



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**"ANÁLISIS MOLECULAR DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA DE ESTIRPE B"**

Que presenta

QFB Jesica Figueroa Padilla

DIRECTOR DE TESIS

DC. Sergio Gutiérrez Castellanos

CO-ASESOR

DC. Martha Eva Viveros Sandoval

Agosto 2013



INDICE GENERAL

Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
Lista de abreviaturas	vi
Resumen	vii
I. INTRODUCCION	1
1.1 DEFINICIÓN DE LEUCEMIA	3
1.2 ETIOLOGIA	3
1.3 EPIDEMIOLOGIA	4
1.4 CARACTERISTICAS CLINICAS	5
1.5 CLASIFICACION	5
1.6 EVALUACIÓN MOLECULAR	5
1.6.1 Translocación t(9;22) (q34;q11)	6
1.6.2 Translocación t(12;21) (p12;q22)	8
1.6.3 Translocación t(1;19)(q23;p13)	9
1.6.4 Translocación t(4;11)(q21;q23)	10
1.7 FACTORES PRONÓSTICO	11
II. JUSTIFICACION	13
III. HIPOTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
V. ESQUMAGENERAL DE TRABAJO	16
VI. MATERIALES Y METODOS	17
6.1 SITIO DE ESTUDIO	17

6.2 MUESTRA	17
6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	17
6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	17
6.4.1 Criterios de inclusión	17
6.4.2 Criterios de exclusión	18
6.4.3 Criterios de eliminación	18
6.5 PROCEDIMIENTOS	18
6.5.1 Aspirado de médula ósea	18
6.5.2 Características clínicas	19
6. 5.3 Lisis de glóbulos rojos	19
6.5.4 Determinación de viabilidad y cuenta de glóbulos blancos	19
6.5.5 Extracción del RNA	20
6.5.5.a Cuantificación y determinación de pureza del RNA	21
6.5.6 Evaluación de la integridad del RNA	21
6.5.7 Síntesis de cDNA	21
6.5.8 Amplificación del gen control	22
6.5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	24
6.5.10 PCR Anidado	25
6.5.11 Secuenciación	26
VII. RESULTADOS	27
7.1 DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES	27
7.2 CALIDAD DEL RNA	29
7.3 ANÁLISIS DEL GEN CONTROL	30
7.4 ANÁLISIS DE LAS TRANSLOCACIONES	30
7.4.1 <i>TEL-AML1</i>	30
7.4.2 <i>E2A-PBX1</i>	31

7.4.3 MLL-AF4	32
7.4.4 BCR-ABL	32
7.5 SECUENCIACIÓN	34
7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
VIII. DISCUSIÓN	37
IX. CONCLUSIÓN	39
X. BIBLIOGRAFIA	40
XI. ANEXOS	45
Anexo 1. Consentimiento informado	45
Anexo 2. Hoja de recolección de datos en pacientes con LLA	46

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Análisis electroforético de la integridad del ARN de los pacientes.	29
Fig 2. Curva de amplificación por PCR Tiempo Real para el gen control RNasa P.	30
Fig 3. Expresión del gen TEL-AML1.	31
Fig 4. Expresión del gen E2A-PBX1.	31
Fig 5. Expresión del gen MLL-AF4.	32
Fig 6. Expresión del gen BCR-ABL.	32
Fig 7. Geles de agarosa donde se observa todos los casos positivos para los diferentes genes de fusión.	33
Fig 8. Gel de agarosa determinación de concentración.	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores utilizados para amplificación del control RNase P	23
Tabla 2. Condiciones de corrida en el Termociclador en Tiempo Real LigthCycler 480	23
Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR	24
Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR anidada.	25
Tabla 5. Muestras representativas para secuenciación.	26
Tabla 6. Factores pronostico de casos positivos para el gen de fusión TEL-AML1	27
Tabla 7. Factores pronostico de casos positivos para el gen de fusión MLL-AF4	28
Tabla 8. Factores pronostico de casos positivos para el gen de fusión E2A-PBX1	28
Tabla 9. Frecuencia de los genes de fusión en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.	34
Tabla 10. Alineamiento de secuencias	35
Tabla 11. Pruebas de chi-cuadrado	36
Tabla 12. Tabla de contingencia	36

LISTAS DE ABREVIATURAS

ATP trifosfato de adenosina

cDNA Ácido Desoxirribonucleico complementario

CTP citidina trifosfato

dNTP desoxinucleótidos trifosfato

EMR Enfermedad mínima residual

FAB Franco-Americano-Británico

FAM 6-carboxyfluorescein

GTP guanosina trifosfato

LA Leucemias aguda

LMA Leucemias aguda mieloblástica

LLA Leucemia linfoblástica aguda

MO médula ósea

PBS Solución de fosfatos

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

Ph translocación Filadelfia

RNAm Ácido Ribonucleico mensajero

RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa

SNC Sistema nervioso central

TAE Tris, acetato y EDTA

TTP Timidina trifosfato

RESUMEN

Introducción: Al detectar alguna alteración molecular, aporta información adicional para un diagnóstico más específico, así como a la aplicación de tratamientos dependientes del tipo de alteración.

Objetivos: Analizar la expresión de los transcritos TEL/AML1, MLL-AF4, BCR/ABL y E2A/PBX en niños con leucemia linfoblástica aguda.

Material y Métodos: El estudio incluye la detección de las diferentes translocaciones en muestras de medula ósea por el método RT-PCR, a partir del RNA extraído de dichas muestras.

Resultados: Un total de 27 muestras han sido analizadas para la identificación de los marcadores moleculares mediante RT-PCR. Obteniendo 8 muestras positivas para el gen de fusión TEL-AML1, de las cuales 3 resultaron positivas por PCR simple y 5 por PCR anidada; 3 muestras positivas para el gen de fusión MLL-AF4, donde 2 resultaron positivas por PCR simple y 1 por PCR anidada; 2 muestras positivas para el gen de fusión E2A-PBX1, 1 muestra resulto positiva por PCR simple y 1 por PCR anidada; ninguna muestra resulto positiva para el gen de fusión BCR-ABL.

Conclusión: La frecuencia de TEL-AML1 en nuestro estudio coincide con lo reportado internacionalmente mientras que los marcadores de mal pronóstico como el MLL-AF4 y E2A-PBX1 se encuentran con alta frecuencia en comparación con lo reportado internacionalmente. Ningún caso presento más de dos alteraciones moleculares, solo expresaron una.

I. INTRODUCCION

El cáncer es la segunda causa de muerte en personas de 4 a 15 años de edad. La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común que se diagnostica en los niños y según reportes del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA) en el 2008, la LLA representó el 43% de las neoplasias en nuestro país en pacientes menores de 18 años . La LLA se presenta con una tasa anual aproximada de 122 casos nuevos/ millón de habitantes/ año. Se observa un aumento marcado de la incidencia en niños de 2 a 3 años de edad.^{4,5} En el estudio de las Leucemias el desarrollo de nuevas técnicas, como la citogenética y biología molecular, han permitido reconocer algunas alteraciones genéticas específicas, llevando a un diagnóstico más acertado, lo que no sólo ha sido un aporte en la clasificación, sino en el desarrollo de tratamientos dirigidos a estas alteraciones, diferencias pronosticas y al seguimiento más minucioso de las eventuales recaídas en pacientes ya tratados.

Dentro de las alteraciones genéticas que aportan información importante respecto al pronóstico de la enfermedad está el gen de fusión BCR-ABL el cual da lugar a lo que se conoce como cromosoma Filadelfia. Este tipo de alteración se presenta en niños con LLA aproximadamente en un 2-5% y 10-20% adultos. La presencia de translocación se asocia claramente a mal pronóstico.^{13, 14}

Otra alteración importante es la translocación t(12;21)(p12;q22) la cual da lugar al gen de fusión TEL-AML1, la alteración genética más frecuente en niños con

LLA-B, aproximadamente ocurre 20-25%, mientras que en adultos la frecuencia es solo del 3%. Esta alteración genética se asocia a buen pronóstico.

Por otro lado la translocación t (4;11) la cual da lugar al gen de fusión MLL-AF4, es detectada en 50-70% en lactantes con LLA y aproximadamente el 5% en niños con LLA.

Y finalmente la translocación t (1;19)(q23;p13) da lugar al gen de fusión E2A-PBX1, esta alteración es detectada en alrededor de 5-6% en niños con LLA y 3% en adultos con LLA. Se correlaciona con la presencia de características clínicas de alto riesgo.^{3, 5, 13}

1.1 Definición de Leucemia

La leucemias aguda (LA) es la proliferaciones maligna de células precursoras hematopoyéticas, las cuales son detenidas en estadios tempranos de maduración de la hematopoyesis. De acuerdo a modelos recientes, una clona de células madre pre-leucémicas es generada por una primera mutación *in utero*, que en una minoría de los niños progresa a leucemia después de recibir “hits” oncogénicos posnatales.^{15, 16} La LA se expresa por una detención en la diferenciación celular, con proliferación y crecimiento no controlados de células malignas, que se originan en la médula ósea desplazando la producción de células sanguíneas normales. Las leucemias agudas se clasifican en mieloblásticas (LMA) y linfoblásticas (LLA) y dependiendo del patrón inmunofenotípico y citogenética, se establece un subtipo de leucemia.^{1, 2,}

1.2 Etiología

Aunque la causa de la leucemia aguda se desconoce, la transformación leucémica es improbable que sea el resultado de un evento simple, sino a la acumulación de múltiples procesos involucrando interacciones complejas como susceptibilidad del paciente, daño cromosómico secundario a exposición física o química y posiblemente a la información genética transmitida viralmente dentro de células progenitoras susceptibles. Los retrovirus se les ha implicado en la leucemogénesis en animales de experimentación pero no hay alguna asociación clara en humanos. No obstante el virus de Epstein-Barr se le vincula con la LLA de línea B madura (LLA-B) o LLA de tipo Burkitt.

Entre la exposición física y química, hay una clara relación a la exposición de radiaciones nucleares y exposición crónica al benceno respectivamente y el desarrollo de la LA.

Algunas anomalías genéticas heredadas que predisponen a padecer LA son el síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, y la ataxia-telangiectasia. Las leucemias secundarias que siguen a una quimioterapia y/o radioterapia se caracterizan por anomalías citogenéticas específicas y generalmente tienen un pobre pronóstico. Compuestos alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II son con más frecuencia los agentes implicados en leucemias relacionadas a terapia. La mayoría de ellas son leucemias mieloides (>90%), pero se está incrementando el número de pacientes con LLA que han seguido una terapia con el uso de inhibidores de la topoisomerasa II.^{7, 8} Las leucemias infantiles con translocaciones MLL, según asociaciones epidemiológicas y análisis molecular de breakpoints apuntan a un origen de las translocaciones en el útero, con metabolitos reactivos de productos químicos genotóxicos jugando un potencial papel clave.³⁶

1.3 Epidemiología

La incidencia de cáncer infantil es de 120 a 150 casos por año/por millón de habitantes en menores de 14 años de edad. La leucemia es la enfermedad infantil más frecuente en niños y constituye una tercera parte de todos los casos de cáncer infantil.¹² La LLA abarca cerca del 85% de los casos de leucemia a nivel mundial, representando así la neoplasia más frecuente de la infancia.^{15, 17} La máxima incidencia de LLA tiene lugar entre los 2 y 5 años de edad.¹²

1.4 Características Clínicas

Las manifestaciones clínicas de la LLA puede presentarse de forma insidiosa o bruscamente como un hallazgo incidental en un análisis de sangre de un niño asintomático o como una hemorragia, una infección o un episodio de distrés respiratorio que pueden ser mortales. La duración de presentación de los síntomas de LLA puede variar de días a meses. La fiebre es el hallazgo más común, que ocurre aproximadamente del 50 al 60% de los pacientes. La fatiga y la somnolencia son manifestaciones frecuentes de anemia. Alrededor de un tercio de los pacientes puede presentar dolor óseo, artralgia o limitación al caminar debido a la infiltración del periostio, el hueso o la articulación o al propio desarrollo de células leucémicas en el seno de la medula ósea.¹²

1.5 Clasificación

Basados sobre investigaciones citomorfológicas y citoquímicas, el grupo Franco-Americano-Británico (FAB), estableció los criterios de diagnóstico para la clasificación de la leucemia aguda (LA), distinguiendo dos grupos principales de leucemia aguda, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloblástica aguda (LMA). Subdivisiones posteriores se apoyaron en el inmunofenotipo, la cual forma la base de la clasificación de la LLA y tiene un papel complementario importante para la LMA.^{11, 13}

1.6 Evaluación Molecular

La LLA se asocia a aberraciones cromosómicas tales como re-arreglos génicos (o translocaciones), hiper e hipo diploidías. Las translocaciones involucran

recombinación entre cromosomas normalmente separados, lo cual resulta en modificaciones en la regulación de un gen o bien, en la formación de una proteína quimérica alterada, este último evento es lo que más comúnmente ocurre en LLA (de precursores de células B). Factores de transcripción o proteínas de señalización críticos en el desarrollo de las células madre o en la especificación del linaje durante la hematopoyesis son los principales blancos de corrupción por fusión génica en la leucemia.⁶

De manera general, diferentes alteraciones genéticas definen un subtipo biológico de la enfermedad por lo que a menudo representan factores pronósticos importantes. Actualmente ha sido aceptado que las alteraciones genéticas establecen una clona pre-leucémica, la cual requiere eventos oncogénicos secundarios para dar origen a una clona maligna.^{9,10}

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un ensayo enzimático que provee un método más rápido y más sensible para detectar translocaciones son especialmente adecuadas para el análisis con la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR), una técnica en la cual el RNAm fusionado se transcribe hacia cDNA, y entonces amplificado por PCR usando iniciadores específicos.¹⁴

1.6.1 Translocación t(9;22) (q34;q11)

La gen de fusión BCR-ABL da lugar a lo que se conoce como cromosoma Filadelfia el cual resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, t(9;22)(q34;q11). Parte del gen ABL se fusiona con el

gen BCR dando lugar al gen BCR-ABL. Existen tres tipos de productos de fusión de diferente peso molecular: p190, p210 y p230. La proteína BCR-ABL asociada a LLA es de un peso molecular de 190 kDa. La translocación t(9;22) o la translocación Filadelfia (Ph), aparece de un 2-5% en niños con LLA y en un 10-20% en adultos, usualmente esta translocación es asociada a un fenotipo pre-B LLA.^{3,13} La presencia de esta translocación se asocia claramente a mal pronóstico, ya que la leucemia Ph-positivo es una enfermedad agresiva en la que los pacientes tienen un resultado muy pobre, debido a que tratamiento convencional no es eficaz para este subtipo. Por lo tanto, el diagnóstico preciso de las leucemias Ph-positivas es esencial para proporcionar un tratamiento adecuado.³⁵

Muchas de las translocaciones cromosómica implican tirosin quinasa. BCR-ABL codifica para una proteína quimérica que genera la activación constitutiva de tirosina quinasa con potencial neoplásico.¹⁴ En la mayoría de los casos, las translocaciones yuxtaponen un dominio de tirosin quinasa a otra proteína que contiene un motif de oligomerización. BCRABL fusiona el extremo N-terminal de BCR al extremo C-terminal del ABL. El extremo N-terminales contiene un dominio de oligomerización el cual media la activación independiente de ligando de los dominios quinasa, ocasionando enfermedades como la leucemia. Las fusiones quinasa proporcionan una señal proliferativa para el clon leucémico para expandir, mientras mutaciones adicionales son necesarios para provocar completamente el fenotipo de la leucemia.^{34,}

El mecanismo por el cual la fusión anormal de genes, tales como el BCR-ABL puede dar origen a diferentes leucemias, se atribuye a la función de estos genes en el desarrollo y función de las células de las líneas mieloides y linfoides, así como a la codificación de factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y señales de traducción.¹⁴

1.6.2 Translocación t(12;21)(p12;q22)

La translocación t(12;21)(p12;q22) la cual da lugar al gen de fusión TEL-AML1, la alteración genética mas frecuente en niños con LLA-B, aproximadamente ocurre 20-25%,^{18, 19} mientras que en adultos la frecuencia es solo del 3%, y hasta la fecha ausente en otro tipo de leucemia.²⁶ Esta alteración genética se asocia a buen pronóstico, independientemente de otros factores como la edad o la cifra de leucocitos.³

El gen TEL se localiza en la banda 11p13, esta región es inestable y por lo tanto es susceptible a re-arreglos cromosómicos²⁰, de hecho, se han reportado alrededor de 40 translocaciones involucrando el TEL.²¹

TEL (translocation ETS Leukemia) es una proteína de 452 aminoácidos que pertenece a la familia de factores de transcripción ETS (del inglés E-26 transforming specific), caracterizados por poseer un dominio de unión a DNA denominado ETS.²⁷ Entre otros dominios, TEL contiene un dominio HLH (helix-loop-helix), el cual, media interacciones proteína-proteína que son responsables de eventos de oligomerización homotípica y heterotípica. En el

contexto de una translocación, dichos eventos contribuyen a la alteración en la regulación de la transcripción de manera crucial.

Por otro lado, AML1 es un miembro de la familia de factores de transcripción CBF (del inglés, Core Binding Factor). Los ratones deficientes de este gen ven comprometidos los procesos de desarrollo linfóide y mielóide sobre todo en la etapa adulta²⁸⁻³⁰, ello refleja su importante contribución en diferentes niveles de la hematopoyesis. Su unión a DNA ocurre a través del dominio conservado RDH (Runt Homology Domain) en la región amino terminal. La región C-terminal contiene múltiples dominios de unión a complejos transactivadores y represores es decir el AML1 actúa como un activador o como un represor, en función de su unión con otras proteínas.³¹⁻³³ AML1 funciona como activador transcripcional requerido para la expresión de genes cuyos productos están asociados a desarrollo de la sangre, como TCR δ , IL-3 y el factor de transcripción PU.1. La función del AML1 se requiere para la diferenciación linfóide-B. Además, la pérdida de la actividad del AML1 resulta en un aumento de progenitores multipotentes.

En el contexto de la proteína quimérica ocurre la formación de complejos homodiméricos u oligoméricos que propician una represión constitutiva de genes²⁶

1.6.3 Translocación t(1;19)(q23;p13)

La translocación t(1;19) da lugar al gen de fusión E2A-PBX1, esta alteración es detectada en alrededor de 5-6% en niños con LLA y 3% en adultos con LLA. Se correlaciona con la presencia de características clínicas de alto riesgo.^{3, 13}

El PBX pertenece a la subfamilia de proteínas con homeodominio PBC y es un cofactor que aumenta en gran medida la especificidad de las proteínas HOX.³⁸ Las proteínas codificadas por los genes PBC con homeodominio cooperativamente interactúan con las proteínas HOX para unirse a un sitio prolongado del ADN y regular la transcripción in vivo. Proteínas PBC mejoran la especificidad de los genes *Hox* debido al aumento de tamaño del sitio de unión cooperativa y en la fuerza de la unión al ADN.³⁷

Esta translocación fusiona los potentes dominios de activación transcripcional de E2A al homeodominio C-terminal de PBX1, creando el nuevo factor de transcripción, E2A-PBX. Las proteínas HOX podrían interactuar con homeodominios que contiene el E2A-PBX y localizar sitios de regulación en el ADN. Esto supone que E2A-PBX provocaría la transformación mediante la regulación deficiente de los genes diana de los *Hox*. La leucemia inducida por E2A-PBX se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación y se sabe que los genes *Hox* regulan la diferenciación hematopoyética. La mala regulación de los genes *Hox* se sabe que causa leucemia.³⁹

1.6.4 Translocación t(4;11)(q21;q23)

La translocación t (4;11) la cual da lugar al gen de fusión MLL-AF4, es detectada en 50-70% en lactantes con LLA y aproximadamente el 5% en niños con LLA.³ Constituye una de las alteraciones genéticas que confiere mal pronóstico y recaída temprana.²²

El gen MLL (*del inglés, Mixed Linage Leukemia*), codifica a una proteína homóloga a TRX (TRITHORAX, de *Drosophyla*) y es capaz de regular, a través de su actividad metil transferasa de histonas, la transcripción de genes HOX los cuales están involucrados tanto en el patrón de desarrollo como en la diferenciación hematopoyética ²³

Respecto al gen AF4 se ha mostrado que presenta señales de localización nuclear y probablemente su actividad sea de transactivador.²⁴ Se ha demostrado que las quimeras MLL contribuyen el fenotipo de la leucemia al influir en las rutas de diferenciación de células hematopoyéticas no comprometidas o progenitores tempranos. ²⁵

1.7 Factores pronóstico

En la investigación sobre los aspectos clínicos y biológicos de LLA se ha identificado numerosas características con pronóstico potencial. En protocolos modernos, la terapia adaptada a riesgos refleja la probabilidad de fracaso del tratamiento en la LLA infantil. Por lo que, los factores pronósticos evaluados en inicialmente en el diagnóstico se utilizan para estimar el riesgo individual de recaída de un paciente y para ajustar la intensidad de tratamiento requerido por la terapia, se estratifica en diferentes grupos de riesgo (estándar / bajo, intermedio, alto) ⁴⁰

En el departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos” se utiliza como esquema de tratamiento para los

niños con LLA el mismo que utiliza el grupo de trabajo St Jude, por lo que los oncólogos del hospital toman en cuenta los mismos factores pronostico para ubicar el paciente en los diferentes grupos de riesgo.

Prognostic Factors Currently Used to Determine Therapy by a sample of Childhood ALL Clinical Trials Group

	BFM	COG	DCOG	DFCI	FRALLE	St. Jude	TPOG
Age	No*	Yes	No*	Yes	Yes	Yes	Yes
WBC	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Phenotype	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Sex	No	Yes**	No	No	No	No	Yes**
CNS Status	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Early Morph. Response	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes
MRD	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
TEL/AML1	Yes	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Hyperdiploidy: favorable trisomies	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Hypodiploidy	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Ph+	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
MLL rearrangement	Yes†	Yes	Yes†	Yes	Yes	Yes	Yes
t(1;19)	No	No	No	No	No	Yes	Yes
iAMP21	No	No	No	No	Yes	No	No
Testicular involvement	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes

(Tomado de Schrappe M et al, 2010)

Important prognostic factors^a and their approximate incidences in childhood ALL.

Factor	Favorable prognostic factors and their approximate incidence (%)	Unfavorable or less favorable prognostic factors and their approximate incidence (%)
Age at diagnosis	≥ 1 and < 10 years (77%)	< 1 year (3%) or ≥ 10 years (20%)
Gender	female (45%)	male (55%)
White blood cell count at diagnosis	< 50,000/ μ l (80%)	≥ 50,000/ μ l (20%)
Immunophenotype	CD10-positive precursor B-cell ALL (83%)	CD10-negative precursor B-cell ALL (4%), T-ALL (13%)
CNS disease ^b	CNS 1 (80%)	CNS 3 (3%), TLP+ (7%)
Genetic features ^c	hyperdiploidy (20%), TEL/AML1 positivity (20%)	hypodiploidy (1%), t(9;22) or BCR/ABL positivity (2%), t(4;11) or MLL/AF4 positivity (2%)
Prednisone response ^d	< 1000/ μ l blood blasts (90%)	≥ 1000/ μ l blood blasts (10%)
Early bone marrow response	< 5% blasts (M1) on day 15 of induction treatment (60%)	≥ 25% blasts (M3) on day 15 of induction treatment (15%)
Remission status after induction therapy in the bone marrow (morphologically assessed)	< 5% blasts (M1) after 4 to 5 weeks of induction treatment (98%)	≥ 5% blasts (M2 or M3) after 4 to 5 weeks of induction therapy (2%)
Minimal residual disease ^e in the bone marrow (molecularly assessed)	< 10 ⁻⁴ blasts after 5 weeks of induction treatment (40%)	≥ 10 ⁻³ blasts after 12 weeks of treatment (induction and consolidation) (10%)

(Tomado de Schrappe M et al, 2010)

II. JUSTIFICACIÓN

Existen marcadores moleculares asociados a buen pronóstico (*TEL-AML1*) y mal pronóstico (*BCR-ABL*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX1*).

Existen pocos estudios de distribución de dichas translocaciones en población Latina y Mexicana. El contar con resultados de la expresión molecular en los niños, logrará identificar pacientes con buen pronóstico y mal pronóstico. Con esto, se podrá pasar de emplear esquemas de tratamiento generalizado a tratamientos individualizados, teniendo en consecuencia menos toxicidad, mejor calidad de vida y mayor probabilidad de curación.

III. HIPOTESIS

Los pacientes con LLA expresan en menor proporción el transcrito TEL-AML1 y en mayor proporción los transcritos BCR-ABL, MLL-AF4 o E2A-PBX en comparación al indicador internacional.

IV. OBJETIVOS

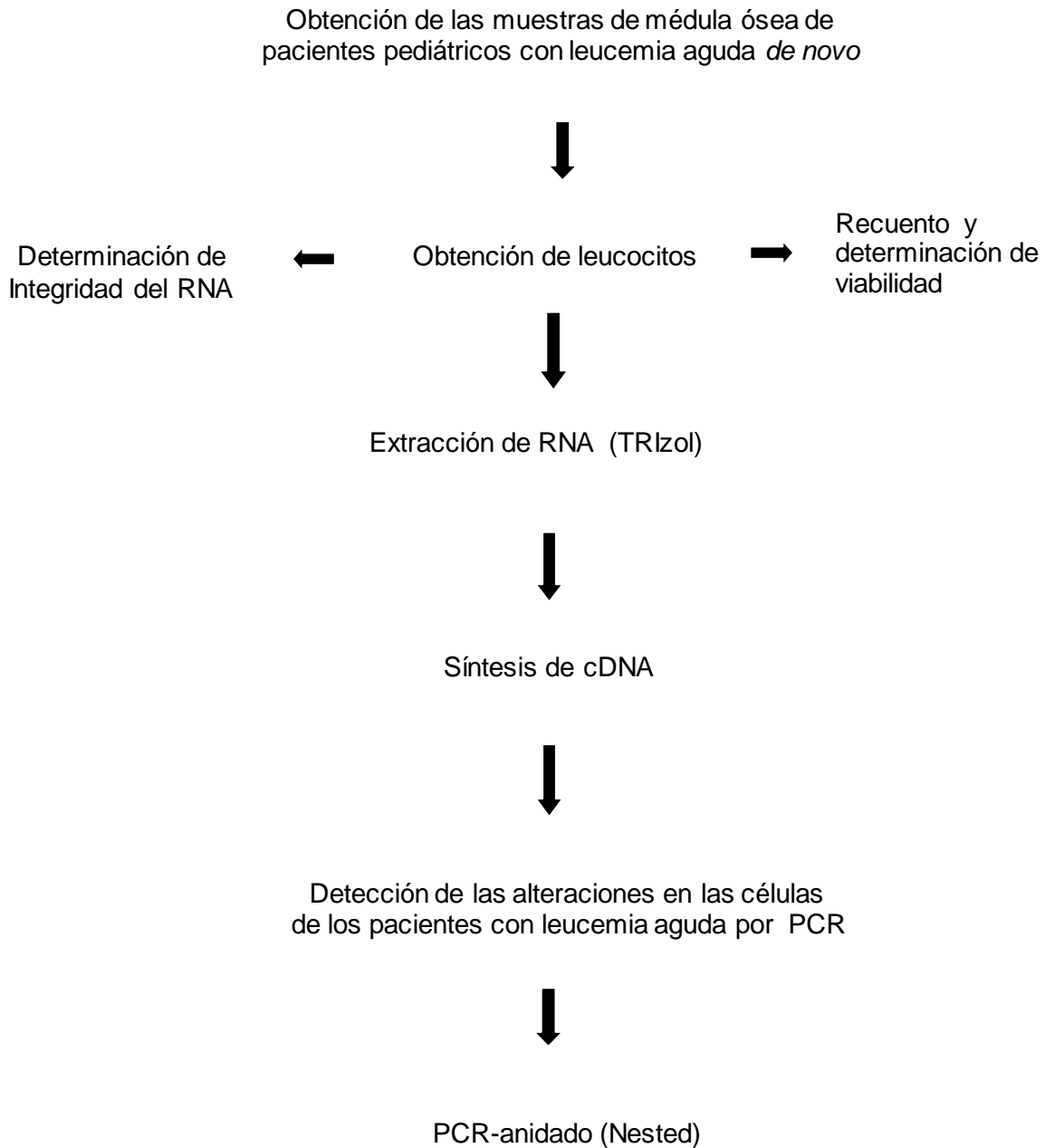
GENERALES:

- Determinar la expresión de los moleculares *TEL-AML1*, *BCR-ABL*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX* en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B de *novo*.

ESPECIFICOS:

- Analizar la expresión de los transcritos *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL* y *E2A-PBX* en niños con leucemia linfoblástica aguda.
- Asociar la expresión de las alteraciones moleculares con la evolución clínica

V. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 SITIO DE ESTUDIO

Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, Laboratorio Citopatología Molecular de la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.2 MUESTRA

Se incluyeron 31 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) *de novo* que ingresaron al Servicio de Oncología del hospital infantil de Morelia "Eva Sámano de López Mateos" en el período de Septiembre del 2011 hasta Octubre del 2012. Los pacientes se distribuyeron en 40% fueron del sexo femenino y el 60% masculino, con edad promedio de 9 años; de los cuales 19 fueron de entre 1 y 10 años y 12 pacientes >10 y <18 años.

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Es un estudio longitudinal, prospectivo y observacional, en un grupo de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de estirpe “B”.

6.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda *de novo* sin tratamiento previo.
- Pacientes menores de 18 años

6.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes cuyo tutor no desee ingresar al protocolo
- Pacientes que no reciban el tratamiento de inducción a la remisión completo
- Leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de estirpe “T” o leucemia aguda bifenotípica
- Abandono anticipado del tratamiento
- Muestras con viabilidad celular menor al 90%

6.4.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que no deseen continuar con el estudio

6.5 PROCEDIMIENTOS

6.5.1 Aspirado de médula ósea

Como parte del diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, se realizó el aspirado de médula ósea (MO) puncionando la espina iliaca postero-superior del lado derecho, empleando la aguja de Hamshidi. El paciente se encontraba bajo anestesia general inhalada con halotano, aplicada por médico anesthesiólogo y acompañado por enfermera del servicio en sala de procedimientos ambulatorios. La toma se realizó en dos partes:

a) Primero se obtuvieron 0.5 mL de muestra en jeringa sin anticoagulante y se realizaron frotis en 5 laminillas, se tiñeron con el colorante de Wright, se

contaron 500 células en el microscopio óptico y se determinó leucemia aguda al encontrar al menos 25% de linfoblastos.

b) Luego se tomaron 3 mL de MO diluidos con anticoagulante EDTA (1/10 parte) para realizar posteriormente el análisis inmunofenotípico y molecular.

6.5.2 Características clínicas

Las características clínicas determinadas como “factores pronósticos” tales como: Edad, Leucocitos al diagnóstico, Infiltración SNC, Respuesta esteroidea, Índice de DNA, CD10, EMR, Inmunofenotipo y Estado actual fueron recabados de los pacientes. Los factores pronósticos correspondientes a los pacientes que resultaron positivos a alguna de las translocaciones se muestran en las tablas 8, 9 y 10.

6.5.3 Lisis de glóbulos rojos

Un mL de muestra de MO se colocó en tubo de 13X100 y se le adicionó solución de lisis de glóbulos rojos en proporción 1:5, se incubó durante 20 min a 4°C y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió con solución de fosfatos (PBS) y centrifugó a 3000 rpm durante 2 min. El botón celular se resuspendió en 1 mL de PBS.

6.5.4 Determinación de viabilidad y cuenta de glóbulos blancos

La cuenta de glóbulos blancos se realizó diluyendo 1:40 en azul tripano al 1% la muestra obtenida de la lisis de glóbulos rojos y empleando la cámara de

Neubauer. La determinación de viabilidad se realizó contando las células teñidas de azul con respecto al total de células analizadas en la cámara de Neubauer. Las muestras con viabilidad superior al 90%, continuaron con el estudio de las translocaciones.

6.5.5 Extracción del RNA

La extracción del ácido ribonucleico (RNA) total se realizó empleando el método Tripure® (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 10^7 leucocitos se colocaron en tubo Eppendorf y se lisaron con 1 mL de Tripure. Se dejó en reposo 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto manualmente. Luego, se mantuvo en reposo 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (capa superior) se transfirió a otro tubo y se añadió 1 mL de isopropanol, se mezcló suavemente, se incubó durante 24 h a -20°C y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 75%, resuspendiéndolo con vortex y centrifugándolo 10,000 rpm durante 5 min a 4°C cada lavado. Al botón de RNA se le eliminó el etanol, decantándolo y dejándolo evaporar durante 10 a 15 min. Finalmente, el RNA se disolvió en 20 μ L de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.5.5.a Cuantificación y determinación de pureza del RNA

El RNA se diluyó 1:50 en agua inyectable y se leyó en espectrofotómetro de UV a una longitud de onda de 260 nm, empleando una cubeta de 1 cm de paso de luz. Una unidad de absorbancia equivale a 40 µg de RNA/mL. El RNA tiene un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas contaminantes absorben a 280 nm. La relación de absorbancia entre 260 nm/280 nm, da una estimación de pureza del RNA. Soluciones de RNA con pureza aceptable presentan valores superiores a 1.7.

6.5.6 Evaluación de la integridad del RNA

Un µg de RNA se mezcló con 2 µL amortiguador de carga 6X 3,3,5,5 - tetrabromofenol sulfonftaleína llevándolo a un volumen final de 10 µL y colocándolo en gel de agarosa al 1%. La muestra se corrió a 80 voltios durante 45 min en buffer de electroforesis TAE (40 mM Tris, 20 mM Acido acético, 1 mM EDTA) Posteriormente el gel se tiñó durante 20 min en baño de bromuro de etidio al 0.01% y se observó en fotodocumentador modelo Chemi-Doc XRS (Biorad, Milan, Italia), empleando el programa *Quantity One Chemi-Doc XRS system* (Biorad, Milan, Italia).

6.5.7 Síntesis de cDNA

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se efectuó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante MuLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). En tubo Eppendorf se colocaron 1 µg de RNA, adicionando agua hasta 9 µL. Después se calentó a 70°C durante 10 minutos y

se puso en hielo. Mientras tanto, se preparó en otro tubo la mezcla de reacción que contenía 5 mM de mezcla de hexámeros al azar, solución amortiguadora 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM desoxinucleótidos trifosfato (dNTP: ATP, GTP,CTP y TTP), 20 U inhibidor de RNasas y 50 U enzima retrotranscriptasa inversa. Después, la mezcla de reacción se agregó al primer tubo hasta obtener un volumen final de 20 µL, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, luego a 42°C durante 45 min, a 99°C durante 5 min y finalmente a 5°C durante 5 min, empleando un termociclador Genius (Techne, Cambridge, UK). El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5.8 Amplificación del gen control

El gen RNase P Humano se utilizó como control de calidad de la muestra. La amplificación se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando sondas tipo Taqman. El fluorocromo que se utilizó fue 6-Carboxifluoresceína (FAM) y como desactivador fluorescente Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) en el equipo LightCycler 480 (Roche, Penzberg, Germany). Los iniciadores y la sonda utilizados se muestran en la tabla 1. El amplificado detectado entre los ciclos 18 a 35, se consideró como muestra adecuada para continuar con la búsqueda de las translocaciones. El amplificado detectado en ciclos mayores a 35, se descartó del estudio.

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores utilizados para amplificación del gen control RNase P

Gen	Oligos (secuencia)	Concentración de trabajo
RNase P 5´	5´ AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3´	40 µM
RNase P 3´	5´ GAG CGG CTG TTC CCA CAA GT 3´	40 µM
RNase P Probe	5´ FAM – TTC TGA CCTA GAA GGC TCT GCG CG – BHQ1 3´	10 µM

El protocolo de la PCR-Tiempo real se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µL conteniendo 6 mM de MgSO₄, 0.4 mM de dNTP´s, 800 nM de los oligos 5´ y 3´, 200 nM de la sonda Taqman, RT/Platinum Taq y se adicionó 1 µg cDNA.

La placa de PCR cargó adicionando los 20 µL de la mezcla de reacción a cada pocillo. Luego, se agregaron 2 µL de cDNA de cada muestra, hasta obtener un volumen final de 25 µL.

Se colocó la placa en el termociclador *LightCycler*® 480 Real-Time PCR System, con las condiciones que se muestra en la Tabla 2

Tabla 2. Condiciones de corrida en el Termociclador en Tiempo Real *LightCycler* 480

Programa de amplificación termociclador <i>LightCycler</i> ® 480				
Programa:	Desnat.	Amplificación		Enfriam.
Análisis	-	Cuantificación		-
Ciclos	1	40		1
Segmento	1	1	2	1
Objetivo	95° C	95° C	55° C	40° C
T.espera (hh:mm:ss)	00:10:00	00:00:15	00:00:30	00:00:30
Rampas	4.4	4.4	2.2	4.4

6.5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se realizó de acuerdo a lo informado por Dongen JJM *et al*, (1999), con algunas modificaciones. En tubo Eppendorf se colocaron solución amortiguadora 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl, 5 mM, 0.2 mM dNTP's, 1.5 U Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems) 2.5 mM MgCl₂, 10 μM oligos A-B para cada translocación (tabla 2), 2 μL de cDNA y agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 20 μL. La amplificación se realizó durante 1 ciclo a 95°C durante 5 min, luego 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min.

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR.

Oligo	Secuencia	Gen fusionado	Tamaño de producto PCR	ISOFORMA
E2A-A	CACCAGCCTCATGCACAAC	E2A/PBX	373 pb / 400 pb	e13-e2
PBX-B	TCGCAGGAGATTCATCACG			
MLL-A	CCGCCTCAGCCACCTAC	MLL/AF4	184 pb-673 pb	A-J
AF4-B	TGTCACTGAGCTGAAGGTC G			
BCR-e1-A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	BCR/ABL	521 pb/ 347 pb	e1-a2 e1-a3a
ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC			
TEL-A	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	TEL/AML1	298 pb/ 259pb	e5-e2 e5-e3
AML1-B	AACGCCTCGCTCATCTTGC			

(Modificado de Dongen JJ *et al*, 1999)

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se colocaron 2 μL de azul de bromofenol y 10 μL de producto

de PCR en el gel de agarosa y se corrió en solución de TAE a 80 voltios durante 1 h. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% y se observó el gel en un fotodocumentador modelo Chemi-Doc XRS system de la marca Biorad (Milan, Italia), empleando el programa *Quantity One Chemi-Doc XRS system*.

6.5.10 PCR Anidado

La PCR se realizó de acuerdo a lo informado por Dongen JJM *et al*, (1999). Las condiciones de reacción, amplificación y corrida en gel de agarosa, fueron iguales a las descritas en la PCR, pero empleando oligos mostrados en la tabla 4. En lugar del cDNA, se tomó 1 µL de producto de PCR de la primera amplificación.

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR anidada.

Oligo	Secuencia	Gen fusionado	Tamaño de producto PCR	ISOFORMA
E2A-C	CACCCTCCCTGACCTGTCT	E2/PBX	289 pb/ 316 pb	e13-e2
PBX-D	GGCCTGCTCGTATTTCTCC			
MLL-C	AGGACCGCCAAGAAAAGA	MML/AF4	127 pb - 616 pb	A-J
AF4-D	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG			
BCR-e1-C	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC	BCR/ABL	381 pb/ 207 pb	e1-a2
ABL-a3-D	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA			e1-a3a
TEL-C	AAGCCCATCAACCTCTCTCATC	TEL/AML1	181 pb/ 142 pb	e5-e2
AML1-D	TGGAAGGCGGCGTGAAGC			e5-e3

(Modificado de Dongen JJ *et al*, 1999)

6.5.11 Secuenciación

Se realizó la cuantificación de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, en comparación a la intensidad de fluorescencia de las bandas generadas con diferentes concentraciones del fago lambda DNA, empleando 10, 20, 30, 40 y 50 µg. Así, nuestros productos se diluyeron a una concentración final de 20 ng/µL y se enviaron a secuenciación a Elim Biopharmaceuticals, Inc.

Se tomaron en forma representativa 7 muestras positivas para alguna de las cuatro translocaciones; cuatro de la *TEL-AML1*, una de *BCR-ABL*, una *MLL-AF4* y una de *E2A-PBX1*. En la tabla 5 se muestran los casos enviados a secuenciar.

Tabla 5: Muestras representativas para secuenciación.

Muestra	Translocación	Tamaño producto de PCR	Oligo
SAKA4/11	12:21	142 pb	TEL-C ^a
SJF7/11	12:21	181 pb	TEL-C ^a
ZPMG34/12	12:21	298 pb	TEL-A
ZPO21/12	12:21	298 pb	TEL-A
BCA47/12	4:11	427 pb	MLL-A
SNF18/11	1:19	373 pb	E2A-A
REFE52/12	9:22	521 pb	BCR-A

a: productos obtenidos en PCR-anidado

VII. RESULTADOS

7.1 DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES

Los pacientes que expresaron el gen fusionado *TEL-AML1*, el promedio de edad fue de 5.3 años, la cuenta de leucocitos fue en promedio 18,235, todos fueron negativos a infiltración de sistema nervioso central (SNC). En la evaluación a respuesta esteroidea solo uno presentó cuenta de blastos mayor a 1000. Todos los pacientes presentaron valores de enfermedad residual menores al 0.01%. Los dos pacientes que fallecieron, se asoció a intoxicación de medicamentos (Tablas 6-8)

Tabla 6. Factores pronóstico de casos positivos para el gen de fusión *TEL-AML1*

	MNAV41/12	CJD9/11	MJCU32/12	ZPO21/12	PSA39/12	SJF7/11	SAKA4/11	ZPMG34/12
Edad	3a6m	4a	13a5m	5a6m	5a	3a11m	11a2m	3a8m
Leucocitos	14300	7360	25000	25200	6536	25600	10800	9570
Infiltración SNC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R. esteroidea	0	1100	0	0	650	90	273	338
Índice de DNA	1.00	1.00	1.00	1	1.10	1.00	1.00	1.00
CD10	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
EMR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Inmunofenotipo		Pre-B				Pre-B		Pre-B
Estado actual	Vivo/ Mantenimiento	Defunción	Vivo/ Mantenimiento	Vivo/ Mantenimiento	Vivo/ Mantenimiento	Vivo/ Recaída	Defunción	Vivo/ Mantenimiento
Causa de muerte		Actividad de la leucemia					Intoxicación metrotexate	

Tabla 7. Factores pronostico de casos positivos para el gen de fusión *E2A-PBX1*

	BJS30/12	SNF18/12
Edad	12a4m	17a1m
Leucocitos	1800	36370
Infiltración SNC	Negativo	Negativo
R. esteroidea	0	660
Índice de DNA	1.0	1.0
CD10	Positivo	Positivo
EMR	0.00	0.00
Estado actual	Vivo/M	Vivo/M
Inmunofenotipo		Pre-B

Tabla 8. Factores pronóstico de casos positivos para el gen de fusión *MLL-AF4*

	CRYJ35/12	TBCD41/12	BCA47/12
Edad	13a7m	5a	12 ^a
Leucocitos	1270	50000	291600
Infiltración SNC	Negativo	Negativo	Negativo
R. esteroidea	0	0	
Índice de DNA	1.0	1.0	
CD10	Positivo	Negativo	Negativo
EMR	0.00	0.00	0.00
Estado actual	Vivo/Mantenimiento	Vivo/Mantenimiento	Vivo/Mantenimiento
Inmunofenotipo	B Temprana		

7.2 CALIDAD DEL RNA

Las muestras de RNA de los pacientes que se incluyeron, presentaron buena calidad, la cual se evaluó por su pureza, es decir, la relación entre las concentraciones de ARN: Proteína, que tuvo valores mayores a 1.7 y su integridad que mostró aproximadamente una relación de 2:1 entre las intensidades de las bandas 28S y 18S y la visualización de la banda 5S (Fig. 1) Las muestras que no cumplieron estas condiciones fueron excluidas del estudio.

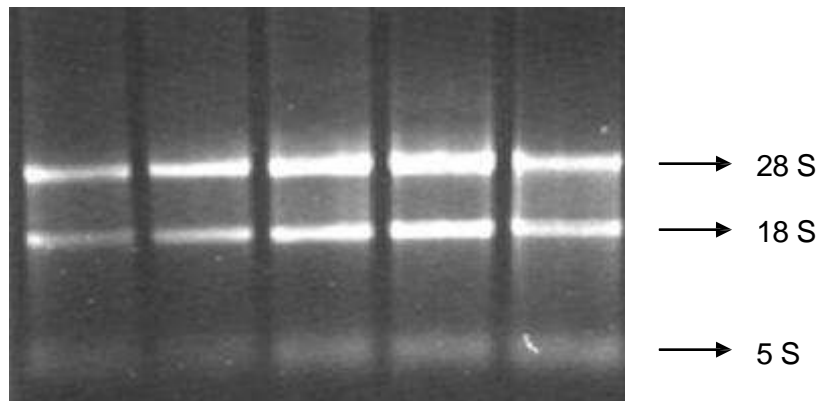


Fig 1. Análisis electroforético de la integridad del ARN de los pacientes. Se colocó 1 µg de cada muestra en gel de agarosa al 1%, corridos a 100 volts durante 45 min, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

7.3 ANÁLISIS DEL GEN CONTROL

De las 31 muestras analizadas con la RT-PCR para la amplificación del gen control RNase P, en 4 casos no se amplificó, por lo que se descartaron y se continuó con los 28 casos que si amplificaron.

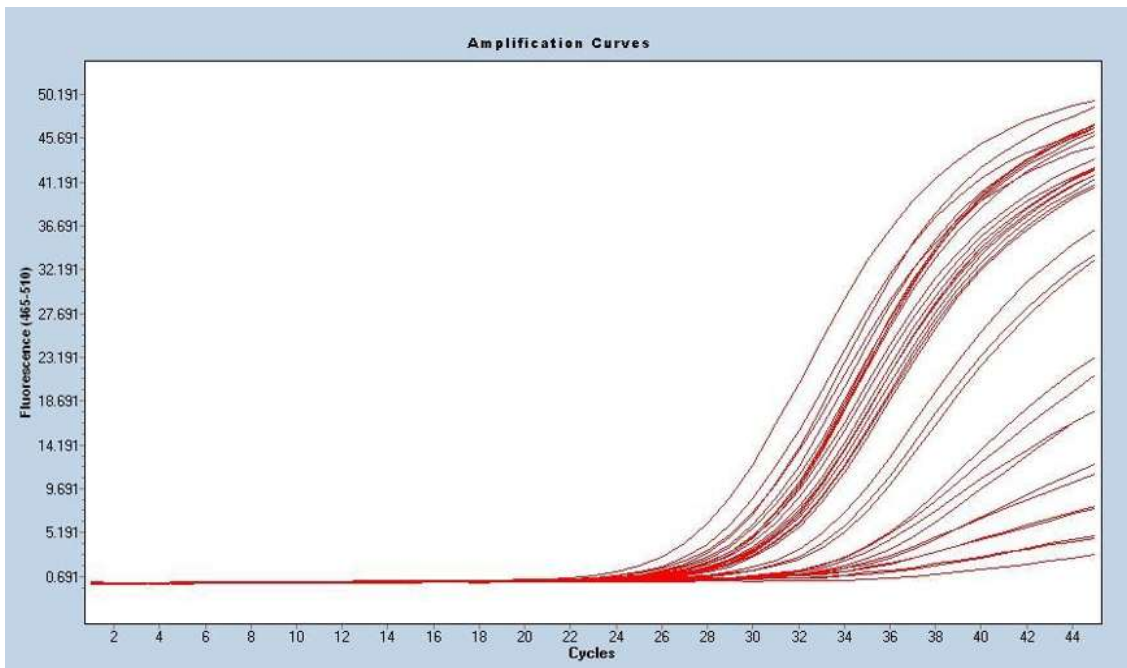


Fig 2. Curva de amplificación por PCR Tiempo Real para el gen control RNasa P.

7.4 ANÁLISIS DE LAS TRANSLOCACIONES

7.4.1 TEL-AML1

El gen de fusión *TEL-AML1* se detectó en 3 casos al analizar por PCR y al someter los casos negativos a PCR-anidado, se encontraron 5 casos más, obteniendo por tanto 8 casos positivos (Figura 2, Tabla 6).

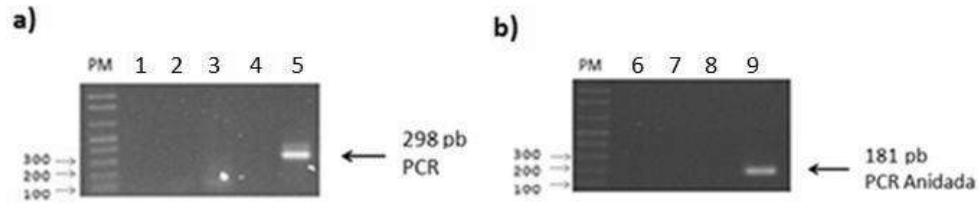


Fig 3. Expresión del gen TEL-AML1. Carriles 2, 3, 4, 7 y 8: Muestras negativas. Carril 5 y 9: gen TEL-AML1 (298 y 181 pb, productos de amplificación de PCR y PCR-Anidado, respectivamente). Carril 1 y 6: control negativo. PM: marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron en las condiciones de la figura 1.

7.4.2 E2A-PBX1

El gen de fusión *E2A-PBX1* se detectó en un caso mediante PCR y otro caso más se detectó al amplificar con PCR-anidado, obteniendo en total 2 casos positivos (Figura 4, Tabla 7).

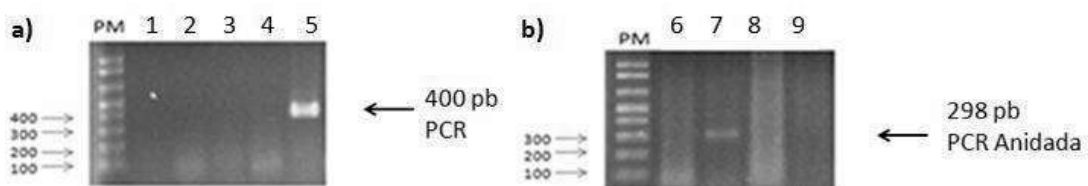


Fig 4. Expresión del gen E2A-PBX1. Carriles 2, 3, 4, 6 y 8: Muestras negativas. Carril 5 y 7: gen E2A-PBX1 (400 y 298 pb, productos de amplificación de PCR y PCR-Anidado, respectivamente). Carril 1 y 9: control negativo. PM: marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron en las condiciones de la figura 1.

7.4.3 *MLL-AF4*

El gen de fusión *MLL-AF4* se detectó en dos casos al analizarse por PCR y al someter los casos negativos a PCR-anidado, se encontró otro caso más, obteniendo en total 3 casos positivos (Figura 5, Tabla 8).

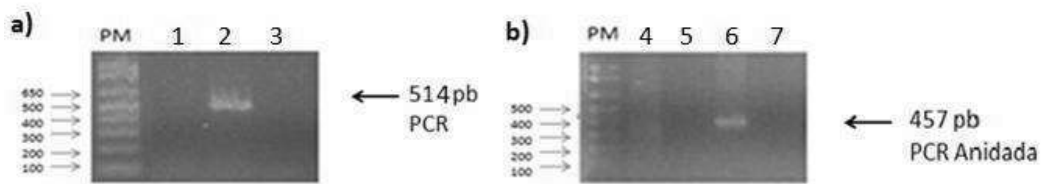


Fig 5. Expresión del gen *MLL-AF4*. Carriles 3, 4 y 5: Muestras negativas. Carril 2 y 6: gen *MLL-AF4* (514 y 457 pb, productos de amplificación de PCR y PCR-Anidado, respectivamente). Carril 1 y 7: control negativo. PM: marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron en las condiciones de la figura 1.

7.4.4 *BCR-ABL*

El gen de fusión *BCR-ABL* no se encontró en ninguno de los casos analizados con PCR ni con PCR-anidado (Figura 6a y 6b). En una muestra positiva para el gen de fusión *BCR-ABL* p190 de un paciente con leucemia aguda mieloide, se realizó la amplificación con los reactivos utilizados en el presente estudio y se logró amplificar el gen fusionado. En la figura 6c se muestra el caso utilizado como control positivo.

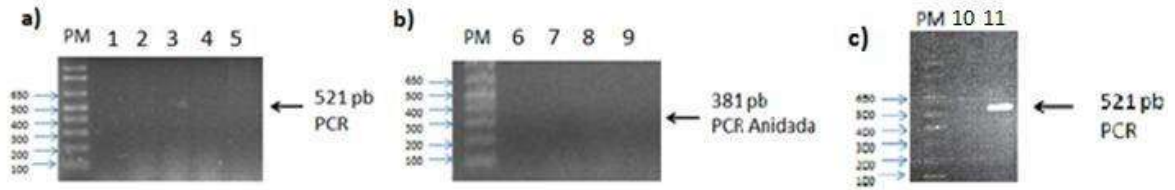


Fig 6. Expresión del gen BCR-ABL. Carriles 2,3,4,5,7,8 y 9: Muestras negativas. Carril 11: gen BCR-ABL (521 producto de amplificación de PCR). Carril 1,6 y 10: control negativo. PM: marcador de peso molecular. Las muestras se corrieron en las condiciones de la figura 1.

En la figura 7 y en la tabla 9, se muestra el resumen de los casos positivos encontrados en el presente estudio.

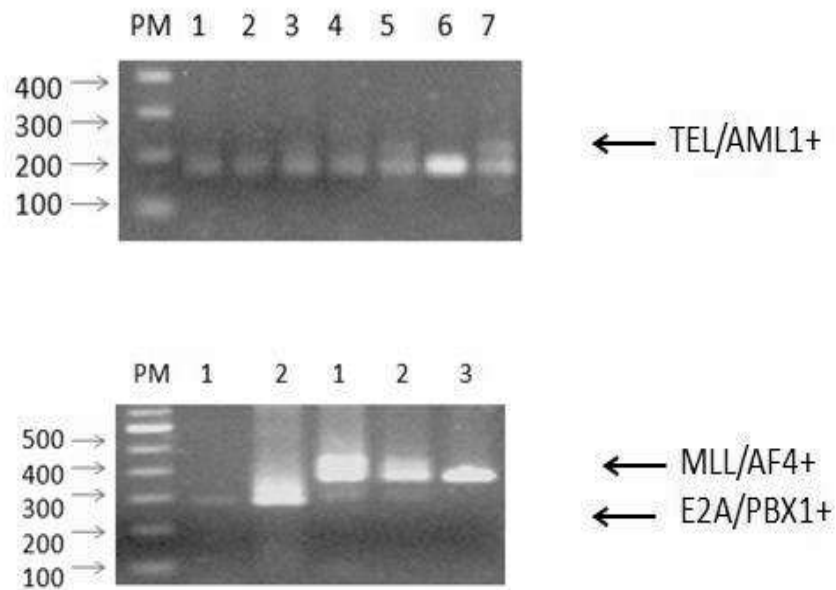


Fig 7. Geles de agarosa donde se observa todos los casos positivos para los diferentes genes de fusión.

Tabla 9. Frecuencia de los genes de fusión en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.

	<i>TEL-AML1(+)</i>	<i>MLL-AF4(+)</i>	<i>E2A-PBX1(+)</i>	<i>BCR-ABL(+)</i>
Detectados por PCR	3	2	1	0
Detectados por PCR Anidada	5	1	1	0
Total de casos	8	3	2	0
	28.5%	10.7%	7.14%	0%

7.5 SECUENCIACIÓN

Se compararon las bandas de las muestras con las bandas de las diferentes concentraciones del fago lambda para determinar tanto la cantidad como la calidad del ADN a secuenciar.

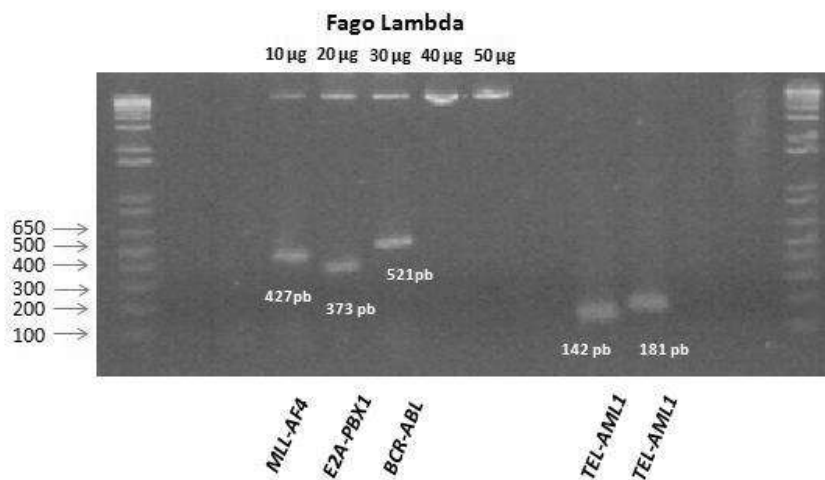


Fig 8. Gel de agarosa determinación de concentración. En la parte superior hay diferentes concentraciones del fago lambda y en la parte inferior muestras positivas para las 4 diferentes translocaciones.

Al realizar el alineamiento de las secuencias con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), todas estas coincidieron con un 98-100% de identidad al compararlo con la base de datos en línea del NCBI.

Tabla 10. Alineamiento de secuencias

Muestra	Translocación	Descripción	Cobertura	Identidad	N° Acceso
SAKA4/11	TEL-AML1	Homo sapiens ets variant6 (ETV6), mRNA (TEL)	59%	100%	NM_001987.4
		Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant 3, mRNA (AML1)	43%	100%	NM_001122607.1
SJF7/11	TEL-AML1	Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant 1, Mrna (AML1)	62%	99%	NM_001754.4
		Homo sapiens ets variant6 (ETV6), mRNA (TEL)	40%	100%	NM_001987.4
ZPMG34/12	TEL-AML1	Homo sapiens ets variant6 (ETV6), mRNA (TEL)	52%	100%	NM_001987.4
		Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant 1, mRNA (AML1)	48%	98%	NM_001754.4
ZPO21/12	TEL-AML1	Homo sapiens ets variant6 (ETV6), mRNA (TEL)	55%	100%	NM_001987.4
		Homo sapiens runt-related transcription factor 1 (RUNX1), transcript variant 1, mRNA (AML1)	45%	100%	NM_001754.4
BCA47/12	MLL-AF4	Homo sapiens AF4/FMR2 family, member 1 (AFF1), transcript variant 1, mRNA	73%	100%	NM_001166693.1
		Homo sapiens myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithoraxhomolog, Drosophila) (MLL), transcript variant 2, mRNA	23%	100%	NM_005933.3
SNF18/11	E2A-PBX1	Homo sapiens pre-B-cell leukemia homeobox 1 (PBX1), transcript variant 3, mRNA	92%	100%	NM_001204963.1
REFE52/12	BCR-ABL	Homo sapiens breakpoint cluster region (BCR), transcript variant 2, mRNA	50%	100%	NM_021574.2
		Homo sapiens c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (ABL1), transcript variant a, mRNA	50%	100%	NM_005157.4

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tablas de contingencia para buscar asociación entre las características clínicas y la expresión de las translocaciones. Se encontró asociación entre el CD10 y las translocaciones ($p= 0.031$); observando que el CD10 negativo se asoció más con *MLL-AF4*, mientras que CD10 positivo y los que no presentan genes fusionados, seguido de *E2A-PBX1* y finalmente con *TEL-AML1* (Tablas 11 y 12)

Tabla 11. Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8.890 ^a	3	.031
Razón de verosimilitudes	9.494	3	.023
Asociación lineal por lineal	2.880	1	.090
N de casos válidos	28		

Tabla 12. Tabla de contingencia

			TRASLOCACION				Total
			t(4:11)	t (12:21)	t (1:19)	sin traslocacion	
CD 10	POSITIVO	Recuento	0	6	2	12	20
		% del total	.0%	21.4%	7.1%	42.9%	71.4%
		Residuos corregidos	-2.9	.3	.9	1.1	
	NEGATIVO	Recuento	3	2	0	3	8
		% del total	10.7%	7.1%	.0%	10.7%	28.6%
		Residuos corregidos	2.9	-.3	-.9	-1.1	
Total	Recuento	3	8	2	15	28	
	% del total	10.7%	28.6%	7.1%	53.6%	100.0%	

VIII. DISCUSIÓN

La correcta identificación molecular de las alteraciones cromosómicas es necesaria tanto para una evaluación pronóstica como para diseñar la asignación del tratamiento óptimo.⁴¹

Se realizó una detección de los genes de fusión BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4 y TEL-AML1 en un grupo de 28 pacientes pediátricos con LLA mediante análisis RT-PCR. Donde se identificaron ocho portadores de gen de fusión TEL-AML1 (28.5%) en contraste con el trabajo realizado en México por Jiménez -Morales y col, que reportan una frecuencia del 13.5%.⁴¹ Sin embargo 28.5 % de frecuencia es similar a lo que se reporta en Estados Unidos, Europa, República Checa, Turquía, Australia y Japón con un rango de 18% a 33%. Así como lo reportado por un estudio realizado en Argentina por Artigas y col. con un 23%.⁴²

El gen de fusión E2A-PBX1 mostró una frecuencia del 7.14% en nuestra población estudiada lo cual difiere de reportado en la literatura internacional¹³, sin embargo otro estudio realizado en México describe una de las mayores tasas de prevalencia en el mundo (11,5%) descritos hasta ahora para el gen quimérico E2A-PBX1.⁴¹ El gen de fusión MLL-AF4 relacionado a mal pronóstico se encontró con una frecuencia del 10.5% lo cual coincide con lo reportado en un estudio realizado por Alonso y col en Argentina (10.5%),⁴³ esta frecuencia esta elevada con respecto a lo reportado en la literatura internacional, dentro de este grupo se encontró una fuerte asociación entre el CD10 negativo y el

gen de fusión MLL-AF4. El CD10 esta asociado con buena respuesta al tratamiento. Lo cual sugiere la mala respuesta al tratamiento en los pacientes que tienen este tipo de alteración.¹³

Para el gen de fusión BCR-ABL no se encontró ningún caso positivo, es posible que sea por la baja frecuencia con la que esta alteración se presenta, así como por la cantidad de pacientes estudiados.

IX. CONCLUSIÓN

La frecuencia de TEL-AML1 en nuestro estudio coincide con lo reportado internacionalmente mientras que los marcadores de mal pronóstico como el MLL-AF4 y E2A-PBX1 se encuentran con alta frecuencia en comparación con lo reportado internacionalmente. Ningún caso presento más de dos alteraciones moleculares, solo expresaron una.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Beutler E, Litchman M, Coller B. (1995): Williams Hematology. 5ª Edición. McGraw-Hill, Inc., New York.1995; pp 1141-1143.
2. Catovsky D., Sultan C. and Bennett J. (1977). Classification of Acute Leukemia. *Ann. Inter. Med.*, 87: 740– 753
3. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, et al. 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13:1901-1928.
4. Alario A J y Birnkrant J D. Guía práctica para la asistencia del paciente pediátrico. 2010. Elsevier, España 2º edición
5. Rivera L. R. Protocolos técnicos, cáncer en niños. 2010. Editores de textos mexicanos SA de CV México, DF. pp 1-7
6. Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* 2002. 2:283-7. Review
7. Partow. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003; 15(4): 597-621.
8. Beutler E, Litchman M, Coller B.(1995): Williams Hematology. 5ª Edición. McGraw-Hill, Inc., New York.1995; pp 1141-1143.
9. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia.*Nat Rev Cancer* 2002. 2:502-13. Review
10. Greaves M. Pre-natal origins of childhood leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2003. 7:233-45. Review.
11. Vincent H.J. Classification systems for acute and chronic leukaemias. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2003; 16 (4):561–582
12. Hematología Clínica, J. Sans-Sabrafen, C. Besses Raebel, J. L. Vives Corrons 5º edición, Elsevier España, 2006

13. Ching-Hon Pui. Treatment of acute leukemias. Humana Press, Totowa New Jersey, 2003
14. Jiménez-Arce G., Carrillo J, Chaves M., Jiménez R., Vargas M. , Campos L., de la Guardia L., Valverde B. Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. Rev. Biol. Trop. 2008. 56 (4): 1613-1618
15. Nathan D, Oski F. Hematology of infancy and childhood. 5ed. Philadelphia: WB. Saunders Company; 1998. p.245-85.
16. Rossig C, Juergens H. Aetiology of childhood acute leukaemias: current status of knowledge. Radiat Prot Dosimetry 2008. 132:114-118
17. Mejia-Arangure JM, Ortega-Alvarez MC, Fajardo-Gutierrez A. Epidemiology of leukemias in children. Part 2. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2005. 43:401-9.
18. Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, Sibut V, Mottier S, Ly Sunnaram B, Henry C, Monnier A, Berthou C, Le Gall E, Le Treut A, Schmitt C, Le Gall JY, Mosser J, Galibert MD. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/AML1-positive leukemia. BMC Genomics 2007. 8:385.
19. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffe M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 1995. 86:4263-4269.
20. Manola KN, Georgakakos VN, Margaritis D, Stavropoulou C, Panos C, Kotsianidis I, Pantelias GE, Sambani C. Disruption of the ETV6 gene as a consequence of a rare translocation (12;12)(p13;q13) in treatment-induced acute myeloid leukemia after breast cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2008. 180:37-42.
21. Odero MD, Carlson K, Calasanz MJ, Lahortiga I, Chinwalla V, Rowley JD. Identification of new translocations involving ETV6 in hematologic malignancies by fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. Genes Chromosomes Cancer 2001. 31:134–42.

22. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med* 2004. 351:533–42.
23. Slany RK. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematol Oncol* 2005. 23:1-9. Review.
24. Marschalek R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J* 2010. 277:1822-31.
25. Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther.* 2009 8:1204-11
26. Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 2004. 24:4275-83. Review.
27. Bohlander SK. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005. 3:162-74.
28. Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Hirai H, Ogawa S and Kurokawa M. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004. 10:299–304.
29. Gowney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR, Speck NA and Gilliland DG. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* 2005. 106: 494–504.
30. Sun W and Downing JR. Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood* 2004. 104: 3565–72
31. Kitabayashi I, Tokoyama A, Shimazu K and Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* 1998. 17:2994–3004.

32. Levanon D, Goldstein R, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, Paroush Z and Groner Y. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl* 1998. 95:11590–95.
33. Fenrick R, Amann J, Lutterbach B, Wang L, Westendorf J, Downing J and Hiebert S. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* 1999. 19:6566–74.
34. Kim H, Gillis LC, Jarvis JD, Yang S, Huang K, Der S, Barber DL. Tyrosine kinase chromosomal translocations mediate distinct and overlapping gene regulation events. *BMC Cancer* 2011. 11: 528.
35. Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, Carroll AJ, Crist W, Link MP, Cleary ML. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. 1991. *Blood*. 77: 324-330
36. Wiemels JL, Leonard BC, Wang Y, Segal MR, Hunger SP, Smith MT, Crouse V, Ma X, Buffler PA, Pine SR. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *PNAS*. 23 (99):15101–15106
37. Green NC, Rambaldi I, Teakles J, Featherstone MS. A Conserved C-terminal Domain in PBX Increases DNA Binding by the PBX Homeodomain and Is Not a Primary Site of Contact for the YPWM Motif of HOXA1. 1998. *The journal of biological chemistry*. 273(27):13273–13279.
38. Kamps, M. P., Look, A. T., Baltimore, D. The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. 1991. *Genes Dev*. 5: 358–68
39. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, & Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 14 (3): 281-91, 1996.
40. Schrappe M. Stanulla M. Silverman L.B. Harrison C. van Dongen JJM. Van der Velden VHJ. Pieters R. Baruchel A. Hunger S. Izraeli S.

Mullighan C. Look AT. Henza G. SIOP. Education Book 2010, The Netherlands.

41. Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta S, Saldaña-Alvarez Y, Perez-Vera P, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, Velázquez-Cruz, Ramírez-Bello J, Carnevale A, Orozco L. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: Prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. 2008. *Leukemia Research* 32: 1518–1522
42. Artigas A CG, Cabrera C ME, Melo A A, Páez F E, Arriagada M M, Astete A C, Roa E I, Roa S JC. Frequency of TEL/AML1 and BCR/ABL fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia. 2006. *Rev Med Chil.* 134(11):1367-76
43. Alonso CN, Gallego MS, Rossi JG, Medina A, Rubio PL, Bernasconi AR, Zubizarreta PA, Felice MS. RT-PCR diagnosis of recurrent rearrangements in pediatric acute lymphoblastic leukemia in Argentina. 2012. *Leuk Res.* 36(6):704-8.

XI. ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____, identificado con _____ En representación legal de _____ manifiesto haber sido informado sobre el objetivo de la recolección de una muestra de sangre o de medula ósea (tomada durante los procedimientos de medula ósea (MO) programados dentro del protocolo) para evaluar probables marcadores de enfermedad residual no evidente con los exámenes usuales como las biopsias y citologías de medula ósea y hemogramas realizados durante el tratamiento.

Las muestras tienen como fin ser evaluadas para unos marcadores que buscan evaluar si hay enfermedad leucémica residual no evidente con los estudios que se hacen a la fecha.

Dado que de los resultados de esta búsqueda aún no sabemos su real utilidad y lo que pretendemos es aclarar si los hallazgos tienen o no relación con el comportamiento futuro de la enfermedad, por ahora estos resultados no serán tenidos en cuenta sino que se verificarán al final del tratamiento buscando si se asociaron a eventos como, recaída o persistencia de enfermedad.

Seré informado de los resultados en el momento en que yo lo solicite, también podré solicitar información adicional de la evolución del conocimiento y su impacto en estos resultados, podré rehusarme a autorizar que se lleven a cabo los estudios en las muestras posteriores, estos procedimientos no representarán riesgo adicional dado que se realizarán en el mismo tiempo anestésico de la quimioterapia intratecal programada dentro de su protocolo de tratamiento. No se tomarán biopsias de médula ósea ni estudios adicionales con miras a realizar única y exclusivamente estos marcadores.

Podré retirar mi consentimiento para continuar con esta evaluación en el momento que lo considere pertinente.

Los resultados de esta evaluación no tendrán por ahora ningún impacto sobre el tratamiento propuesto a mi hijo.

No habrá perjuicio para el paciente en caso de retirar mi consentimiento para continuar con esta evaluación.

En constancia de lo anterior y sin dudas o aclaraciones adicionales firmo:

DR ELOY PEREZ RIVERA

En calidad de testigo

DR PRIMO CRUZ BORJA

En calidad de testigo

Anexo 2

Hoja de recolección de datos en pacientes con LLA

1) Al diagnóstico

Fecha de ingreso			No. de registro	
Nombre			Afiliación	
Sexo		Edad	Observaciones:	

Antecedentes:

AHF.- Neoplasias hematológicas				
No hematológicas				
APNP.- Originario			Residente	
Ocupación		Nivel socioeconómico		
Urbano/rural	Escolaridad			
Mielotóxicos	benceno	solventes	pesticidas	
electromagnéticos	radiaciones	Quimioterapia		
Otros:				
APP.- Crónicos degenerativos:				
Nefropatías		DM	HAS	Cardiológicos
Neuropatía		Hepatopatías	Hepatopatía	
		OTROS		
PERINATALES				
Peso		Talla		
SDG		Patologías del producto		
Patologías de la madre		Patologías del padre		
Madre toxicomanías		Padre toxicomanías		

Síntomas al diagnóstico:

Tiempo de evolución del padecimiento:				
Astenia	Adinamia	Pérdida de peso		Hiporexia
Cefalea	Mialgias	Altralgias	Dolor óseo	
Disnea	Infecciones	Sangrados		
Otros:				

Exámen físico al diagnóstico:

Adenopatías	Palidez	Sangrados	Púrpura
Hepatomegalia	cm	Esplenomegalia	cm
Fiebre	Infecciones	Dolor óseo	
Infiltración extramedular			
Peso	Karnofsky		
Otros:			

UMSNH

(Al diagnóstico)

BH	Q.S	Serología			
Hb	Gluc.	VHB			
Hto	Urea	VHC			
VCM	Creat.	VIH			
HCM					
Leuc					
Neutr					
Linf	Alb: PT				
Basof	BT				
Eos	BD				
Mono	BI				
Blastos	DHL				
Coagulación	K				
Plaq	Ca				
	P				
	AC.Urico				
	LCR				

2. En cada toma de muestra para evaluar Enfermedad Residual

Médula osea		Inmunofenotipo						Cariotipo	
Morf.	%	Ac.	%	IMF	Ac.	%	IMF		No. copias
Eritro		CD2			CD79				
Prom		CD3			TdT				
Mielo		CD5			MPO				
Metami		CD7			Glif A				
Bandas		CD10			HLA				
Seg		CD11			Ig M				
Eos		CD13			C. kap				
Bas		CD14			C. Lam				
Linf		CD15			Indice DNA				
Mono		CD19						Reacc Citoquim	
Plasm		CD20							%
Blastos		CD21						Perox	
Megas		CD22						PAS	
Celular		CD33			Cariotipo			Sudan negro	
Infil		CD34						Esterasa	
Clasif. FAB		CD38						NaF	
		CD41							
		CD71							

ESTUDIOS DE IMAGEN									
Rx tórax									
Otros									
ASPIRADO DE MEDULA OSEA									
Cantidad de blastos	Día +15			Día +35					
ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA									
Vincristina	D+7		D+14		D+21		D+28		
Daunorubicina	D+7		D+14						
Asparaginasa	D+8	D+10	D+12	D+15	D+17	D+19	D+22	D+24	D+26
Esteroides	Inicio			Termino					
COMPLICACIONES									
Fecha	Eventualidad								