de Hodgkin. La proteína *bcl-2* se ha establecido con un importante rol en la protección células a la apoptosis. 43 Pese a los datos encontrados en abril 2016, fue realizado un estudio en el cual se amplificó la *t*(14;18) usando el siguiente primer (5'-TTT GAC CTT TAG AGA GTT GCT TTA CG-3'), el cual fue usado en conjunto con *J_H*-primer (5--ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3') dirigido a la región *J_H*. En donde no se encontró asociación entre el linfoma de Hodgkin y dicha translocación. 44 Sin embargo aun deberán realizarse mayor numero de estudios para descartar su asociación. 46

Como se muestra en la figura se muestra la secuencia de BCL con rearrreglos detectados por PCR:



Basado en un estudio realizado con el título asociación de la *t*(14;18) con linfoma de Hodgkin en pacientes Iraquis realizado por PCR fueron analizados los primers realizados, encontrándose mayor asociación con los siguientes: 46

Primer name	Sequence (5'-3')	tube
MBR1(Forward)	CCATAGATTTGAATCTGCTGGTC	t(14;18) tube A (MBR)
MBR2(Forward)	ATATAATGCAATAATGCCACAGAGT	
JH (Reverse)	GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG	
3' MBR1 (Forward)	CAGTGTTGTATCCAGCAGGTGC	t (14;18) tube B (3' MBR)
3' MBR2 (Forward)	GCCACCACACCCTGCTAGTTT	
3' MBR3 (Forward)	AAGATTTGCTCCCCAGTCATTAC	
3' MBR4 (Forward)	TCTCTAAACCACGCCAACCAGT	
JH (Reverse)	GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG	
5mcr (Forward)	TGCTTTCGTTTCTTTCAGAAGG	t(14;18) tube C (mcr)
mcr1 (Forward)	TATTATTGGGCGCTTGCTCA	
mcr2 (Forward)	TTGGATTTGAGATGGCATTCA	
JH (Reverse)	GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG	

De los cuales los mas frecuentemente encontrados fue el primer mbr1. Por lo que se utilizó en este protocolo para la búsqueda de la t(14;18).⁴⁶

LINFOMA NO HODGKIN

El linfoma No Hodgkin comprende un grupo heterogéneo de enfermedades relacionadas entre si. Cada variedad biológica de linfomas no Hodgkin se caracterizan por la transformación maligna de las células linfoides, con morfología, inmunofenotipo, genética y clínica diferente.²³ El linfoma no Hodgkin infantil es diferente del adulto NHL con respecto a los tipos de la enfermedad, la biología, el tratamiento y la evolución.²⁷ Los niños pueden presentarlo ya sea de linaje B o de linaje T. Los subtipos más frecuentes (90%) de los casos incluyen el linfoma de Burkitt , linfoma difuso de células B grandes, el linfoma linfoblástico T y el linfoma anaplásico de células grandes (LACG).²⁵ Contrario con los adultos es usualmente diseminado, difuso, de alto grado, con un patrón de crecimiento rápido, con origen en células maduras o inmaduras de estirpe B o T, con enfermedad extra-nodal frecuente, incluso con involucro en medula ósea y SNC.²⁴

En niños la incidencia es rara, tiene predominio extra-nodal, el 50-70% presentan inmunofenotipo B, es agresivo y se cura en el 70 al 90% de los casos.²²

Alrededor del 90% de los linfomas no Hodgkin en los niños se han categorizado dentro de tres categorías acorde con la clasificación de WHO:

1. Células B maduras (Linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B grandes)
2. Precursores linfoides (Leucemia Linfoblástica de células B, linfoma y leucemia Linfoblástica T)
3. Células T maduras (Linfoma anaplásico de células grandes)

Existen otros tipos muy raros pero corresponden a menos del 10% de los casos.
24, 29, 25

La integración de datos genéticos y moleculares ha permitido validar muchas de las entidades propuestas, y al mismo tiempo matizar algunos aspectos, reconociendo también el valor práctico y potencial de marcadores moleculares para prever la conducta clínica y respuesta al tratamiento de las neoplasias hematológicas. De hecho, en la actualidad existe una general aceptación de la necesidad absoluta de complementar los estudios morfológicos y fenotípicos con técnicas moleculares en el diagnóstico rutinario de los linfomas. El valor potencial de estos marcadores moleculares modificará a medio plazo nuestra forma de estudiar y tratar los linfomas. Eventualmente, las clasificaciones establecidas serán actualizadas recogiendo las aportaciones y los acuerdos de la comunidad científica y los progresos que se generen en el futuro en diagnóstico y tratamiento de linfomas.³⁰

LINFOMAS B MADUROS

Corresponden al subtipo más común, y contribuye con el 50% de los casos. La mayoría de ellos son clasificados como linfoma de Burkitt. Otros subtipos son menos frecuentes como linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de células B no clasificable con características intermedias entre el linfoma de células B y el linfoma de Burkitt.²⁴

El desarrollo de las células B se lleva a cabo en distintas etapas a través de las señales transmitidas y modificaciones estructurales del receptor de células B cuando es dirigido por una respuesta inmune. Las primeras etapas del desarrollo de células B se producen en la médula ósea incluyendo la recombinación de los genes de inmunoglobulina a través de la recombinación de genes de activación del complejo de la endonucleasa. Las células B expresan un receptor de células B funcionales que a diferencia de las células B vírgenes maduras dejan la médula ósea para experimentar la expansión clonal en los centros germinales. Los genes de la Ig dependen tanto de la hipermutación somática como de las recombinaciones de cambio, dando como resultado células B activadas por antígenos.³⁶

Las translocaciones recurrentes que yuxtaponen oncogenes y genes de Ig son características de los subtipos de linfomas de células B y por lo tanto se suman a su definición y ayudan a su diagnóstico.³² En un estudio publicado en marzo del 2011, en donde se analizó un total de 720 linfomas, en los cuales se realizaron estudios citogenéticos de las rupturas del IRF4 por FISH se concluye que las translocaciones G/IRF4 activan el IRF4 factor de transcripción en un subtipo de linfomas de células B maduras.³³

LINFOMA DE BURKITT

El linfoma de Burkitt es un tumor con origen de células B que representa de un 30 a 50% de los linfomas no Hodgkin en los pacientes pediátricos. Con una incidencia

en Europa de 1 a 3 por millón. Con un diferencia clara en el sexo, siendo casi el doble en los hombres.³³ En México se presenta con una frecuencia de 32%.^{1,2}

Los linfomas de células pequeñas no hendidas tipo Burkitt se dividen en la variedad endémica y esporádica. La primera se manifiesta principalmente por masa mandibular en la mitad de los casos y también en abdomen, órbita y región para-espinal. La variedad esporádica se presenta en abdomen con mayor frecuencia y después cabeza y cuello. El involucro de ileón distal, apéndice y ciego hace que una de sus presentaciones clínicas sea el abdomen agudo. Esta variedad histológica tiene una alta tasa de curación debido a la biología celular del tumor que lo hace muy quimiosensible.^{31,24}

El linfoma de Burkitt es caracterizado por la expresión de inmunoglobulinas de superficie y otros antígenos de linaje B, como son CD19, CD20, CD22, CD79a, con una frecuente presentación del CD10.²⁴ La frecuencia y el rol patogénico de las translocaciones involucradas en el linfoma de Burkitt es incompleto hasta el momento,³⁵ pese a que el análisis citogenético ha revelado una de tres translocaciones que involucran al proto-oncogen c-myc. La detección de una de estas translocaciones es el gold estándar del diagnóstico.^{24,33} El atributo unificador a nivel molecular consiste en la yuxtaposición del oncogén c-MYC junto a uno de los loci de la IG por la t(8;14)(p24;q32), dando como resultado la activación del oncogén MYC por el promotor del gen de la inmunoglobulina.^{28,35} La cercanía al 100% entre la translocación 8q24 /myc y el linfoma de Burkitt, indica fuertemente que es necesaria para su desarrollo.³³

Además de la activación del C-MYC estudios recientes han identificado el inhibidor de DNA3 como uno de los genes más frecuentemente alterados. Se cree que las mutaciones en ID3 disminuyen el control inhibitor sobre el factor de transcripción 3 que resulta en un aumento de la proliferación celular. Notablemente, TCF3 también se ha encontrado mutado en el linfoma de Burkitt. Lo cual parece ser una característica única este linfoma.²⁸ Así, la translocación clásica t(8;14) (q24;q32), puede ser detectada en alrededor del 85% de los casos. Esta translocación causa fusión del c-myc, el cual codifica un factor de transcripción significativo en la regulación del ciclo celular. En alrededor del 15% de los casos, c-myc es fusionada con la inmunoglobulina Kappa (locus de genes de inmunoglobulina de bajo peso molecular) t(2;8) (p11;q24), o la cadena ligera lamda t(8;22)(q24;q11).^{24,27}

Hasta el momento fue posible demostrar que la translocación 8q24 se presenta de forma frecuente asociado al linfoma de Burkitt, sin embargo, hay varias líneas de evidencia que sugieren que no es suficiente, esto es debido a que; en primer lugar, este tipo de translocaciones pueden ocurrir también en otras neoplasias malignas de células B, por ejemplo, mieloma múltiple y en los linfomas de células grandes. En segundo lugar, la t(8;14) de células positivas han sido identificados en muestras de sangre periférica de los individuos sin ningún signo de linfoma y en un ganglios linfáticos histopatológicamente benignos con antecedente de infección por virus del Epstein Barr. En tercer lugar, aunque los ratones que sobre-expresan el gen Myc desarrollan linfomas, el período de latencia es variable, concluyéndose un estado pre-neoplásico y la clonalidad de este tumor indica que existen otras

alteraciones, tales como mutaciones en el gen TP53, los cuales son necesarios para que se manifieste el linfoma de Burkitt. Por último, otras aberraciones citogenéticas secundarias han sido detectadas y están presentes en el 60 a 80% de los casos, de los cuales, los más comunes son las ganancias de 1q, pérdidas de 6q y reordenamientos de 13q.³³

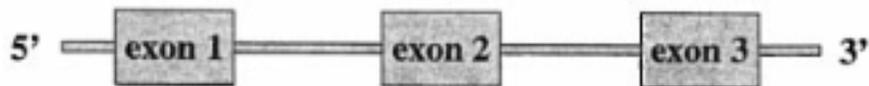
TRASLOCACION t(8;14)(q24;q32)

El linfoma de burkitt es el linfoma No Hodgkin más frecuente en la niñez, es caracterizado por traslocaciones genéticas específicas que involucran al gen MYC del cromosoma 8 y a la inmunoglobulina de alto o bajo peso molecular situadas en los cromosomas 14, 22 o 2. La traslocación más común que abarca aproximadamente el 75% del total en la t(8;14)(q24;q32), en el cual el gen MYC se yuxtapone con el gen de la inmunoglobulina de alto peso molecular situada en cromosoma 14.⁴⁷

Debido a que la t(8;14)(q24;q32) representa una única característica del linfoma de Burkitt por lo que puede ser utilizado como marcador para el diagnóstico definitivo.⁴⁷

Basados en la estructura genética que involucra dicha translocación en protocolos de estudio se han diseñado números limitados de primers diseñados para sitios de ruptura específica del exón 2 del gen MYC así como para la región constante de la IgH involucrada.⁴⁷

Chromosome 8q24: MYC gene



Debido al hecho de que los resultados de la detección de t(8;14) representa un marcador específico de este tumor, este podía ser utilizado para monitorizar micrometastasis al diagnóstico o durante el tratamiento de los pacientes con linfoma de Burkitt. En nuestro estudio se realizó búsqueda de esta traslocación en específico, utilizando la siguientes primers:⁴⁷

Table 1. Sequence of the Primers Used for LD-PCR

Primer	Sequence 5'-3'
MYC/04	ACAGTCCTGGATGATGATGTTTTGATGAAGGTCT

LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES

El linfoma difuso de células B (DLBC), constituye un grupo heterogéneo de tumores con diferencias clínicas, inmunofenotípicas y genéticas, con pronóstico muy variable. La identificación de subgrupos distintivos dentro de la categoría de

los DLBC puede ayudar con el pronóstico y la estrategia terapéutica.^{34,37}

Este contribuye con alrededor del 10% de todos los niños con linfoma no Hodgkin. DLBCL constituye un grupo heterogéneo de linfomas y se presenta más frecuentemente como una enfermedad localizada y es raro que involucre SNC y medula ósea.²⁴ La característica morfológica es variable con infiltración difusa nodal o extranodal. Más frecuentemente muestran ser CD20 positivo. En los CD20 negativos, otros marcadores pueden ser detectados como CD79a, CD19, Pax5 o inmunoglobulina. La mayoría de los DLBCL expresan CD10 y BCL6. BCL2 puede ser detectado en alrededor del 40% de los pacientes. Rupturas in BCL2 o la translocación t(14;18)(q32;q21) prácticamente nunca se ve en los niños, así como rupturas del BCL6. Como sea ambos BCL2 y BCL6 frecuentemente pueden denotarse por inmunohistoquímica. Otras anomalías genéticas también son muy raras y se encuentran en casos limitados.^{24,27}

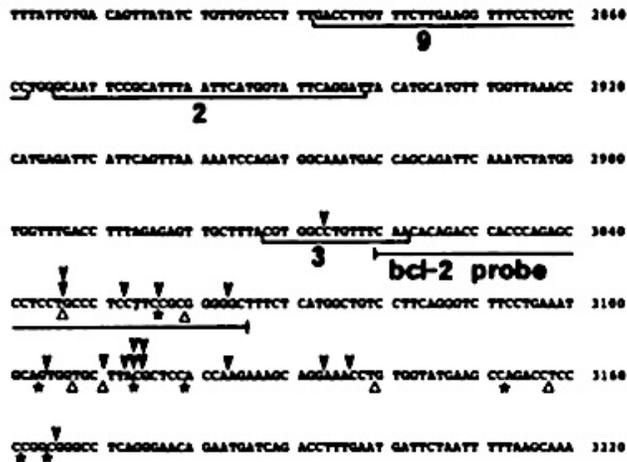
Alrededor de un tercio de los LNH-B pediátricos, morfológicamente catalogados como DLBCL, podrían reclasificarse con un perfil genético y molecular.²⁴ Alrededor de la mitad de la mitad de los linfomas intermedios entre DLBCL/LB presentan la translocación 8q24/MYC, frecuentemente con características atípicas como son: Re-arreglos no asociados a genes de inmunoglobulinas, la participación de un cariotipo complejo, re-arreglos paralelos de los genes BCL2 y BCL6. Estos encuentros sugieren un doble o triple golpe, en el cual se asocia a una segunda translocación t(8;14), t(8;22) o t(2;8).^{24,26}

La t(14;18)(q32;q21) ha sido identificada en el 18 a 20% de los pacientes con DLBCL de novo. En raras ocasiones se transloca BCL2 con el loci de la cadena ligera de Ig (IgK, IgL), como parte de la t(2;18)(p11;q21.3) o t(18;22)(q21.3;q11) resultando en una sobreexpresión del BCL2.^{34,32}

La importancia pronóstica de la expresión del BCL- 2 es objeto de controversia , y la comparación entre los diferentes estudios realizados, se ve obstaculizada por la elección de diferentes puntos de corte de células positivas, además de la variabilidad de los protocolos. En un estudio realizado con la finalidad de relacionar la concomitancia de la t(14;18) o variantes de los re-arreglos en el gen MYC referidos como doble golpe en los linfomas, con un pronóstico adverso. Obteniendo como resultado que las translocaciones aislados del BCL2, en ausencia de roturas cromosómicas del MYC , se asocia con un mal resultado posterior al tratamiento. La presencia concomitante de re-arreglos del gen MYC (doble golpe) denotaba tener una evolución más tórpida que aquellos pacientes que no la presentaban.³⁴

TRANSLOCACION (14;18) Y LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES La t(14;18)(q21;q34) BCL2 es una alteración genética común en el linfoma folicular y en el linfoma difuso de células B grandes. Estos asociados a la sobreexpresión de mecanismos indefinidos hasta el momento, que regulan la expresión de la inmunoglobulina de alto peso molecular. Esta translocación es detectada en el 85 al 90% de los linfomas foliculares y en el 12-30% de los linfomas difusos de

células B grandes. Los sitios en donde esta aberración genética se presenta están bajo el control de mecanismos antiapoptóticos derivados del oncogen BCL2. Además le la actividad como promotor tumoral en las células B, esta translocación podría ser el resultado de una sobreexpresión del BCL2, con un fenotipo relacionado con la resistencia de los tumores a la apoptosis. De cualquier manera, la proteína BCL2 solo se incrementa en aproximadamente 50% de los casos asociados a la t(14;18)(q21;q34). Lo cual nos lleva a la conclusión de la existencia de otros factores que controlan la expresión del BCL2. ⁴⁸



Esta translocación se ha documentado en el linfoma de Hodgkin así como en el linfoma de células B grandes, por lo que se buscó la translocación con los primers utilizándose en el LH. ⁴⁸

LINFOMA LINFOBLÁSTICO

El Linfoma Linfoblástico consiste en células linfoides inmaduras. Las cuales contribuyen con aproximadamente el 30% de todos los niños con LNH haciéndolo el segundo subtipo más frecuente. La morfología de estas células pueden no distinguirse de los linfoblastos de la Leucemia Linfoblástica Aguda. ²⁴

El Linfoma Linfoblástico generalmente se presenta como enfermedad supradiaphragmática con y sin invasión extra-torácica ya que la presentación clínica es con masa mediastinal ocasiona en algunos casos síndrome de vena cava superior. La presentación abdominal aislada no es frecuente. La supervivencia en esta variedad histológica depende en gran parte de la obtención de la remisión. Debido al comportamiento biológico del tumor el tratamiento que se administra es el de Leucemias Linfoblásticas. ³¹

El 90% de los pacientes pediátricos con LBL son de estirpe T. Las anomalías cromosómicas en los niños con LBL-T no están definidas, como sea las aberraciones comúnmente vistas en la Leucemia Linfoblástica de células T también son útiles en la LBL-T. Muchos marcadores oncogénicos han sido descritos en pacientes con LLA-T/T-LBL, como estos solo se encuentran presentes en un pequeño número de pacientes, sin un valor pronóstico claro. La

pérdida de la heterocigocidad en el cromosoma 6q16, mutaciones en el notch1 como es el F-box y WD40 (FBXW/) muestran tener un gran potencial pronóstico. La pérdida de la heterocigocidad 6q ha sido reportada como un marcador de pobre pronóstico, incrementando el riesgo de recaída. Otro marcador pronóstico NOTCH1 es un gen que codifica un receptor necesario en la regulación del desarrollo de las células T. Esta mutación se ha reportado en más de la mitad de los pacientes con LLA-T. Una proteína alterna FBXW7 juega un papel crítico en la degradación del NOTCH1, lo cual está también implicado como factor pronóstico.²⁴

Además de los reordenamientos monoclonales del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), se pueden encontrar también reordenamientos en los genes del receptor de células T (TCR). Algunas translocaciones se asocian a cursos clínicos diferentes, y se recomienda incluir esta información en el informe del paciente; así:

- Translocaciones que afectan el gen *MLL* en 11q23 conllevan un mal pronóstico.
- Las hiperdiploidías y translocación t(12; 21) (*TEL/AML1*) se asocian a un pronóstico favorable.
- Translocación t(9; 22) (*BCR/ABL*) se asocia a pronóstico desfavorable.
- Translocación t(1; 19) (*E2A-PBx*), asociada a pronóstico desfavorable.³⁰

TRASLOCACION TEL(ETV6)-AML(RUNX1)

La translocación recíproca t(12;21)(p13;q22), es el reordenamiento cromosómico más común en el linfoma linfoblástico y leucemia linfoblástica aguda con una incidencia del 25%. La expresión del gen de fusión TEL-AML 1 o ETV6-RUNX1, conduce a la expansión de los precursores de células B con una gran capacidad de autorenovación y una diferenciación a estadios de células B madura alterada.⁴⁹

A diferencia de otras translocaciones, el gen de fusión TEL/AML1 se asocia con un pronóstico favorable de la enfermedad, con una tasa de recaídas significativamente menor. La evaluación de este como marcador ayuda en la selección de terapias de baja toxicidad frente a otros tratamientos.⁴⁹

LINFOMA DE CELULAS GRANDES ANAPLÁSICO

El linfoma de células largas anaplásico es uno de los más comunes LNH, encontrándose con una frecuencia de 10 a 5 % en este grupo, con una incidencia anual de 1 por millón en niños.³⁸

Contribuye al 5% de todos los tumores no Hodgkin. El LACG representa una entidad distinta de LNH, originalmente descrito por Stain et al en 1985. Estos linfomas representan 10 a 15% de todos los LNH de los niños y alrededor del 40% de los LNH de células grandes. Muestran un curso clínico agresivo, con frecuencia se acompañan de síntomas B y de invasión a sitios no ganglionares como piel, pulmón, hueso y tejidos blandos.³¹

El linfoma anaplásico de células grandes, fue descrito por primera vez en 1985 por

Stein et al, como un linfoma no Hodgkin de células grandes caracterizado por un patrón de crecimiento lineal y bizarro.⁴⁰ Este linfoma es caracterizado por la proliferación de células tumorales, usualmente de morfología anaplásica, con expresión CD30. Debido a las translocaciones identificadas en el gen ALK se obtuvo el término de anaplásico.³⁹

Este subtipo usualmente se manifiesta de forma agresiva, con involucro extranodal, el cual puede estar presente o ausente. La manifestación característica incluye linfadenopatía, con un posible involucro de piel o tejido subcutáneo, con fiebre o síntomas constitucionales. Uno de los marcadores que se presenta con mayor frecuencia se asocia a la t(2;5)(p23;q35). Esta translocación produce la fusión del gen de la nucleofosmina como el cromosoma 5q35 y el gen de la cinasa del linfoma anaplásico en la posición 2p23.²⁴

A pesar de ser heterogéneos, estos linfomas tienen varias características comunes: células grandes con núcleos excéntricos en forma de herradura, expresión del antígeno CD30 y en el 85% de los casos, la presencia de la translocación t(2;5)(p23;q35) que lleva a la expresión de la proteína de fusión nucleofosmina-cinasa del linfoma anaplásico (NPM/ALK),³¹ La cual tiene actividad tirosin-kinasa quien ha demostrado tener propiedades oncogénicas en una variedad de estudios.⁴⁰ Dicha translocación, descrita en 1994 por Morris et al, la cual desde entonces parecía darnos una idea del origen de estos tumores.^{31, 39, 41} El otro 15% de las translocaciones en el gen ALK, es molecularmente heterogéneo, ya que las fusiones en el gen ALK tiene diferentes patrones. Sin embargo sin importar el mecanismo, la pérdida de la heterogeneidad de uno de los alelos del gen NPM1 contribuye a la génesis tumoral en el linfoma anaplásico.³⁹ Así subsecuentemente se han identificado otros 6 diferentes genes, como la tropomiosina no muscular (TPM3, con localización 1q25), la fusión del gen TRK (TFG, 3q21), 5aminoimidazole-4 carboxamide ribonucleotido formyltransferasa/IMP ciclohidrolasa, cadena similar al claritin-polipeptido, tropomiosina 4 (TPM4, 19p12) y la moesina (MSN, Xq11-12).^{40, 41}

El gen de fusión NPM/ALK codifica para una proteína quimérica de 80-kD que consiste en la porción terminal de la molécula de nucleofosmina (aminoácidos 1 a 117) unidos al dominio citoplásmico completo del receptor neuro-específico de tirosin-cinasa ALK. Se piensa que esta proteína de fusión juega un papel clave en la linfoma-génesis por la fosforilación aberrante de substratos intracelulares. Se dispone de anticuerpos poli-clonales y monoclonales dirigidos a la detección de esta proteína de fusión y su expresión se ha demostrado en aproximadamente 60% de los casos de LACG.³¹ En un estudio publicado en el 2007, se buscaron las translocaciones y mutaciones que implican al gen de la nucleofosmina en la generación de los linfomas. Teniendo conocimiento de que la nucleofosmina es una fosfoproteína nuclear en quien se han realizado estudios que revela un complejo escenario en lo que respecta a las funciones e interacciones de este, como punto de proliferación o supresor de crecimiento molecular. El gen NPM1 codificada por la nucleofosmina es traslocado o mutado en varios tipos de linfoma, originando la fusión de proteínas (NPM-ALK, NPM-RAR α , NPM-MLF1) o

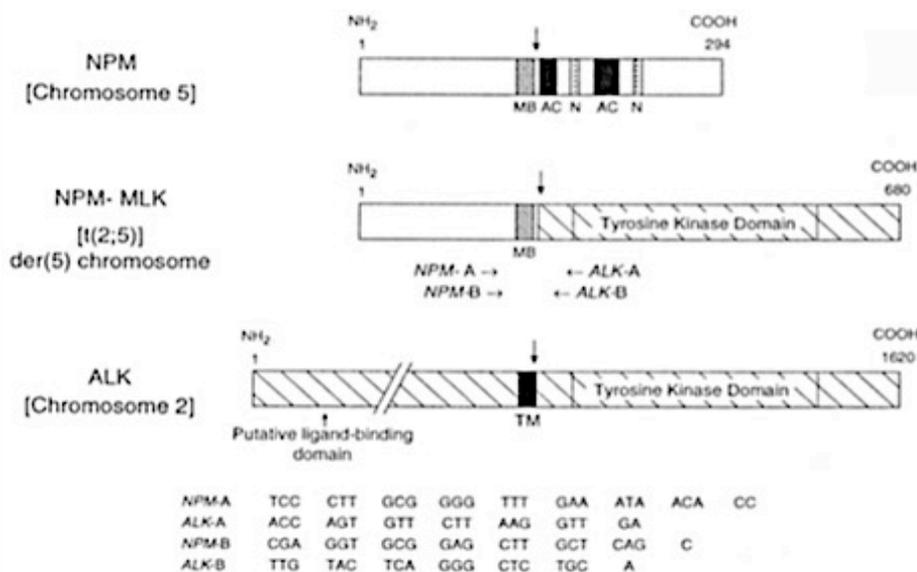
productos mutantes del NPM y su importancia radica en que representa una posibilidad de estudio para desarrollar una terapia blanco.³⁹

LINFOMA ANAPLASICO Y t(2;5)(p23;q35)

El linfoma de células grandes anaplásico fue el primer tipo de linfoma descrito por Stein y desde entonces ha sido aceptada como entidad clinopatologica siendo revisada por la Real academia europea americana. Histopatologicamente comprende células anaplasicas con núcleo prominente y abundante basofilia. Es asociado con una translocación recurrente, la t(2;5)(p23;q23). Esta translocación involucra el ALK (Kinasa linfoma anaplásico) del gen 2p23 y el gen de la nucleofosmina. El gen del ALK codifica un receptor de tirosincinasa, a través de la superfamilia del factor de crecimiento de la insulina.⁵⁰

El gen del NPM codifica una fosfoproteína nuclear que involucra ribonucleoproteinas citoplasmáticas. Esta postulado que el gen NPM promueve la expresión catalítica ALK presente en la proteína NPM-ALK, y ha sido recientemente demostrado que la actividad del ALK contribuye a la transformación maligna de las células linfoides.^{50, 51}

En un estudio citógenético en el que se reportó la frecuencia de la t(2;5)(p23;q35) translocación en los pacientes con linfoma no Hodgkin por PCR. En la que se realizaron los siguientes primers 5-oligonucleotide 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3', y la 3-primeoligonucleotide con 5'WTTTGATGTAGCCTC- ACTTC-3".^{50, 51}



PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque los avances en el laboratorio nos están permitiendo configurar un mapa cada vez más detallado de las alteraciones genéticas más frecuentes en los tumores pediátricos, y las relaciones de éstas con el pronóstico de la enfermedad, todavía hoy no disponemos de la suficiente información que nos permita estratificar con mayor eficacia a los pacientes y predecir con más fiabilidad la respuesta al tratamiento. Sin duda, el mayor conocimiento del genoma humano, y la disponibilidad de técnicas de alto rendimiento para el estudio de alteraciones genéticas y perfiles de expresión, como los *microarrays* o chips de ADN, contribuirán significativamente a un mayor conocimiento de la genética y la patología molecular de los tumores infantiles.^{3,14}

En un futuro no muy lejano, seremos además capaces de determinar, no sólo qué tumores responderán mejor a un tratamiento, sino también, y no menos importante, predecir qué tratamientos resultarán más o menos tóxicos para el paciente (farmacogenética). La identificación de los polimorfismos genéticos asociados con estos aspectos permitirá una aplicación más racional de los protocolos terapéuticos, lo que redundará en un mayor beneficio para el paciente, tanto en términos de mortalidad como de morbilidad.³

JUSTIFICACIÓN

En México los Linfomas ocupan el segundo lugar en frecuencia de cáncer en la población pediátrica. La genética molecular aplicada al cáncer infantil, en la última década ha demostrado su utilidad no solo para establecer un pronóstico de sobrevida en nuestro paciente, sino para iniciar protocolos de investigación que ofrezcan terapia blanco, con lo cual ofreceríamos mayores tasas de curación además de disminuir en gran medida las toxicidades aunadas a quimioterapia no dirigida.

En lo que respecta al Linfoma No Hodgkin se han identificado translocaciones específicas, que si bien se encuentran demostradas en la literatura internacional, no han sido buscadas en los niños mexicanos. Sin embargo en el Linfoma de Hodgkin, hasta el momento no ha sido identificada la expresión constante de alteraciones genéticas, por lo que estudios de investigación citogenéticos sobre este tumor son de gran importancia.

En este protocolo de investigación se realizarón pruebas con PCR, lo cual nos proporcionaron información de los distintos genes implicados en el desarrollo de los linfomas que se presentan en la población mexicana pediátrica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se propusó la estandarización de la detección de las traslocaciones: BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t t(12;21), utilizando PCR. Al ser la PCR una prueba de alta sensibilidad para la detección de las fusiones génicas,

consideramos importante implementar esta tecnología para la detección específica de las fusiones génicas más frecuentes en la población pediátrica.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Las traslocaciones BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t(12;21) se encuentran en los pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico de linfomas?

HIPOTESIS GENERAL

Se esperó encontrar las traslocaciones BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t(12;21), reportadas en la literatura para otros grupos poblacionales aunque, posiblemente, con frecuencias distintas debido a las diferencias étnicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Estandarización de la técnica de PCR para identificar las traslocaciones BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t(12;21).
2. Conocer la frecuencia de las alteraciones moleculares: BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML t(12;21), en los pacientes pediátricos con Linfoma.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Realizar gradientes de temperatura de alineamiento para identificar productos específicos para el Linfoma.
2. Análisis de resultados obtenidos para conocer las frecuencias de las alteraciones moleculares.
3. Iniciar protocolos de investigación prospectivos basados en la citogenética con la finalidad de identificar puntos clave en la alteración de la linfopoyesis, para en futuros estudios buscar alternativas de tratamiento teniendo como blanco dichas alteraciones.

CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO

Se consideraron todas las recomendaciones y lineamientos establecidos para un laboratorio nivel bioseguridad 2 de acuerdo al "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio", publicado por la Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2005.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y REGULATORIAS

Regulaciones nacionales e internacionales

Este estudio se condujo en acuerdo con la Declaración de Helsinki (1964), incluyendo todas las enmiendas hasta la revisión de Seúl, Corea (2008).

Para el desarrollo de este estudio resguardó la integridad de los pacientes y se aseguró la calidad de la información registrada ya que se apega a las Buenas Prácticas Clínicas (ICH, Guideline for Good Clinical Practice E6), las cuales son un

estándar internacional de calidad científica y ética para el diseño, conducción, registro y reporte de ensayos que involucraron la participación de sujetos humanos. La adherencia con estos estándares proveen el aseguramiento público de que los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos de los ensayos están protegidos, consistentes con los principios que tienen sus orígenes en la Declaración de Helsinki, y que los datos de los ensayos clínicos son confiables.

En México, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, describe los aspectos éticos y científicos que deben seguir las instituciones que realizan actividades de investigación en seres humanos. De acuerdo al Título segundo, Capítulo I, Artículo 17, fracción III, este tipo de investigación se considera de riesgo mínimo.

El bienestar del sujeto no se verá en riesgo ya que se requirió una muestra sanguínea de sangre periférica por punción, muestra que se obtiene cuando se realiza el algoritmo de diagnóstico por laboratorio propio de cada departamento de oncología y previo al consentimiento informado. Esta muestra es equivalente a 1ml, que es la cantidad aproximada de mililitros que generalmente toma el laboratorio para los estudios de gabinete. Tales procedimientos son clasificados como de riesgo mínimo para el paciente, y se realizó por personal profesional.

Confidencialidad

Toda la información correspondiente al estado de salud del paciente fué manejada de manera estrictamente confidencial. Como una institución que otorga servicio de investigación en salud, las autoridades sanitarias en México pueden solicitar acceso a la información para evaluar la metodología y calidad de los datos de los estudios de investigación, pero la identidad del paciente es confidencial.

Eventualmente, los resultados pueden ser utilizados para generar una publicación médica a juicio de los investigadores y la Institución. Por lo tanto todas las personas involucradas están comprometidas a guardar la información de manera confidencial y velar por la seguridad física, moral y psicológica de los participantes voluntarios.

Consentimiento Informado

De acuerdo con la Ley General de Salud (artículos 21-24), si se trata de investigaciones con riesgo mínimo se debe obtener consentimiento verbal (de éste, la Comisión de Ética, solicitó el guión que se utilizó para su obtención).

METODOLOGIA

Población de Estudio

Pacientes pediátricos con Linfoma de Hodgkin y No Hodgkin atendidos en Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital General “Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”. Se realizó en muestras de sangre de sangre periférica de pacientes pediátricos con Linfoma.

Criterios de selección

a) Criterios de inclusión: Pacientes pediátricos con diagnóstico de linfomas en el periodo comprendido de enero a junio del 2016.

b) Criterios de exclusión: Pacientes que hayan recibido tratamiento previo de quimioterapia y radioterapia en otro hospital.

c) Criterios de eliminación: Que no se obtengan datos completos del expediente clínico.

Lugar donde se desarrolló el estudio

Los procedimientos se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Hospital de Infectología, CMN “La Raza”.

Periodo de estudio

Enero a junio del 2016.

DEFINICIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE MEDICIÓN
TIPO HISTOLOGICO DE LINFOMA	Es la estirpe de linfoma Hodgkin y no Hodgkin que nos reporta el patólogo.	Estirpe celular de un linfoma ya sea de células B o T.	Cualitativa	Nominal	1)Linfoma no hodgkin: a)Linfoblastico de células b b)Linfoblastico de células T 2)Linfoma no hodgkin a)de células b difuso b)de células T difuso 3)Linfoma no hodgkin a)Tipo burkitt células b b)Tipo Burkitt células t 4)Linfoma no hodgkin a)tipo de células grande con anaplasia b o t

					<p>b) tipo de células grandes sin anaplasia b o t</p> <p>5) Enfermedad de hodgkin :</p> <p>a) Inmunofenotipo I células histiocíticas y linfocíticas marcan para CD20*</p> <p>b) inmunofenotipo II células de Red Stenberg que marcan cd15 o CD30*</p>
<p>TRANSLOCACIONES CROMOSOMICAS</p>	<p>Es el desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar en el genoma. El intercambio de segmento entre dos cromosomas.</p>	<p>Serán las alteraciones cromosómicas que se encuentren en los pacientes con la muestra de sangre de 3 ml con técnica de RT-PCR .</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Nominal</p>	<p>Translocaciones pertenecientes a cualquiera de los siguientes linfomas:</p> <p>1) Linfoma no hodgkin: a) Linfoblastico de células b b) Linfoblastico de células T</p> <p>2) Linfoma no hodgkin a) de células b difuso b) de células T difuso</p> <p>3) Linfoma no hodgkin a) Tipo burkitt células b b) Tipo Burkitt células t</p> <p>4) Linfoma no hodgkin a) tipo de células grande con anaplasia b o t b) tipo de células grandes sin anaplasia b o t</p> <p>5) Enfermedad de hodgkin : a) Inmunofenotipo I células histiocíticas y linfocíticas marcan para CD20* b) inmunofenotipo II células de Red Stenberg que marcan cd15 o CD30*</p>
<p>TIPO HISTOLÓGICO DE LINFOMA NO HODGKIN EXTRANODAL.</p>	<p>Patrón histológico de la lesión reconocida en tejido, que se caracteriza por proliferación de células malignas de linaje linfoide o histiocítico.</p>	<p>Será el patrón histológico reportado en la biopsia.</p>	<p>Cualitativo</p>	<p>Nominal</p>	<p>1. Precusores linfoides.</p> <p>2. Células B Maduras</p> <p>3. Células T maduras.</p>
<p>SEXO</p>	<p>Se refiere a los conceptos sociales de las funciones, comportamientos, actividades y atributos que cada sociedad considera apropiados para los hombres y las mujeres.</p>	<p>Femenino y Masculino, referido en historia clínica</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Nominal Dicotómica</p>	<p>1. Masculino 2. Femenino</p>

EDAD	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo hasta su inclusión en el estudio.	Edad en la que se realizó la biopsia, registrada en la historia clínica.	Cuantitativa discreta	Numérica.	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0-28 días (Recién nacido) 2. 29 días - 12 meses (lactante menor o infante) 4. 1-2 años (lactante mayor un año a un año 11 meses) 5. 2-4 años (preescolar) 6. 4-9 años (escolar) 7. 9-16 años (adolescente)
Localización	El estudio del cuerpo humano se organiza por regiones siguiendo diversos criterios, primordialmente, una segmentación ordenada (Cabeza, cuello, tórax, abdomen, etcétera) ¹³⁰	Es el sitio anatómico donde se localiza el tumor que fue diagnosticado en el paciente	Nasofaringe, abdomen, hueso, gónadas, piel, tiroides, etc.	Categorica	<p>Cualitativa</p> <p>Nominal</p>

Datos clínicos y definiciones: Complementamos la información con la recolección de datos en los expedientes clínicos, en los carnet de quimioterapia, así como registros electrónicos médicos incluyendo edad, sexo y diagnóstico.

Detección de translocaciones: La identificación de translocaciones genéticas fue realizado en la Unidad de Investigación Médica Hospital de Infectología CMN “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro social.

Líneas celulares: En este estudio, las líneas celulares se obtuvieron de botones de sangre periférica, y se realizó estudio citogenética de estos por PCR.

Recursos e Infraestructura:

Se tomaron los datos de expedientes clínicos y electrónicos así como de los carnets de quimioterapia y se registrarán todos los datos en la hoja de recolección de datos por la doctora Susana Elizabeth Anaya Aguirre y la doctora Eleonor Hidaly Rodríguez Sánchez, y posteriormente se registraron en una base de datos electrónica.

Experiencia del grupo y tiempo a desarrollarse:

Se tiene la experiencia por parte del servicio de oncología pediátrica en el diagnóstico e identificación de los pacientes con Linfoma Hodgkin y No Hodgkin, así como la documentación bibliográfica internacional de las translocaciones en estos dos padecimientos. Hasta el momento, sin contar con estudios de

investigación realizados en México para determinar las translocaciones más frecuentes en México. Se planeó desarrollar este estudio en el periodo comprendido de Enero a Junio del 2016.

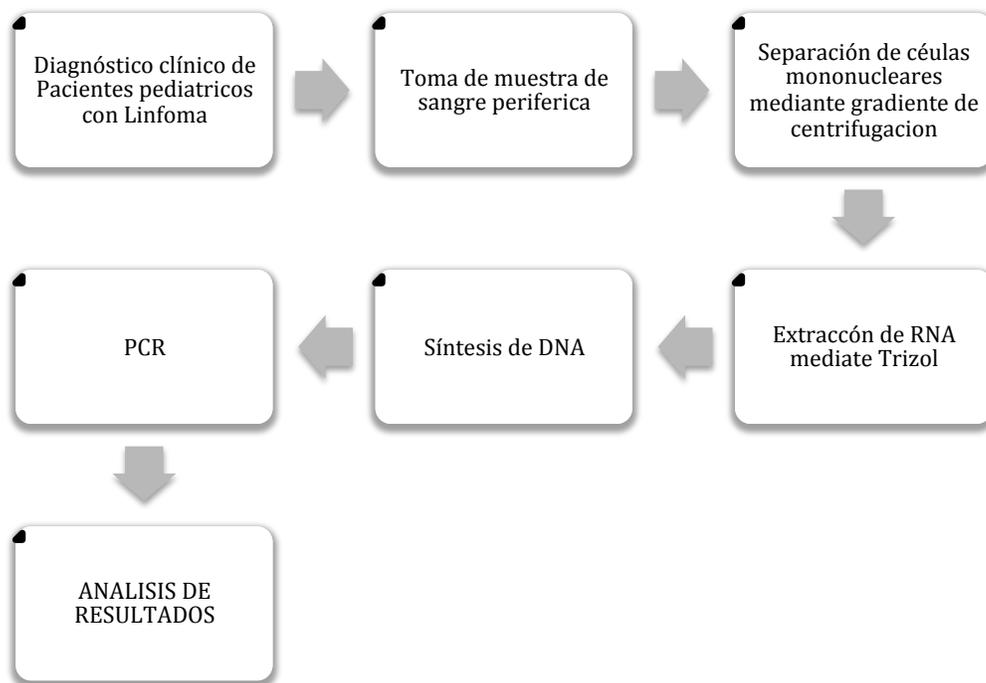
Diseño de estudio

Estudio observacional, descriptivo prospectivo y analítico.

Análisis estadístico

Se analizarán las frecuencias de las traslocaciones detectadas en los diferentes grupos.

Logaritmo metodológico.



TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se analizarán los expedientes y reportes histopatológicos de todos los pacientes con biopsia positiva para linfoma Hodgkin y no Hodgkin en el servicio de Oncología Pediátrica del Hospital General Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza en el periodo comprendido de enero a junio del 2016, para posteriormente determinar cuáles fueron las translocaciones encontradas y la frecuencia de las mismas.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de sangre periférica con las cuales se trabajó, fueron colectadas en tubos para extracción de sangre por sistema de vacío Vacutainer con citrato trisódico. Mediante inversión se homogenizó la muestra para evitar la formación de coágulos.

La muestra se entregó a la persona designada para su transportación del Servicio de oncología a la Unidad médica de investigación; la muestra durante su traslado se resguardó dentro de un tubo de 5 ml para evitar la pérdida de la muestra por caída u otro evento que pudiera existir en el camino. La muestra se transportó a temperatura ambiente (15o - 28o C).

Una vez que se entregó la muestra en la unidad, se registró en la bitácora y se le asignó un código para su identificación el cual fue utilizado durante todo el procedimiento.

Para la manipulación de la muestra se trabajó con material estéril, uso de guantes, cubreboca, campanas aislantes y áreas asignadas para cada uno de los procesos.

Se siguieron los lineamientos establecidos para laboratorio para controlar contaminación en los diferentes procedimientos de extracción, adición de material genético, adición de mezcla maestra para amplificar y uso de termocicladores, todo esto, bajo las medidas estrictas de manejo de muestras. Se asignaron campanas de flujo para los procesos de extracción y adición de muestra. Se asignaron pipetas específicas para cada uno de los procedimientos.

Separación de células Mononucleares mediante gradiente de densidad

La sangre periférica, se transfirió a un tubo de 15 mL. Se agregó el mismo volumen de PBS 1X . En otro tubo de 15 mL se agregó el mismo volumen de Ficoll, ajustando una proporción de 1:1:1.

a) Se vació la sangre diluida en PBS a una solución de Ficoll procurando no mezclar fases.

b) Se centrifugó a 3000 RPM, 15 minutos a 19oC.

c) Se obtuvo la interfase entre los eritrocitos y la fase acuosa que se encontró en la parte superior del tubo.

d) La interfase se transfirió a otro tubo de 15 mL y se verificó si quedaron restos de eritrocitos, en caso que el estado de la muestra sea limpia solo se realizan 2 lavados con PBS 1X en una proporción de 1:3; se centrifugó a 2500 RPM por 5 minutos a 4oC.

e) Se retiró el sobrenadante, y se realizó nuevamente lavado de PBS 1X

f) El botón final se repartió en varias alicuotas en microtubos de 1.5 mL.

- g) Se centrifugó a 2500 RPM por 5 minutos a 4°C.
- h) Se retiró el sobrenadante.
- i) Los tubos se resguardaron en ultracongelador a -70°C.

Extracción de RNA mediante Trizol

- a) Se agregó al botón leucocitario 1 mL de TRIZOL y homogenizará mediante pipeteo hasta deshacer la mayor cantidad de residuos blancos.
- b) Se incubó a 30°C por 5 minutos.
- c) Se agregó 200 µL de cloroformo y se homogenizó en vortex.
- d) Se incubó a 30°C por 3 minutos.
- e) Se centrifugó a 12,000 RPM, 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron 3 fases, la primera fase de aspecto acuoso se trasladó a otro microtubo de 1.5 ml.
- f) Se adicionó a la fase acuosa 500 µL de alcohol Isopropílico grado biología molecular.
- g) Se incubó 24 horas a 4°C.
- h) Posteriormente se incubó la muestra a 30°C por 10 minutos.
- i) Se centrifugó a 12,000 RPM, 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, Y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 75%.
- j) Se centrifugó a 7500 RPM, 5 minutos a 4°C.
- k) Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el botón por 10 minutos.
- l) Se adicionaron 30 µL de Agua destilada libre de RNAsas para eluir el botón.
- m) Se incubó 60°C por 10 minutos.

Síntesis de DNA (retro-transcripción)

Se realizó cuantificación de ácidos nucleicos mediante el equipo de espectrofotometría (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific®), la concentración de ARN que se utilizó para cada reacción de retrotranscripción, fue 1 µg/ µl.

Se preparó para cada muestra un volumen final de 20 µl. En breve, se adicionó en un micro tubo de 0.2 ml, 1 µg de RNA de templado, se adicionó 1 µl de Oligo dT (0.5 µg), se agregó agua libre de RNAsas hasta tener un volumen final de 12 µl; se centrifugó ligeramente. La mezcla se colocó en el termociclador a 65°C por 5 minutos, posterior se incubó en hielo por 5 minutos. Se agregó 4 µl de Buffer 5X

para la síntesis de la primera hebra, 2 µl de dTT (0.1M), 1 µl de mezcla de dNTP's (10mM) y 1 µl de MML-V RT (200 U). Finalmente, se incubó en el Termociclador a 37oC por 50 minutos y posteriormente a 70oC por 10 minutos. La muestra de DNA se conservó en un congelador a -20oC.

Oligonucleótidos

En la tabla siguiente se muestran las secuencias específicas que fueron utilizadas para la amplificación de regiones correspondientes para cada una de las translocaciones de interés.

LINFOMA DE HODGKIN		
VARIEDAD	TRANSLOCACIONES FRECUENTES	PRIMERS
CLASICO	t(14;18)(q32;q21)	3' MBR4 (Forward) TCTCTAAACCACGCCAACCAGT JH (Reverse) GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG
LINFOMA DE BURKITT	t(8;14)(p24;q32)	MYC/04 ACAGTCCTGGATGATGATGTTTTTGTGAAGGTCT JH ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT
LINFOMA DIFUSO DE CELULAS B GRANDES	t(14;18)(q32;q21)	3' MBR4 (Forward) TCTCTAAACCACGCCAACCAGT JH (Reverse) GGTCACCGTCTCCTCAGGTAAG
LINFOMA LINFOBLASTICO	t(12;21)(p13;q22)	TEL-TGCACCCTCGATCCTGAAC AML1-AACGCCTCGCTCATCTTGC

RESULTADOS

Se recolectaron 10 muestras de sangre periférica del Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital General "Gaudencio González Garza" del Centro Médico Nacional "La Raza", las muestras fueron procesadas en la Unidad de Investigación Hospital de Infectología CMN "La Raza", donde se extrajo el material genético de RNA mediante la técnica de Trizol y se realizó retrotranscripción para la síntesis de DNA complementario (DNAC). Posteriormente se detecto por PCR punto final las traslocaciones de interés.

Amplificación del gen constitutivo B-Actina

A continuación se muestra amplificación de P-Actina para conocer integridad de DNA complementaria.

AMPLIFICACION DE B-actina en MUESTRAS DE LINFOMA

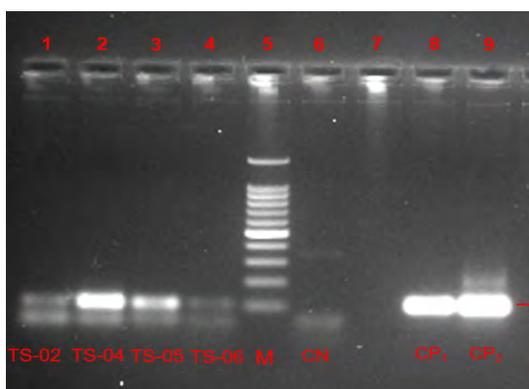


FIGURA 1. Amplificación de B-actina. Gel de agarosa al 1%. Carriles 1-4 positivos para B-actina, carril 5. Marcador peso molecular. Carril 6 y 7 controles negativos. Carril 8 y 9 controles positivos para B-actina.

Amplificación de traslocación TEL-AML1 T(12;21)(p13;q22)

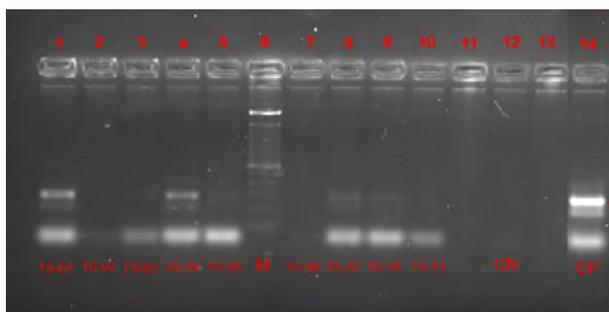


FIGURA 2. Amplificación de TEL-AML1. Gel de agarosa al 1%. Carril 1 al 5. TS-01 y TS-04 se encontraron positivos. Carril 6 Marcador peso molecular. Carril 7 al 11 fueron negativos. Carril 12 control negativo. Carril 14 control positivo para TEL-AML1.

MYC Y BCL-2

A continuación se muestran las condiciones utilizadas para estandarización de las traslocaciones BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14).

MYC t(8;14)(p24;q32)

Tabla 1. Condiciones de temperatura utilizadas para MYC.

MUESTRA	TEMPERATURA °C
Myc1	60
Myc2	62
Myc3	64
Myc4	66

Para llevar a cabo la estandarización de MYC se amplificó en el termociclador a las diferentes temperaturas que se muestran en tabla 1, y no se logró ninguna amplificación con las temperaturas mencionadas.

BCL-2 t(14;18)(q32;q21)

Tabla 2. Condiciones de temperatura utilizadas para estandarización de BCL-2.

MUESTRA	TEMPERATURA °C
MBR1	56
MBR2	58
MBR3	60
MBR4	62

Para llevar a cabo estandarización de BCL-2 se amplificó en el termociclador a las diferentes temperaturas que se muestran en tabla 2, y no se logró ninguna amplificación con las temperaturas mencionadas.

Resultados de las muestras obtenidas.

Se detectó la presencia de las traslocaciones relevantes BCL-2 t(14;18), MYC t(8;14), TEL-AML(12;21) detectadas con mayor frecuencia en la población de pacientes pediátricos del servicio de Oncología pediátrica del Centro Médico Nacional "La Raza" con Linfoma de Hodgkin y Linfoma No Hodgkin dentro del periodo comprendido de Junio a Noviembre del 2016.

Se procesaron 10 muestras de sangre periférica, las cuales se encontraron en buen estado para su posterior procesamiento y detección de las traslocaciones

cromosómicas específicas previamente mencionadas.

De las 10 muestras recibidas, 4 fueron casos de Linfoma de Hodgkin y 6 casos de Linfoma no Hodgkin.

□

Traslocacion TEL-AML1 en niños con LINFOMA

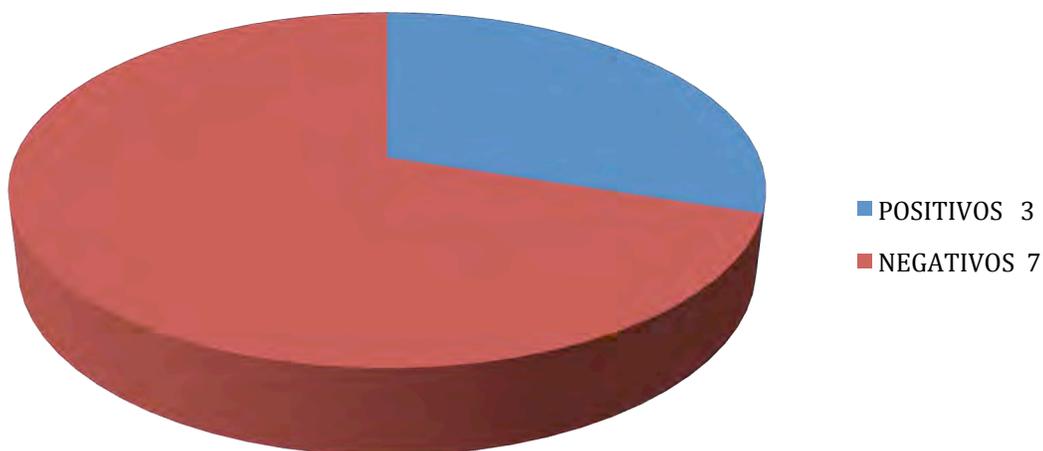


Figura 3. Muestra la frecuencia de los casos detectados para las traslocaciones.

A continuación se muestran las traslocaciones detectadas:

	MYC (8;14)	TEL-AML T(12:21)	BCL-2 T(14-28)
1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
5	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Casos detectados para las Traslocaciones Cromosómicas.

De los 5 casos de Linfoma No Hodgkin, se detectaron 2 pacientes con la traslocación (12;21)(p13;q22) TEL-AML1 y solo 1 paciente con Linfoma de Hodgkin positivo para la traslocación (12;21)(p13;q22) TEL-AML1.

Con respecto a los datos positivos, el correspondiente al numero 1 se trata de un paciente masculino de 8 años 5 meses de edad, con afección nodal cervical izquierda, mediastinal y abdominal, con diagnostico histolopatológico de Linfoma No Hodgkin variedad Linfoblástico.

El segundo caso positivo numero 4 es un paciente masculino de 12 años 5 meses, con primario cervical, diagnostico histopatológico de Linfoma Hodgkin variedad Esclerosis nodular.

Por último también positivo, número 5, paciente femenino de 10 años 3 meses con primario nodal submaxilar con diagnostico histopatológico de Linfoma No Hodgkin variedad anaplásica.

Discusión

La detección de las traslocaciones cromosómicas específicas constituyen un parámetro valioso no solo como confirmatorio diagnóstico, sino también para asignar protocolos de tratamiento y pronóstico para cada paciente.

Durante el tiempo del estudio se intentaron estandarización de las traslocaciones de BCR y MYC por PCR, sin embargo no se pudieron llevar a cabo debido a la falta de controles positivos (línea celular). Un control positivo es de utilidad ya que determina que la reacción de PCR se llevó a cabo de la manera correcta, además de que sirve como comparativo al momento de analizar las muestras problema, por el otro lado el control negativo muestra ausencia de contaminación en las reacciones.

Sin embargo contamos en la unidad con la línea celular positiva para TEL-AML1 siendo encontrada en este protocolo en 2 casos de linfoma no Hodgkin, siendo esperada para uno de los pacientes que corresponde a un linfoma linfoblástico, sin embargo fue positiva en un paciente con linfoma anaplásico y otro con linfoma de Hogkin. Se debe tomar en cuenta que las traslocaciones al ser productos de la unión de dos cromosomas, pueden mostrar diferentes puntos ruptura, los cuales pueden quedar fuera de la detección las diferentes isoformas que pueden llegar a existir si no se diseñan los primers adecuadamente.

Con respecto a los datos positivos, el correspondiente al numero 1 se trata de un paciente masculino de 8 años 5 meses de edad, con afección nodal cervical izquierda, mediastinal y abdominal, con diagnostico histolopatológico de Linfoma

No Hodgkin variedad Linfoblástico. Se esperaba encontrar efectivamente la traslocación TEL-AML detectada, confirmándose el diagnóstico.

El segundo caso positivo número 4 es un paciente masculino de 12 años 5 meses, con afección cervical, tumoración mediastinal y diagnóstico histopatológico de Linfoma Hodgkin variedad Esclerosis nodular, en quien se esperaba la detección de la t(14;18)(q32;q31) sin embargo considerando que no fue posible realizarse debido a no haberse logrado la estandarización, no es posible valorarse. Sin embargo si demostró la presencia de TEL-AML, lo que nos da pauta al estudio de dicha traslocación en esta variedad de linfoma en futuros casos.

Por último también positivo, número 5, paciente femenino de 10 años 3 meses con primario nodal submaxilar con diagnóstico histopatológico de Linfoma No Hodgkin variedad anaplásica, en quien se espera encontrar la t(2;5)(p23;q23). Sin embargo debido a no contarse con este recurso, no se realizó. Sin embargo al buscarse TEL-AML resulta positivo, sin embargo como conocemos, al tener el cáncer un origen genético, puede además presentar una amplia variedad de alteraciones cromosómicas, que determinen la etiología o que solo sean asociadas.

Los resultados obtenidos de los 10 pacientes en su mayoría no presentaron ninguna traslocación, este dato es común encontrarlo debido a que como se mencionaba previamente pueden encontrarse diferentes puntos de ruptura, siendo encontrado en la literatura que únicamente el 5% de las muestras es detectada. Por otra parte se debe tomar en cuenta, que la prueba que nosotros propusimos en este proyecto únicamente detectaban las traslocaciones más relevantes reportadas.

Conclusión

En el periodo comprendido de Enero 2012 a Junio 2016 se recolectaron y se procesaron 10 muestras del servicio de Oncología pediátrica del Centro Médico Nacional “La Raza”. Se estandarizó la detección de las 3 traslocaciones propuestas en este estudio, y se encontró que el 30%(3/10) de los pacientes presentaron la traslocación (12;21)(p13;q22) TEL- AML1, relacionada con buen pronóstico y ninguno para BCL-2 ni para Myc.

Este trabajo logro comprobar la importancia del estudio molecular, su utilidad radica en confirmaciones diagnósticas y pronóstico. Por lo que deberá correlacionarse con cada uno de los casos.

Perspectivas

. Es importante continuar la estandarización de las diferentes traslocaciones por PCR.

. Al realizar la detección de las traslocaciones se pueden generar

terapias individualizadas para cada paciente.

. El objetivo final de este protocolo es apoyar al médico tratante en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes pediátricos con linfomas.

. Estudios moleculares realizados previamente han demostrado que la t(12;21) , que fusiona los oncogenes TEL y AML1, es la más frecuente en la LLA-B infantil y que ocurre en aproximadamente el 25% de los casos, para nosotros el encontrar que esta traslocación ocurre en el 30% de los niños con diagnóstico de linfoma es también un hallazgo muy importante, ya que al encontrar este oncogen por su gran capacidad de mutación o transformación induce a la formación de cáncer en una célula, aunque sea considerado de buen pronóstico es el resultante responsable del desarrollo de la enfermedad y estas mutaciones de los genes que se convierten en oncogenes pueden ser heredadas o pueden resultar de la exposición a sustancias del ambiente que causan cáncer. Este estudio abre la puerta a investigaciones futuras para seguir detectándolo en niños con reciente diagnóstico de linfoma.

ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

1. FOLIO	
2. FECHA DE CAPTURA DE DATOS.	
3. NOMBRE.	
4. AFILIACION.	
5. EDAD AL DIAGNOSTICO.	
6. GENERO.	MASCULINO () FEMENINO ()
7. FECHA EN QUE SE TOMO BIOPSIA GANGLIO:	
8. INSTITUCION DONDE SE REALIZÒ EL DIAGNÒSTICO.	
9. SITIO ANATÒMICO AFECTADO (PRIMARIO).	
10. DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO.	
11. TRANSLOCACIONES ENCONTRADAS	
12. ESTADIO AL DIAGNOSTICO.	• I () II () III () IV ().

A N E X O 2



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL Coordinación de Investigación en Salud

U M A E Hospital Gaudencio González Garza del CMN La Raza Servicio Oncología Pediátrica

Carta de Consentimiento Informado

Nombre del estudio: *ESTUDIO PILOTO DE TRASLOCACIONES RELEVANTES INVOLUCRADAS EN LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON LINFOMA HODGKIN Y NO HODGKIN DEL ÁREA DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA, CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA*

Propósito del estudio. Se ha hecho de nuestro conocimiento que el propósito de este estudio es conocer cuáles son las alteraciones genéticas de pacientes que como nuestro hijo tienen el diagnóstico de linfoma, que no hayan recibido tratamiento previamente.

Como sabemos que nuestro hijo(a) cumple con los requisitos para ser incluido en el estudio, se nos ha invitado a participar.

Procedimientos. Se nos ha informado que si aceptamos que nuestro hijo(a) participe en el estudio le tomarán 3 ml de sangre.

Los procedimientos que se llevarán a cabo para saber cuáles son las alteraciones genéticas de niños con linfoma son los siguientes:

1. *Toma de la muestra.* Se tomarán de alguno de los brazos derecho o izquierdo de su hijo(a), previa limpieza de la zona con clorhexidina.

2. *Análisis de la muestra.* La muestra se llevará al laboratorio de investigación biomédica del CMN La Raza para su extracción del DNA y posteriormente se realizará la prueba de RT-PCR para buscar las translocaciones (alteraciones genéticas), que pudieran existir.

Posibles riesgos y molestias. Dolor al momento de la toma de muestra.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio. Conocerá si se encontró alteraciones genéticas en su hijo y esto colabora para la realización de futuras investigaciones de niños con linfomas como su hijo(a).

Participación o retiro de estudio. Sabemos que la participación de nuestro hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria. Si decidimos no participar, tanto nuestro hijo(a) y nuestra familia seguiremos recibiendo la atención médica brindada por el IMSS, de la misma forma como se ha venido dando como hasta ahora. Es decir, que si no deseamos participar en el estudio, esta decisión, no afectará nuestra con el IMSS y su personal, así como el derecho a obtener los servicios de salud u otros servicios que recibimos.

También sabemos que aun cuando en un principio aceptemos participar, y durante los siguientes semanas o meses siguientes cambiamos de opinión, podemos abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en cualquier momento tampoco modificará los beneficios que tenemos, nuestro hijo(a) y nuestra familia como derechohabientes del IMSS. En caso de que nos retiremos del estudio, entendemos que para los fines de esta investigación, sólo se usará la información que haya brindado desde el momento en que aceptamos participar hasta cuando retiramos el consentimiento.

Privacidad y confidencialidad. Se nos ha informado que todos los datos que proporcionemos que pudieran identificar a nuestro hijo(a) o familia (como nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado para mantener la privacidad.

Sabemos que solamente el equipo de investigadores, que son parte del Servicio de Oncología de este hospital, sabrá que nuestro hijo(a) está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a

la información que se proporcione durante la participación en este estudio, al menos que nosotros así lo decidamos.

Se nos ha asegurado que se podrá dar cierta información en caso de ser necesario para proteger nuestros derechos o bienestar, (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia), o si lo requiere la Ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, se nos aseguró que no se dará información que pudiera revelar la identidad de nuestro hijo(a). Para proteger su identidad se le asignará un número que se utilizará para identificar sus datos, y en las bases de datos electrónicas que se elaboren.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones sobre el estudio. Si tenemos preguntas o queremos hablar con alguien sobre este estudio de investigación, nos podremos comunicar con la Dra. Susana Elizabeth Anaya Aguirre, quienes pueden ser localizados en el Departamento de Oncología del Hospital Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional La Raza, que está ubicado en la calle Av. Vallejo esq. Jacarandas S/N, Colonia La Raza, Delegación Azcapotzalco. Tel: 01 (55) 57 82 10 88 extensiones 23375, 23519 y 23342 de lunes a viernes de 8 a 14 horas.

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación. Si tenemos dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en este estudio de investigación, nos podemos comunicar con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, al Tel. 56276900 ext. 21216, de 9 a 16:00 horas. También al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de consentimiento informado. Se nos ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además hemos leído el contenido de este formato de consentimiento. Se nos ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas nuestras preguntas han sido contestadas a nuestra satisfacción. Se nos ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estamos de acuerdo en que nuestro hijo(a) participe en la investigación que aquí se describe.

Ciudad de México a: _____ de _____ del 2016.

Nombre y firma padre o tutor

Nombre y firma madre

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Dra. Susana Elizabeth Anaya Aguirre
Jefatura de oncología pediátrica.

Dra. Eleonor Hiday Rodríguez Sánchez
Residente de Oncología pediátrica

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

(Testigo 1)

(Testigo 2)

ANEXO 2

ii



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Coordinación de Investigación en Salud
Hospital Gaudencio González Garza del CMN La Raza.

Servicio Oncología Pediátrica

Carta de Asentimiento

México, DF a _____ de _____ del 2016

Nombre del paciente: _____

Nuestros nombres son Dra. Susana Elizabeth Anaya Aguirre y Dra. Eleonor Hidaly Rodríguez Sánchez nuestro trabajo consiste en tratar pacientes con tumores. Queremos informarte que tus padres han aceptado que participes en el estudio donde estamos viendo las alteraciones en los genes de niños con linfomas. Tomaremos una muestra de sangre de 3ml de tu brazo con la finalidad de mandar analizar tu sangre con una técnica llamada Rt-PCR, antes de que recibas tu tratamiento. Asimismo, la Dra. Eleonor te va tomar la muestra de sangre y la llevara al laboratorio de investigación biomédica del Centro Médico Nacional La Raza, cualquier cosa que sientas o te moleste, es importante que se lo digas al tomar la muestra.

Te invitamos a tomar parte de este estudio y si no aceptas, no habrá problema ya que seguirá tu tratamiento como hasta ahora se está dando. Si tienes dudas las puedes comentar con tus papás o con nosotros. Tu cooperación en esta investigación ayuda a futuras investigaciones para el tratamiento de enfermedades como la tuya.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA
HOSPITAL GENERAL GAUDENCIO GONZALEZ GARZA**

BIBLIOGRAFIA

1.- México. Secretaria de Salud. Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México. 2011. Disponible en: URL:

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2011/monografias/P_EPI_DEL_CANCER_EN_NI%C3%91OSyADOLESCENTES_MEXICO.pdf

2.- Fajardo-Gutiérrez A, Rendón-Macías ME, Mejía-Aranguré JM. Epidemiología del cáncer en niños mexicanos. Resultados globales. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2011;49(Supl 1):S43-70.

3.- Gersen SL, Keagle MB, eds. The principles of clinical cytogenetics. 3th ed. New York: Springer-Verlag; 2013.

4.- Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA. Hematopathology. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2011.

5.- Sierrasesúmaga L, Antillón KF, Bernaola E, Patiño A. Tratado de oncología pediátrica. Pearson 2006; 40-72.

6.- López Almaraz R, Montesdeoca Melián A, Rodríguez Luis J. Papel de la genética molecular en el cáncer infantil. An Pediatr (Barc) 2003;59:334-44.

7.- García JF, Piris MA, Morente MM. Procesos linfoproliferativos no Hodgkin de células B. Rev Esp Patol 2004;37:139-58.

8.- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Invest Disc 2013;2:70-8.

9.- Serrato Díaz A, Flores Rentería L, Aportela Cortez J, Sierra Palacios E. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Disponible en: URL:

http://www.academia.edu/21048445/PCR_reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa

10.- Joshi M, Deshpande JD. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. Int J Biomed Res 2011;2:81-97.

11.- Encinas G. Biología molecular en oncología: lo que un clínico debería saber. Rev Med Clin condes 2013;24:563-70.

12.- Dave BJ, Nelson M, Sanger WG. Lymphoma cytogenetics. Clin Lab Med 2011;31:725-61.

- 13.- Kamdar KY, Sandlund JT, Bollard CM. Malignant lymphomas in childhood. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J. Hematology: basic principles and practice. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. p. 1255-66.
- 14.- Todd CR. The molecular biology of cancer. In: Fonseca RJ. Oral and maxillofacial surgery. 2nd ed. St Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2009. p. 645-79.
- 15.- Najfeld V. Conventional and molecular cytogenetic basis of hematologic malignancies. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J. Hematology: basic principles and practice. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. p. 728-80.
- 16.- Re D, Zander T, Diehl V, Wolf J. Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13(Suppl 1):19-22.
- 17.- Slovak ML, Bedell V, Hsu YH, Estrine DB, Nowak NJ, Delioukina ML, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:3443-54.
- 18.- Falzetti D, Crescenzi B, Matteucci C, Falini B, Martelli MF, Van Den Berghe H, et al. Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica* 1999;84:298-305.
- 19.- Murray PG, Qiu GH, Fu L, Waites ER, Srivastava G, Heys D, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004;23:1326-31.
- 20.- Shiramizu B, Perkins SL, Bergeron S, Lones M, Kelly K, Weiner M, et al. Assessing immunoglobulin heavy chain rearrangements in pediatric CD20-positive and CD20-negative classic Hodgkin's disease. *Clin Lymphoma* 2004;5:184-9.
- 21.- Jaffe MD, Haresh M. Hodgkin lymphoma: an update o its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma*; 2010.
- 22.- Labardini Méndez JR, Cervera Ceballos E, Corrales Alfaro C, Balbuena Martínez M, Barbosa Ibarra AA, Espinoza Zamora JR, et al. Linfoma no Hodgkin. *Cancerologia* 2011;6:139-52.
- 23.- Guerra-Soto AJ, Reboloso-Zúñiga E, González-Sánchez AG, Rubio-Jurado B, Nava A. Linfoma no Hodgkin. *Conceptos generales Residente* 2013;8:23-34.
- 24.- Dokmanović L, Rodić P, Krstovski N, Lazić J, Dragana J. Non-Hodgkin lymphomas in childhood: how to move on? *Srp Arh Celok Lek* 2014;142(7-8):498-504

- 25.- Sandlund JT, Perkins SL. Uncommon non-Hodgkin lymphomas of childhood: pathological diagnosis, clinical features and treatment approaches. *Br J Haematol* 2015;169:631-46.
- 26.- El-Mallawany NK, Cairo MS. Advances in the diagnosis and treatment of childhood and adolescent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2015;13:113-23.
- 27.- Dokmanovic L. Biomarkers in childhood non-Hodgkin's lymphomas. *Biomark Med* 2013;7:791-801.
- 28.- Lange J, Burkhardt B. Treatment of adolescents with aggressive B-cell malignancies: the pediatric experience. *Curr Hematol Malig Rep* 2013;8:226-35.
- 29.- Uzanova L, Burke A. Update on non-Hodgkin lymphoma in children. *Paediatr Child Health (Oxford)* 2016;26:57-62.
- 30.- Stones DK, Brown JB. Non-Hodgkin Lymphoma. *Pediatric Hematology-Oncology in countries (Springer)* 2014;16:270-89.
- 31.- Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Protocolo de manejo para pacientes pediátricos con linfoma no Hodgkin. Disponible en: URL: <http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/planeacion/guiasclinicasHIM/LinfonoHodgkin.pdf>
- 32.- Salaverria I, Philipp C, Oshlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* 2011;118:139-47.
- 33.- Lundin C, Hjorth L, Behrendtz M, Ehinger M, Biloglav A, Johansson B. Submicroscopic genomic imbalances in Burkitt lymphomas/leukemias: association with age and further evidence that 8q24/MYC translocations are not sufficient for leukemogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52:370-7.
- 34.- Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2013;98:255-63.
- 35.- Cario G, Stadt UZ, Reiter A, Welte K, Sykora KW. Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br J Haematol* 2000;110:537-46.
- 36.- Busch K, Keller T, Fuchs U, Yeh RF, Harbott J, Klose I, et al. Identification of two distinct MYC breakpoint clusters and their association with various IGH breakpoint regions in the t(8;14) translocations in sporadic Burkitt-lymphoma. *Leukemia* 2007;21:1739-51.

- 37.- Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ Jr, Bacchi CE. Nodal diffuse large B-cell lymphomas in children and adolescents: immunohistochemical expression patterns and c-MYC translocation in relation to clinical outcome. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1815-22.
- 38.- Sebire NJ, Webb D, Ramsay AD. Anaplastic large cell lymphoma with ALK expression and presence of the t(2;5) translocation in a 5-month-old infant. *Fetal Pediatr Pathol* 2005;24:63-70.
- 39.- Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007;92:519-32.
- 40.- Liang X, Meech SJ, Odom LF, Bitter MA, Ryder JW, Hunger SP, et al. Assessment of t(2;5)(p23;q35) translocation and variants in pediatric ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2004;121:496-506.
- 41.- Hernández L, Beà S, Bellosillo B, Pinyol M, Falini B, Carbone A, et al. Diversity of genomic breakpoints in TFG-ALK translocations in anaplastic large cell lymphomas: identification of a new TFG-ALK(XL) chimeric gene with transforming activity. *Am J Pathol* 2002;160:1487-94.
- 42.- Machado I, Illueca C, García-Casado Z, López-Guerrero JA, Lorente P, Lavernia J. Linfoma de Hodgkin con presencia de t(14;18) en paciente con antecedentes de linfoma folicular. *Rev Esp Patol* 2013;46:106-11.
- 43.- MacLeod RA, Spitzer D, Bar-Am I, Sylvester JE, Kaufmann M, Wernich A, et al. Karyotypic dissection of Hodgkin's disease cell lines reveals ectopic subtelomeres and ribosomal DNA at sites of multiple jumping translocations and genomic amplification. *Leukemia* 2000;14:1803-14.
- 44.- Gravel S, Delsol G, Al Saati T. Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this translocation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 1998;91:2866-74.
- 45.- Hussein H, Israa, Abdul HM, Abdul AN, AL-Rikabi, Khalid T. Association of t(14; 18) Chromosomal Translocation to Hodgkin's Lymphoma in Iraqi Patients Using Multiplex PCR Technique. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 2015;14: 80-90.
- 46.- Green M, Gandhi MK, Camilleri E, Marlton P, Lea R, Griffiths L. High levels of BACH2 associated with lower levels of BCL2 transcript abundance in t(14;18)(q21;q34) translocation positive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 2009;33:731-4.
- 47.- Basso K, Frascella E, Zanesco L, Rosolen A. Improved long-distance polymerase chain reaction for the detection of t(8;14)(q24;q32) in Burkitt's lymphomas. *Am J Pathol* 1999;155:1479-85.

48.- Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weiss PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:4869-73.

49.- Romana SP, Mauchauffé M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. Blood 1995;85:3662-70.

50- Sarris AH1, Luthra R, Papadimitracopoulou V, Waasdorp M, Dimopoulos MA, McBride JA, et al. Amplification of genomic DNA demonstrates the presence of the t(2;5) (p23;q35) in anaplastic large cell lymphoma, but not in other non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, or lymphomatoid papulosis. Blood 1996;88:1771-9.

51.- Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, Mariamé B. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. Blood 1999;93:3088-95.