



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

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

Memoria de tesis:

"Genes de fusión como marcador molecular para el estudio de la enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda".

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

Química Farmacobióloga
Daniela Alvarado Coria

Dirección de tesis:
Doctor en Ciencias Químico Biológicas
Sergio Gutiérrez Castellanos

Maestro en Ciencias de la Salud
Eloy Pérez Rivera



Morelia, Michoacán,
México
2017.

COMITÉ TUTORAL

Director de Tesis

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Sergio Gutiérrez Castellanos

Codirector de tesis

Maestro en Ciencias de la Salud

Eloy Pérez Rivera

Doctora en ciencias Biológicas

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctora en Ciencias Químico Biológicas

Martha Eva Viveros Sandoval

Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Carlos Cortes Penagos

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE CUADROS	II
ABREVIATURAS.....	III
I. MARCO TEORICO.....	1
HEMATOPOYESIS.....	1
LEUCEMIA.....	2
EPIDEMIOLOGIA	4
TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	6
RESPUESTA AL TRATAMIENTO	8
ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL (EMR)	10
GENES DE FUSIÓN IMPLICADOS EN LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.....	11
RT-PCR SEMICUANTITATIVA.....	13
PCR ANIDADA	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:.....	17
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. HIPOTESIS.....	19
VI. OBJETIVOS.....	20
a) General.....	20
b) Específicos.....	20
VII. MATERIALES Y METODOS	21
1. Diseño del estudio.....	21
2. Universo de trabajo.....	21
3. Esquema de trabajo	21
4. Descripción de las variables	22
5. Selección de los pacientes.....	24
6. Procedimientos	26
VIII RESULTADOS	30
Objetivo a).....	30
Objetivo b).....	33
Objetivo c)	35
IX. DISCUSIÓN.....	39
X. CONCLUSIONES	43

XI. PERSPECTIVAS	44
XII ANEXOS	45
ANEXO 1.- Carta de consentimiento informado.	45
XIII. BIBLIOGRAFIA.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de maduración y diferenciación de la célula madre hematopoyética.....	1
Figura 2. Modelo de leucemogénesis.....	3
Figura 3. Tipo de leucemias en menores de 20 años. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud 2005-2010.....	4
Figura 4. Tipo de leucemias en menores de 20 años, según el grupo de edad. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud 2005-2010.....	5
Figura 5. Relación entre células blasticas residuales y la respuesta al tratamiento.....	10
Figura 6. Gen de fusión ETV6/RUNX1.....	13
Figura 7. Curva de amplificación BCR/ABL de la línea celular K562.....	29
Figura 8. Análisis de RNA.....	30
Figura 9. Expresión del gen control ABL.....	31
Figura 10. Expresión del gen de fusión ETV6/RUNX1.....	32
Figura 11. Evaluación de oligos.....	33
Figura 12. Muestras positivas al gen ETV6/RUNX1.....	33
Figura 13. Análisis de muestras post-inducción.....	34
Figura 14. Estimación de Kaplan Meier para la función de supervivencia de pacientes con LLA.....	37

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de las variables.....	22
Cuadro 2. Relación de intensidad de muestras al diagnóstico y muestras postinducción.....	35
Cuadro 3. Análisis estadístico de variables hematológicas.....	36
Cuadro 4. Frecuencia de casos por edad/riesgo y decesos/riesgo.....	38
Cuadro 5. Frecuencia de inmunofenotipo.....	38

ABREVIATURAS

BCR-ABL.....	Breakpoint cluster región/Abelson
CCG	Children´s Cancer Group
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
DNA	Acido desoxirribonucleico
ETV6/RUNX1.....	E-Twenty-Six Variante 6/Runt Related Transcription Factor 1
EMR.....	Enfermedad Mínima Residual
HGR1M.....	Hospital General Regional No 1 de Morelia
HIM.....	Hospital Infantil de Morelia
IR	Inducción a la Remisión
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B.....	Leucemia Linfoblástica Aguda de estirpe B
LMA.....	Leucemia Mieloblástica Aguda
MLL-AF4.....	Mixed Lineage Leukemia/ALL1-Fused Gene From Chromosome 4 Protein
mL.....	mililitros
mRNA.....	Ácido Ribonucleico mensajero
nm	nanómetros
pb.....	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RQ	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RC.....	Remisión completa
RP.....	Remisión parcial
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa
s.....	Segundos
s.....	Subunidad de RNA
SG.....	Supervivencia Global
SLE.....	Supervivencia Libre de Enfermedad
SNC.....	Sistema Nervioso Central
TCF3-PBX1.....	Transcription factor 3/Pre B Leukemia Homeobox 1
UA.....	Unidades Arbitrarias
U/μL.....	Unidades por microlitro
μL.....	Microlitros
°C.....	Grados Centígrados

GENES DE FUSIÓN COMO MARCADOR PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

RESUMEN

La leucemia es la segunda causa de muerte en la población infantil. La tasa de supervivencia a 5 años es de hasta 90% en países desarrollados. Sin embargo, más del 20% de los niños recaen y fallecen. Por lo anterior se introdujo la evaluación de la enfermedad mínima residual (EMR), que representa el factor pronóstico más importante en los pacientes con LLA para evaluar la respuesta al tratamiento y estratificar protocolos de tratamiento de manera individual. Alrededor del 30% de pacientes con LLA presenta el gen de fusión *ETV6/RUNX1*. El objetivo general de este trabajo fue determinar la expresión del gen de fusión *ETV6/RUNX1* en pacientes al diagnóstico y después del tratamiento. Se incluyeron 18 pacientes con LLA pediátricos a los que se tomaron muestras de sangre periférica o médula ósea, se aisló RNA de los leucocitos por el método de Tripure® y se analizó el gen de fusión *ETV6/RUNX1* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa (RT-PCR). **Resultados:** Nueve pacientes (50%) expresaron el gen de fusión *ETV6/RUNX1* al diagnóstico, de los cuales 4 (44.4%) fallecieron en las primeras etapas del tratamiento. El análisis de los pacientes *ETV6/RUNX1* positivos durante el tratamiento, mostró que 2 de los 4 pacientes evaluados aún presentaron la translocación. La expresión densitométrica del gen de fusión al diagnóstico mostró una menor intensidad con respecto al análisis post inducción en dos de los casos analizados que dieron como resultado 2.683UA y 3.634UA respectivamente; los dos casos restantes resultaron negativos a la expresión de *ETV6/RUNX1*. Al comparar las variables clínicas del diagnóstico contra las del término de inducción a la remisión, mostraron diferencia en la cuenta de leucocitos ($p=0.013$), blastos ($p=0.003$), plaquetas ($p=0.002$) y ácido úrico ($p=0.009$). La supervivencia del grupo de pacientes que expresaron *ETV6/RUNX1* no fue estadísticamente significativa ($P = 0.134$) respecto al grupo de pacientes que no expresaron el gen, pero si mostró una supervivencia global estimada corta de 237.9 días en comparación a otros estudios reportados. **Conclusión:** Las variables hematológicas no están relacionadas con la EMR ya que no existe diferencia entre los grupos *ETV6/RUNX1* positivo y *ETV6/RUNX1* negativo.

Palabras Clave: EMR, Genes de fusión, LLA, Respuesta al tratamiento, *ETV6/RUNX1*

**. FUSION GENES AS A MARKER OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS**

ABSTRACT

Leukemia is the second leading cause of death in children. The 5-year survival rate is up to 90% in developed countries. However, more than 20% of children relapse and die. Minimal residual disease (MRD) assessment represents the most important prognostic factor in ALL patients, was introduced to assess response to treatment and to stratify treatment protocols individually. Approximately 30% of patients with ALL present the ETV6/RUNX1 fusion gene. The aim of this work was to analyze the expression of the ETV6/RUNX1 fusion gene in patients at diagnosis and after treatment. Eighteen pediatric patients with ALL were included both peripheral blood or bone marrow samples were taken, RNA was isolated from the leukocytes by the Tripure® method and the ETV6/RUNX1 fusion gene was analyzed by the polymerase chain reaction coupled to reverse transcription (RT-PCR). **Results:** Nine patients (50%) expressed the ETV6/RUNX1 fusion gene at diagnosis, of which 4 (44.4%) died in the early stages of treatment. The analysis of ETV6/RUNX1 positive patients during treatment showed that out of 2 of the 4 patients evaluated still had the translocation. The densitometric expression of the fusion gene at diagnosis showed a lower intensity with respect to post-induction analysis in two of the analyzed cases which resulted in 2.683AU and 3.634AU, respectively. The remaining two cases were negative to ETV6/RUNX1 expression. When comparing clinical variables at diagnosis vs posttreatment, it showed a significant difference at the general level in total leukocytes ($p=0.013$), percentage of blasts ($p=0.003$), platelet ($p=0.002$) and uric acid value ($p=0.009$). Survival did not show a significantly difference outcome between the ETV6/RUNX1 positive group versus negative group ($P=0.134$), but showed an estimated short overall survival of 237.9 days compared to other reported studies. **Conclusion:** Hematological variables are not related to EMR as there is no difference between the ETV6 / RUNX1 positive and ETV6 / RUNX1 negative groups

I. MARCO TEORICO

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es un proceso continuo en el cual las células sanguíneas (eritrocitos, linfocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariocitos y monocitos) son producidas desde un progenitor común pluripotencial denominado célula madre hematopoyética.^{1,2}

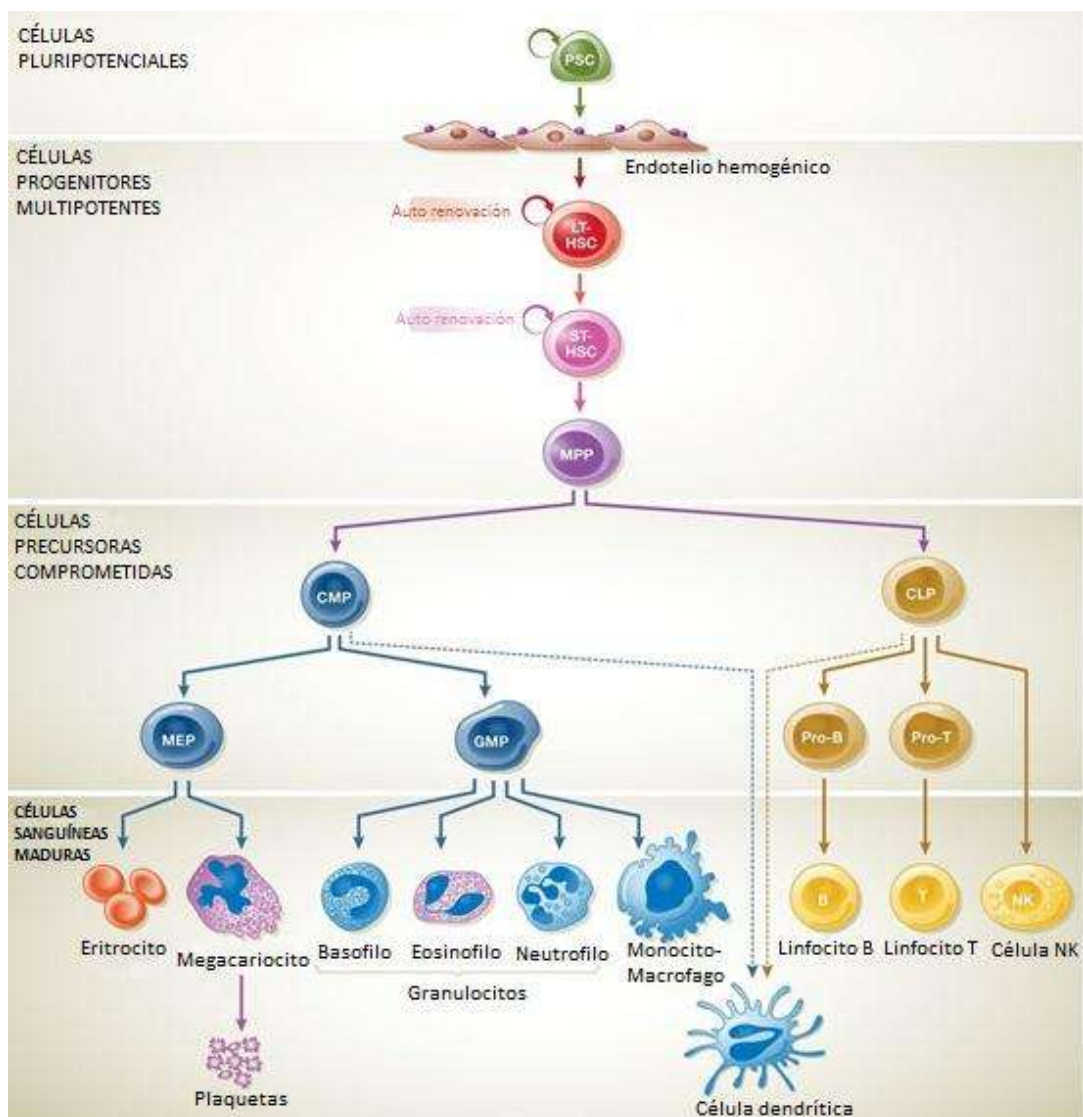


Figura 1. Etapas de diferenciación y maduración de la célula madre hematopoyética. La célula madre hematopoyética multipotente tiene capacidad autoreplicativa y de diferenciación, dando lugar a células pluripotenciales comprometidas a linaje mieloide o linfocitoide y respectivamente progresa hacia las células hemáticas maduras. (Tomado de Ackermann y col.²).

Desde el nacimiento y durante el resto de la vida, éste proceso es llevado a cabo en la médula ósea; tejido especializado compuesto de una intrincada red de células denominada estroma, donde sus productos regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras (figura 1).¹

La producción de células hematopoyéticas maduras implica una serie de cambios inducidos por señales externas (factores de crecimiento, citocinas, hormonas, entre otros) que actúan de forma activa en la célula madre hematopoyética. Estas interacciones contribuyen a la supervivencia, auto renovación, proliferación, diferenciación, quiescencia y migración de las células madre hematopoyéticas y su progenie, por lo que la alteración de la hematopoyesis puede conducir a diversas patologías de origen hematológico.^{1,2,3}

LEUCEMIA

La leucemia es una enfermedad que implica la proliferación clonal maligna en la que una célula progenitora hematopoyética sufre una alteración genética que condiciona su expansión, crecimiento descontrolado, desplazamiento de la hematopoyesis normal e invasión de la médula ósea, con capacidad de diseminación a sangre periférica, bazo, ganglios y el resto de los tejidos^{4,5,6}. Las leucemias agudas se clasifican en mieloblásticas (LMA) y linfoblásticas (LLA); dependiendo de sus características morfológicas, citoquímicas, patrón inmunofenotípico y citogenético, moleculares y clínicas, se establece un subtipo de leucemia.^{1,7} Dentro de las linfoblásticas se subclasifican en linaje B o T^{8,9}.

Fisiopatológicamente la leucemia es compleja, generalmente los signos y síntomas son un reflejo de la falla medular condicionada por la invasión de las células leucémicas, entre los que se presentan habitualmente: anemia, trombocitopenia, hemorragia, neutropenia, fiebre, dolor óseo y artralgias, entre otros. El origen de la leucemia no está determinado, pero se sabe intervienen factores ambientales, genéticos e inmunológicos.

Los genes alterados presentes en la leucemia pueden ser el resultado de recombinación anormal cromosómica, (translocación, inversión), pérdida de material genético (delección), ganancia de material genético (duplicación, inserción), presencia de copias adicionales de ciertos cromosomas (hiperdiploidía). Las alteraciones anteriores favorecen la activación progresiva de oncogenes de las células afectadas, estos oncogenes codifican proteínas que controlan la proliferación de las células, la apoptosis, la evasión de la respuesta inmune, entre otros, lo cual provee a la célula hematopoyética los mecanismos necesarios para su constante división y evasión de la muerte (Figura 2).^{10,11}

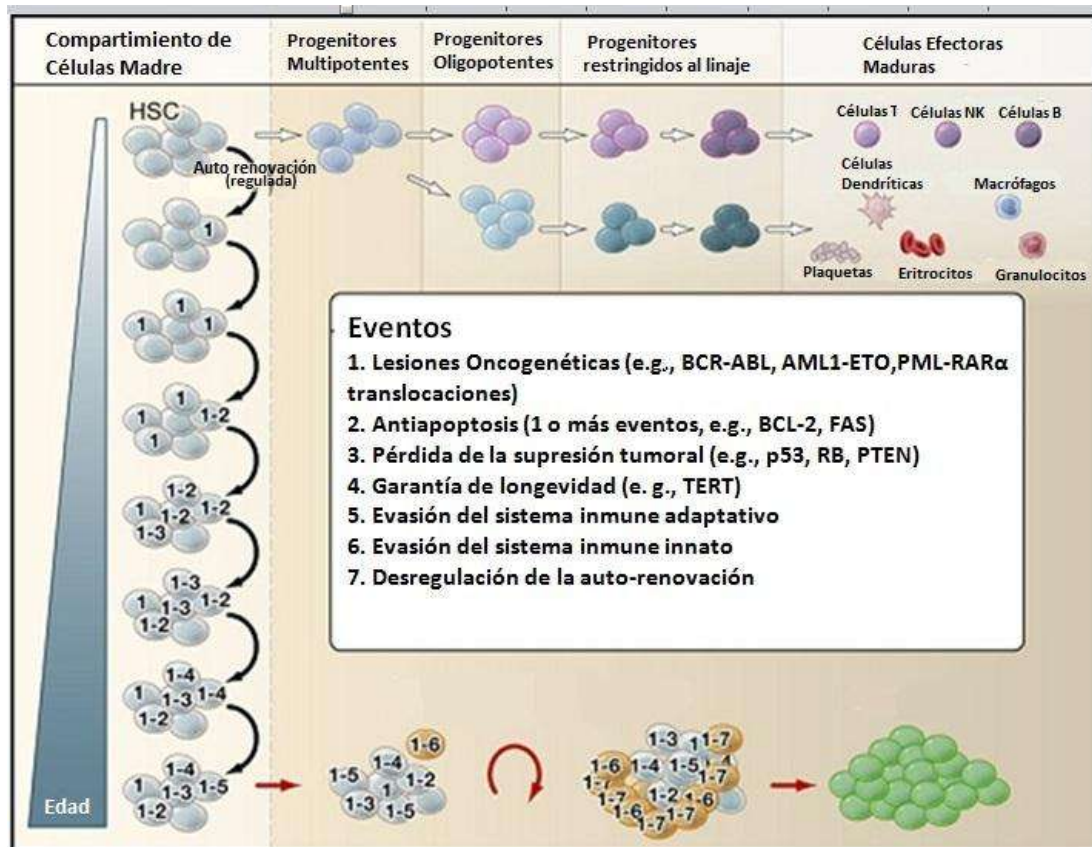


Figura 2. Modelo de leucemogénesis. En este modelo, las células multipotenciales hematopoyéticas sirven como el reservorio para la acumulación de los acontecimientos genéticos y epigenéticos que conducen a la crisis blástica, eventualmente a la leucemia. (Tomado de Rossi y col.³)

EPIDEMIOLOGIA

En México la leucemia representa un problema de salud importante, se estima que aproximadamente cada año 7,000 niños adquieren la enfermedad (incidencia de 7.1 casos /100 000 habitantes) y sumado a la prevalencia, hacen que un aproximado de 18,000 niños y adolescentes requieran atención oncológica anualmente. Registros disponibles del 2011 indicaron que la leucemia aguda es el tipo de cáncer más frecuente en menores de 15 años, representando el 30- 40% de las neoplasias a nivel nacional. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) fue la más frecuente (81.3%) respecto a otros tipos de leucemia, también representa la mayor causa de mortalidad con una tasa de 1.8 según las estadísticas nacionales del 2010. Los registros indicaron que la enfermedad afectó en mayor grado al sexo masculino en un 54% respecto al sexo femenino que suma un 46% y se observó un porcentaje mayor en el grupo de edad de 10 a 14 años. (Figuras 3 y 4)¹².

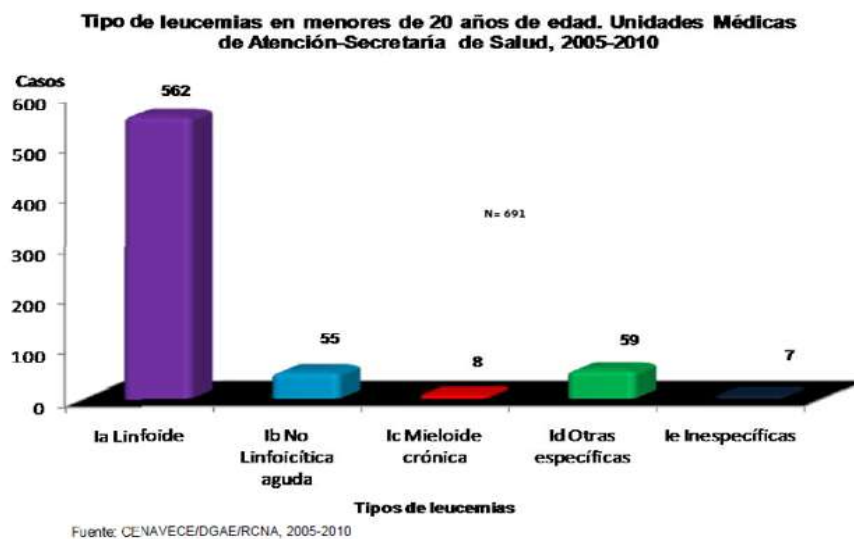
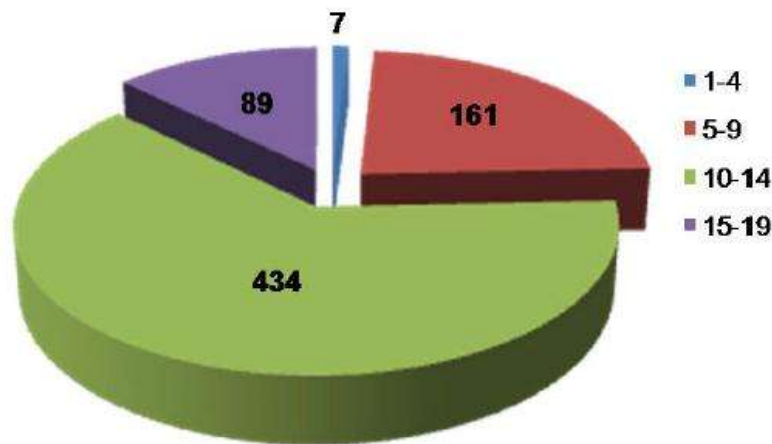


Figura 3 Tipo de leucemias en menores de 20 años de edad. Unidades Médicas de Atención-Secretaría de salud. Distribución de casos por tipo de leucemia, las barras indican el número de casos acumulados en el periodo de 2005-2010. (Tomado de Fernández-Cantón y col.¹²)

Tipo de leucemias en menores de 20 años, según grupo de edad. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud, 2005 - 2010



Fuente: CENAVECE/DGE/RCNA, 2005-2010

Figura 4. Tipo de leucemias en menores de 20 años, según el grupo de edad. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud, 2005-2010. Distribución de grupos de edad en pacientes pediátricos con leucemia. (Tomado de Fernández-Cantón y col.¹²)

En los últimos años, la terapéutica ha mejorado alcanzando tasas de supervivencia a 5 años sin recurrencia de hasta 70%. Sin embargo, pese a los esfuerzos, hasta el 20% de los niños recaen y fallecen; no obstante, los sobrevivientes presentan serios problemas de salud por los efectos adversos del tratamiento.¹³ Por tal motivo, se pretende mantener a los pacientes en un estado de la enfermedad controlada sin actividad leucémica, denominado remisión, la cual se clasifica en parcial y completa, dependiendo de las características clínicas y hematológicas del paciente.¹⁴

En pacientes con leucemia aguda, la definición actual de remisión se basa en la identificación de células leucémicas en médula ósea mediante análisis morfológico. Este método es subjetivo y carece de sensibilidad: las células malignas deben representar al menos entre 1 y 5% de la población celular de la médula ósea. Aunque con los tratamientos contemporáneos se logra obtener una remisión morfológica en la mayoría de los pacientes, una proporción importante de pacientes presenta células leucémicas indetectables que son las responsables de provocar la recaída de la leucemia y conducir a la muerte.^{15, 16}

El principio del manejo clínico actual en los pacientes con LLA consiste en que la intensidad del tratamiento debe ser de acuerdo a la agresividad de la enfermedad, para lo cual se deben determinar cuáles son los factores pronóstico de riesgo a recaída de mayor sensibilidad e introducirlos al protocolo de tratamiento.¹⁷

Los pacientes pediátricos con LLA pueden ser clasificados en tres grupos de riesgo: alto, moderado y bajo, determinados por las características etiológicas, clínicas y de laboratorio entre los que se encuentran la edad, sexo, raza, cantidad de glóbulos blancos, morfología celular, inmunofenotipo, citogenética y la respuesta al tratamiento de inducción a la remisión.¹⁸

TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

El tratamiento incluye quimioterapia administrada durante 2 o 3 años y radioterapia en casos de alto riesgo. El esquema de quimioterapia se divide de la forma siguiente:

Inducción a la remisión. Es la etapa inicial del tratamiento de los pacientes de nuevo diagnóstico sin infiltración en sistema nervioso central (SNC) o enfermedad extramedular. Durante esta etapa la quimioterapia puede llegar a reducir hasta en un 99% las células leucémicas por lo que al terminar la mayoría de pacientes no presentan un recuento detectable de células blásticas. La respuesta al tratamiento al día 28 de tratamiento es determinante en el pronóstico de los pacientes. Los resultados evidencian que los pacientes clasificados en alto riesgo requieren intervención con quimioterapia intensificada antes de la inducción a la remisión y posterior a la fase de consolidación. La combinación dual de vincristina y un glucocorticoide (prednisona y prednisolona son los más usados para este propósito) inducen la remisión de aproximadamente el 85% de los casos de LLA pediátrica y en adición con L-asparaginasa este radio de remisión puede incrementarse hasta el 95% de los casos.

Debido a las probabilidades de que ocurra un incremento en la toxicidad cuando se añade una antraciclina a una terapia de inducción de 3 fármacos, la mayoría de los centros tratan a sus pacientes promedio o de bajo riesgo con prednisona/dexametasona, vincristina y L-asparaginasa y reservan el uso de los regímenes de inducción que usan 4 o más agentes para paciente de mayor riesgo. La falla terapéutica de esta fase es un evento relativamente raro ya que ocurre en menos del 5% de los casos de LLA tratados. Una terapia de inducción fallida ocurre cuando los pacientes muestran signos de leucemia residual al finalizar la terapia de inducción en el aspirado de médula ósea; al día 28 o 36 dependiendo del protocolo instaurado. En general, los pacientes lograrán una remisión completa en las primeras 4 semanas. Los pacientes que requieren más de 4 semanas para lograr una remisión tienen un precario pronóstico. El resultado también es menos favorable para los pacientes que muestran más del 25% de blastos en la médula ósea o blastos persistentes en la sangre periférica después de 1 semana de terapia de inducción intensiva. Los protocolos del Children's Cancer Group (CCG) basan su decisión de tratamiento en la respuesta de la médula ósea en el séptimo día (para protocolos de alto riesgo) o en la respuesta de la médula ósea en el catorceavo día (para protocolos de riesgo promedio).^{18, 19, 20}

Terapia de posinducción (después de lograr la remisión completa) que consta de:

Terapia de consolidación o intensificación. Esta etapa de duración entre 1 a 2 meses es subsecuente a la etapa de inducción a la remisión e indispensable para prevenir recaídas en los primeros dos meses. Existe evidencia de que sin la administración de este tipo de terapia son altas las probabilidades de que las células leucémicas que persisten (EMR) desencadenen mecanismos de resistencia farmacológica favoreciendo recaídas severas. La intensificación podría constar con el uso de metotrexato intermedio o de alta dosis, el uso de fármacos similares a los usados para lograr la remisión, el uso de combinaciones diferentes de fármacos de resistencia cruzada poco conocida hacia la combinación de fármacos utilizada en la terapia de inducción, el uso extendido de altas dosis de L- asparaginasa, o combinaciones.^{18, 21}

Terapia de mantenimiento o continua. Constituye el periodo de administración inmediata que se suministra posterior a la fase de inducción a la remisión y forma parte de todos los protocolos de manejo de LLA, especialmente para pacientes de alto riesgo. El uso de metrotexate y mercaptopurina es el tipo de quimioterapia más común en los protocolos de manejo, este factor es importante en la quimioterapia de mantenimiento. La administración de estas drogas debe ser ajustada para mantener la cuenta de leucocitos menor a 3000 y la cuenta de neutrófilos entre 500 y 1500. La quimioterapia de mantenimiento generalmente continúa hasta los 2 o 3 años de remisión completa continua. El extender la duración de la terapia de mantenimiento a 5 años, no mejora los resultados.^{18, 22}

El paciente con leucemia al inicio cuenta con una carga leucémica aproximada de 1×10^{12} células, que al término de la inducción a la remisión (IR) se espera disminuya a 1×10^9 . Tradicionalmente el empleo del análisis morfológico de frotis de médula ósea y sangre periférica durante 1 a 3 semanas desde el diagnóstico se usa para predecir el riesgo a recaída, pero ésta determinación puede ser errónea debido a las similitudes morfológicas entre los blastos leucémicos y precursores linfoides en el análisis de médula ósea y con linfocitos maduros en sangre periférica, por lo que pese a su utilidad y aplicabilidad resulta subjetivo, poco sensible e impreciso, en estudios de respuesta al tratamiento tempranos.^{17, 23}

RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Con excepción de la quimioterapia adyuvante, en la que no se advierte la presencia de células leucémicas, la eficacia de la quimioterapia se mide en términos de la "respuesta al tratamiento" por la reducción de la carga leucémica conforme progresa el tratamiento. Para su determinación se usan pruebas con diferente nivel de sensibilidad (Figura 5).

Independientemente de la prueba utilizada (ya sea análisis de sangre periférica, recuento de células o prueba de marcadores tumorales), ésta se realiza en intervalos específicos, de manera que sea posible comparar los resultados con pruebas anteriores del mismo paciente.²⁴

La respuesta al tratamiento en la leucemia se clasifica de varias maneras.^{24, 25}

- **Respuesta hematológica:** Una respuesta hematológica completa se da cuando las células de leucemia han alcanzado niveles indetectables según su hemograma completo. El paciente presenta recuentos de glóbulos blancos y plaquetas vuelven a niveles normales y no se detectan células inmaduras.
- **Respuesta citogenética:** Detecta la cantidad de células blásticas en función de las alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas. La respuesta citogenética completa se logra cuando la afección cromosómica no es detectable.
- **Respuesta molecular:** Detecta la presencia y/o cantidad de transcritos del gen alterado expresados por células blásticas. Una respuesta molecular completa significa que no se detectan transcritos del gen alterado.

La respuesta al tratamiento se evalúa por la obtención de Remisión Completa (RC), supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia Global (SG).

Remisión completa: se define como la regresión de todos los síntomas y signos, la desaparición de toda evidencia hematológica de enfermedad con menos del 5% de células leucémicas y la restauración de la función normal de la MO con recuperación de las series eritrocítica, granulocítica ($>1 \times 10^9/L$ neutrófilos en sangre periférica) y megacariocítica ($>100 \times 10^9/L$ de plaquetas en sangre periférica).²⁴

Remisión Parcial (RP): se define como la persistencia de blastos entre 5 y 15% en la MO y la progresión de la enfermedad por la persistencia o empeoramiento de la enfermedad, a pesar del tratamiento.²⁴

Recaída: se define como la reaparición de blastos en sangre periférica con evidencia de más de 5% de blastos en la MO o extramedular (infiltración del SNC o testicular).

Supervivencia Libre de Enfermedad: se determina partiendo desde el momento de alcanzar la RC hasta la aparición de cualquier evidencia de actividad leucémica medular o extramedular.²⁴

Supervivencia Global: se estima desde el diagnóstico hasta la muerte o la última observación.²⁴

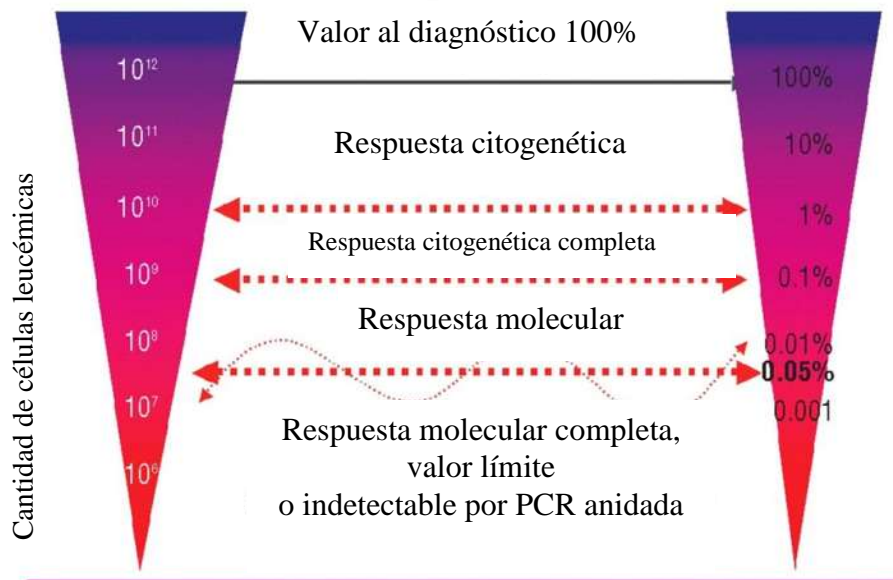


Figura 5. Relación entre células blásticas residuales y la respuesta al Tratamiento. Tomado de Baccanari y col.²⁵

ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL (EMR)

La EMR se define como la presencia de células leucémicas mayor al 0.01% en médula ósea o sangre periférica, es decir, son aquellas células blásticas tumorales que permanecen después del tratamiento quimioterapéutico o del trasplante de progenitores hematopoyéticos. El nivel de EMR en médula ósea representa el factor pronóstico más importante en los pacientes con LLA por lo que pudiera utilizarse para adaptar y estratificar los protocolos de tratamiento en cada paciente.²⁶

La determinación de la EMR centraliza varios puntos que la hacen de mucha utilidad, entre ellos se encuentran: 1) La definición de riesgo a recaída por EMR es más preciso que por clínica y justifica la intensificación necesaria en el tratamiento en casos de alto riesgo. 2) La depuración rápida de EMR define una cohorte más grande de bajo riesgo que por métodos convencionales. 3) Permite pronosticar la evolución de la enfermedad de acuerdo al índice de EMR que presente.²⁷

La detección de EMR en forma periódica es determinante en el manejo de la leucemia durante su tratamiento; inclusive, al término de la inducción a la remisión identifica pacientes con buen o mal pronóstico dependiendo de los niveles de EMR.²⁷ Por ejemplo, la detección de EMR durante la fase inicial del tratamiento en niños con leucemia linfoblástica aguda, permitió una mejor estratificación de los pacientes en grupos de riesgo comparado con la estratificación clásica basado solamente en aspectos clínicos y biológicos de la LLA. Con base en estos datos, la detección de EMR está siendo implementada rutinariamente en los protocolos de tratamiento y está aumentando su aplicación como guía de la terapia o para la evaluación de nuevos tratamientos.^{28, 29}

La detección de la enfermedad mínima residual durante la terapia de niños con LLA, comienza a tomar mayor importancia que los factores de riesgo usualmente empleados al diagnóstico, pues su presencia al término de inducción a la remisión, se ha asociado a menor supervivencia libre de enfermedad y menor tasa de curación.

Para que sea útil la determinación de la EMR, se necesita de métodos con alta sensibilidad de detección como la citometría de flujo multiparamétrica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales presentan una capacidad de detección entre 10^{-4} y 10^{-5} , respectivamente; es decir logran identificar una célula tumoral entre 10 mil o 100 mil células normales.

GENES DE FUSIÓN IMPLICADOS EN LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

En la LLA entre el 60% y 75% de los pacientes presentan anormalidades genéticas numéricas (ploidías) o estructurales como translocaciones cromosómicas que llevan a la formación de genes de fusión, lo que implica la alteración en la regulación de oncogenes, genes supresores de tumor y micro RNA que resultan en la activación oncogénica de proteínas cinasas y factores de transcripción; éstos y múltiples factores adyacentes, promueven la aparición de células malignas.^{30, 31} Las translocaciones más frecuentes en la LLA infantil de estirpe B son los genes de fusión *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL TCF3/PBX1*, y los rearrreglos genéticos del *MLL*.^{30, 32}

ETV6/RUNX1.

La translocación t(12;21) (p13;q22) genera la fusión del gen **TEL (ETV6)** del cromosoma 12 y el gen **AML1 (RUNX1)** del cromosoma 21 (Figura 6). El gen *ETV6* tiene la capacidad de inhibir la actividad normal de transcripción del gen **AML1** involucrado en la proliferación y diferenciación normal de las células hematopoyéticas. El gen de fusión *ETV6/RUNX1* se encuentra en aproximadamente el 25% de los casos de LLA, siendo la más común en pacientes pediátricos de entre 2 y 5 años de edad; está biológicamente caracterizado por una larga remisión completa, con buena respuesta al tratamiento inicial y una excelente supervivencia libre de enfermedad.^{30, 32, 33, 34}

La proteína quimérica TEL-AML1 (*ETV6/RUNX1*) consiste en las secuencias TEL situadas en el extremo amino terminal del dominio terminal de unión a DNA (DBT) del factor de transcripción ETS (E-Twenty-Six) y en todas las regiones funcionales conocidas de ETV6, incluyendo su dominio de unión al DNA (DBD) RUNT. El ETV6-RUNX1 es estructuralmente distinta de otras proteínas de fusión ETV6 como las presentes en la leucemia mieloide, que retienen sólo el dominio RUNT de amino-terminal y no las secuencias reguladoras C-terminales de AML1. Los puntos de corte se dispersan a través de los 12 kb del intrón 5 de ETV6 y a 100 kb del intrón 1 en RUNX1.

Estadísticamente, existe cierto grado de microcluster o sitios definidos de ruptura³⁵, pero de manera crítica, las células leucémicas de cada paciente con el gen *ETV6/RUNX1* tienen puntos de ruptura únicos o clonotípicos que se extienden por toda la zona intrónica entre los exones 5 y 6 del gen *ETV6*. Existe evidencia de que el gen de fusión *ETV6/RUNX1* se encuentra en la etapa embrionaria y este puede estar relacionado con la expansión clonal temprana en la denominada preleucemia, pero es insuficiente para la aparición de la LLA.³⁶

El intervalo postnatal prolongado, o latencia, antes del diagnóstico de la enfermedad puede ser de hasta una década o más, esto sugiere que se requieren eventos genéticos adicionales o secundarios y complementarios para la aparición de la clona leucémica.³⁶

Genes de fusión como marcador molecular para el estudio de la enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda

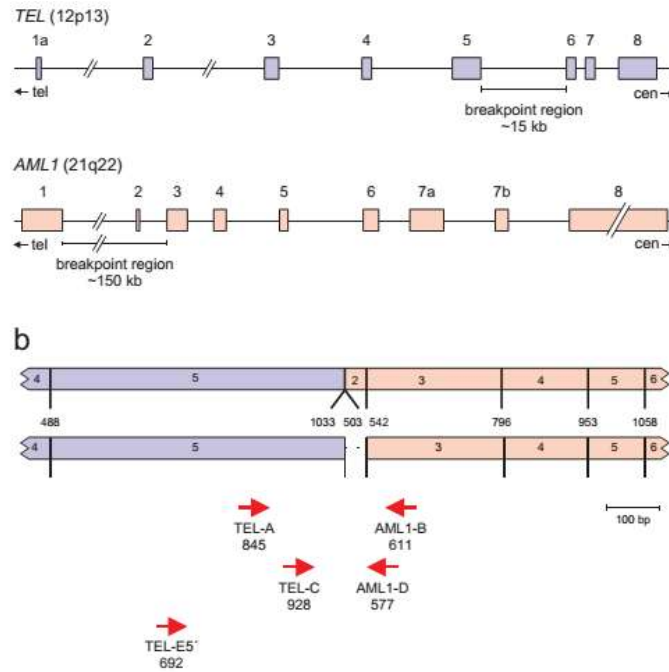


Figura 6. Gen de Fusión *ETV6/RUNX1*. Representación esquemática de los intrones y exones del gen *ETV6/RUNX1*. Se muestran los puntos de corte implicados en la t(1; 19)(q23;p13)(a) y sus dos posibles isoformas (b) Las flechas rojas indican los puntos de unión de oligonucleótidos y el sentido que toman en la cadena de DNA. (Tomado de Van Dongen y col.³⁷)

RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Las técnicas de biología molecular permiten identificar regiones del material genético y su producto o expresión (mRNA) que han llevado al conocimiento de la función de éstos genes y las patologías que puede producir dada la afección de dichas regiones. Una de las técnicas útiles en la identificación de secuencias genéticas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que alcanza una sensibilidad de 1×10^{-4} hasta 1×10^{-6} .³⁸⁻⁴⁰

Una variante de la PCR, la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa reversa (RT-PCR), es un método altamente sensible y específico útil para la detección de transcritos alterados o para el análisis de muestras disponibles en cantidades limitantes. Esta técnica emplea los transcritos de mRNA (RNA mensajero) seleccionados por acción de oligonucleótidos diseñados específicamente a la secuencia blanco y la enzima transcriptasa inversa genera una secuencia de DNA complementaria (cDNA), posteriormente se amplifica mediante la PCR convencional.^{41,42} El análisis semicuantitativo refiere a que la expresión del transcrito estudiado es detectado cualitativamente en una PCR de punto final, para posteriormente determinar el nivel de expresión por la intensidad de la banda presente en la electroforesis por análisis densitométrico, asumiendo que la aparición de una banda indica que el material contenido sobrepasa la etapa logarítmica de la amplificación; es necesario contar con un gen de expresión constante (housekeeping) y tomarlo como referencia.⁴¹

En la mayoría de los casos, cuando se requiere un análisis de genes alterados, un estudio cualitativo no es suficiente para ofrecer una respuesta satisfactoria y el análisis cuantitativo no siempre se encuentra al alcance tecnológico y económico de las instituciones. Si bien la reproducibilidad de las técnicas moleculares es un requisito esencial, la exactitud extrema no es posible; en la mayoría de los estudios el enfoque no es medir los cambios de menor importancia o la cantidad exacta de moléculas, pero sí un aumento en sus niveles de expresión, es por eso que pese a la mayor precisión de las técnicas desarrolladas recientemente, el método semicuantitativo es apropiado y ampliamente utilizado para muchos propósitos.⁴³

La cuantificación de EMR por RT-PCR en las leucemias agudas, emplea marcadores moleculares específicos de genes fusionados en los diferentes subtipos de leucemia, generados principalmente por translocaciones cromosómicas, los cuales son transcritos a moléculas de RNA mensajero que son similares entre los pacientes a pesar de que los puntos de ruptura sean diferentes a nivel del DNA.

De esta manera, la cuantificación se puede aplicar entre el 35 y 45% de los pacientes con LLA. Entre los transcritos de los genes fusionados que se emplean como blancos en la LLA - B se encuentran *BCR-ABL*, *TCF3/PBX1*, *ETV6/RUNX1* y *E2A-PBX1*.⁴⁴

Recientemente, se ha demostrado que la detección de EMR mediante PCR cuantitativa (PCR-RQ) provee información pronóstica independiente para la estratificación del tratamiento en la leucemia.²⁹ En 70% de niños con LLA de riesgo alto que presentaron EMR positivo, se asociaron a la recaída de la enfermedad.¹⁶ Pacientes con LLA positivos a EMR al término de inducción a la remisión, correlacionaron con el incremento de riesgo de recaída entre 3 a 5 meses después del tratamiento.⁴⁵

La expresión del transcrito *BCR-ABL* [t(9;22), cromosoma Filadelfia] en las LLA es un factor de pronóstico pobre e independiente, que limita el alcance de la remisión hematológica completa y la supervivencia libre de enfermedad. Por ello, un tratamiento alternativo es el trasplante de progenitores hematopoyéticos y por consiguiente, la detección de *BCR-ABL* por PCR, representa el método de elección para el estudio de la EMR.^{38, 46}

PCR ANIDADA

La PCR anidada conocida como PCR Nested es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de DNA más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica.⁴²

El aumento en la sensibilidad y especificidad de esta técnica es útil en la confirmación de casos negativos de EMR por el método RT-PCR convencional o de punto final.^{47, 48}

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa alrededor del 75% de las neoplasias hematológicas malignas en menores de edad. Para el diagnóstico de la LLA, se requieren estudios de laboratorio de rutina y especializados, como la citometría de flujo y el análisis molecular por la reacción en cadena de la polimerasa PCR, para identificar el subtipo de leucemia y poder aplicar el tratamiento quimioterapéutico más específico.

La información clínica y de laboratorio, como la cuenta inicial de glóbulos blancos, edad, sexo, subtipo de leucemia y factores genéticos, entre otros, es necesaria para clasificar el tipo de riesgo del paciente en estándar, moderado o alto. Con esto, se define el factor pronóstico del paciente y la expectativa probable de curación. En la última década, la enfermedad mínima residual (EMR) está considerada como el factor pronóstico más importante para identificar los pacientes con alta probabilidad de curación o recaída, lo cual es de utilidad para continuar con el tratamiento establecido o modificarlo.

En el estado de Michoacán, los esquemas de control de leucemia en pacientes pediátricos, no incluye la determinación de EMR mediante biología molecular, por lo que existe mayor riesgo de recaída por tratamiento inadecuado o comorbilidades asociadas al tratamiento.

Los pacientes que expresan el gen de fusión ETV6/RUNX1, responden mejor a la quimioterapia y tienen mayor probabilidad de curación. Es por ello importante identificar los pacientes que expresan este gen para adecuar su esquema de tratamiento. Además, al determinar su nivel de expresión mediante la RT-PCR semicuantitativa, proporcionará información en relación a la respuesta del tratamiento

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿La detección de EMR en pacientes con leucemia se asocia a la respuesta hematológica?

IV. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfocítica aguda representa la principal neoplasia maligna que afecta a los pacientes pediátricos y ocupa un lugar importante entre las causas de mortalidad en niños menores de 15 años.

Pese a que la leucemia puede alcanzar tasas de curación de hasta 90% esta cifra decae en cifras incluso menores al 50% debido probablemente al mal manejo terapéutico una vez establecido el protocolo de tratamiento o a los efectos tóxicos colaterales de la terapia.

Pacientes con LLA de riesgo que presentan EMR después de la terapia de inducción a la remisión tienen mayor probabilidad de recaída que aquellos pacientes que no presentan EMR.^{49, 50}

En nuestro país el diagnóstico de leucemia y los esquemas antineoplásicos están dirigidos por las manifestaciones clínicas y la observación médica sin explorar adecuadamente a la enfermedad subclínica como una posibilidad de recaída.

Este escenario sugiere la búsqueda de una alternativa molecular que establezca con mayor precisión la situación clínica del paciente pediátrico que está bajo tratamiento y asociarlo a las características clínicas y de laboratorio. Esto proporcionará información para ajustar el tratamiento para evitar la sobredosificación de quimioterapia a pacientes con buen pronóstico e intensificación en casos de mal pronóstico.

En el presente trabajo se considera estudiar la enfermedad mínima residual mediante la expresión del gen de fusión ETV6/RUNX1 y su relación como marcador de buen pronóstico en pacientes pediátricos con LLA y correlacionar las variables hematológicas con la cantidad de EMR después de la inducción a la remisión.

V. HIPOTESIS

Los pacientes pediátricos que expresan el gen de fusión ***ETV6/RUNX1*** y presentan enfermedad mínima residual presentarán mayor cantidad de alteraciones hematológicas.

VI. OBJETIVOS

a) General

Determinar la expresión de EMR en pacientes pediátricos con LLA, mediante la detección del gen de fusión *ETV6/RUNX1*.

b) Específicos

- a) Estandarizar la técnica de RT-PCR, PCR y PCR anidada

- b) Determinar la expresión y cuantificación relativa del rearrreglo molecular *ETV6/RUNX1* en muestras de sangre periférica y/o médula ósea de los pacientes

- c) Asociar la respuesta al tratamiento según la presencia del gen de fusión *ETV6/RUNX1* y cantidad de EMR.

VII. MATERIALES Y METODOS

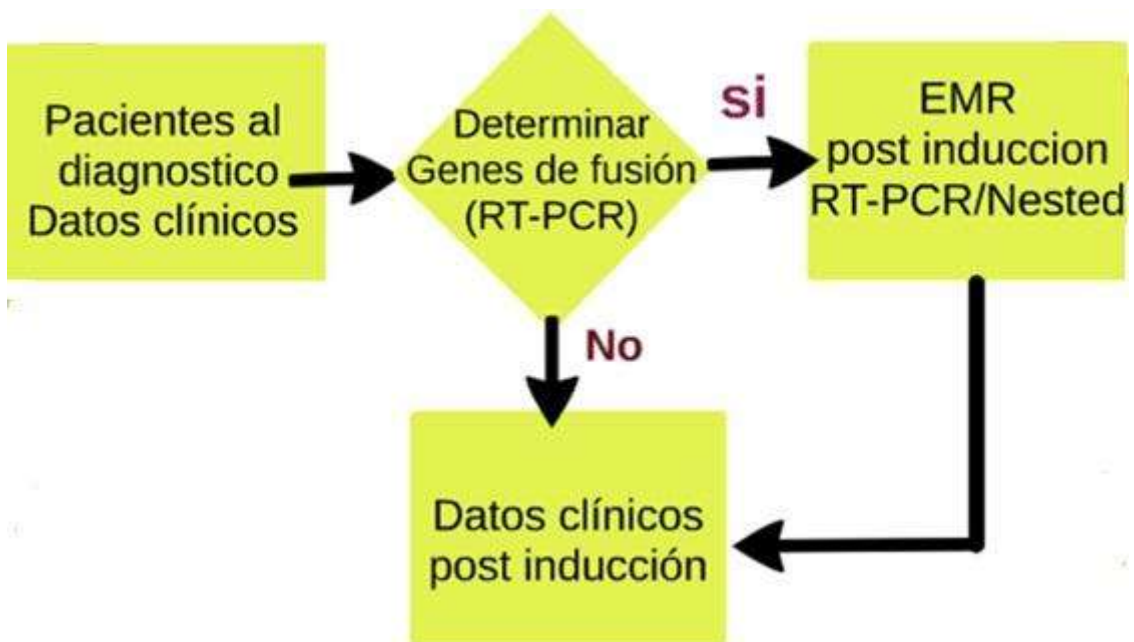
1. Diseño del estudio

Longitudinal, prospectivo y observacional.

2. Universo de trabajo

Pacientes consecutivos con diagnóstico de leucemia aguda que ingresen al Servicio de Hematología del Hospital infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”

3. Esquema de trabajo



4. Descripción de las variables

Cuadro 1 descripción de las variables

Variable	Definición	Tipo	Medición
EMR	Enfermedad Mínima Residual: Cantidad de células leucémicas remanentes después del tratamiento quimioterapéutico	Independiente Cuantitativa	Por RT-PCR La expresión del gen de fusión <i>ETV6/RUNX1</i> al término de inducción a la remisión, se considera positivo. Se mide por densitometría en unidades arbitrarias.
<i>ETV6/RUNX1</i>	La t(12;21)(p12;q22) resulta de la translocación entre el gen TEL (<i>ETV6</i>) del cromosoma 12 y el gen AML1 (<i>CBFA2 core-binding factor</i>) del cromosoma 21, originando el transcrito de fusión <i>ETV6/RUNX1</i>	Independiente Categorica	Detectable por PCR y PCR anidada. Su presencia confiere un pronóstico favorable
Leucocitos totales	Cuenta de las células que comprenden la serie blanca hemática Mononucleares (Linfocitos y monocitos) y polimorfonucleares (Neutrófilos, eosinófilos y Basófilos)	Cuantitativa	Mediante equipo automatizado, los valores normales son: Recién nacido: 10 a 26 mil/mm ³ Al año de edad: 8 a 16 mil/mm ³ Entre los 3 y 5 años: 10 a 14 mil/mm ³ De los 5 a los 15 años: 5.5 a 12 mil/mm ³ Puede verse aumentada al diagnóstico de la leucemia (leucocitosis >50,000/mL) o disminuida durante el tratamiento antineoplásico >5000/MI
Plaquetas	Células discoides de 3 µm carentes de núcleo, producto de la fragmentación del megacariocito.	Cuantitativa Dependiente	Mediante equipo automatizado. Valor normal: De 150,000 a 400,000 plaquetas/ µL. La trombocitopenia está asociada a falla medular en pacientes con leucemia.
Hemoglobina	Pigmento rojo contenido en los hematíes de la sangre de los vertebrados, cuya función consiste en captar el oxígeno y dióxido de carbón	Cuantitativa dependiente	Mediante equipo automatizado. Valores normales: Hombre: de 13.8 a 17.2 g/dL Mujer: de 12.1 a 15.1 g/dL

<p>Blastos en sangre periférica</p>	<p>Células hematopoyéticas inmaduras. Se distinguen mieloblastos, células inmaduras que provienen de la línea mieloide, y los linfoblastos que derivan de la línea linfoide.</p>	<p>Cuantitativa dependiente</p>	<p>Se considera positivo una cantidad mayor a 5% Al terminar la inducción a la remisión se espera una reducción morfológica < 5% en médula ósea, valores mayores al 5% indican mala respuesta al tratamiento.</p>
<p>Sodio</p>	<p>El Sodio es un catión presente en los fluidos extracelulares del cuerpo con función determinante en la osmolaridad celular.</p>	<p>Cuantitativa dependiente</p>	<p>Se determina por equipo automatizado con valores normales de 135-144mmol/L. los valores inferiores a 135 mmol/L se denomina hiponatremia mientras que los valores mayores a 144mmol/L es denominado hipernatremia.</p>
<p>Cloro</p>	<p>El ión cloruro se encuentra en los líquidos extracelulares, participa en la osmolaridad celular así como en el equilibrio ácido base y el transporte de CO₂ en la sangre.</p>	<p>Cuantitativa Dependiente</p>	<p>El análisis se realiza por equipo automatizado con valores normales de 101-111 mmol/L. los valores fuera de éste rango son considerados anormales ya sea en estado de hipocloremia o hipercloruremia.</p>
<p>Magnesio</p>	<p>El magnesio es un ion principalmente intracelular tiene varias implicaciones en el organismo tales como función muscular y nerviosa, componente integral de la masa ósea y es necesario en moléculas energéticas como el ATP, agente catalítico en reacciones enzimáticas y síntesis de proteínas.</p>	<p>Cuantitativa Dependiente</p>	<p>El análisis se realiza con equipo automatizado con valores normales entre 1.8-2.5mg/dL. Valores fuera del rango pueden producir hipermagnesemia o hipomagnesemia.</p>
<p>Fosforo</p>	<p>El fosforo es parte integral de la membrana celular y masa ósea. Desempeña funciones celulares energéticas, activación de enzimas, hormonas y forma parte de moléculas de señalización a través de la fosforilación; también es un amortiguador en el equilibrio ácido-base.</p>	<p>Cuantitativa Dependiente</p>	<p>Su determinación es por equipo automatizado con valores normales entre los 3-4.5 mg/dL. Valores fuera de rango se considera anormal.</p>

Potasio	El potasio es un ión que principalmente trabaja con el sodio para mantener el equilibrio ácido-base del cuerpo y el fluido en la norma y, por sí mismo, permite la transmisión de los impulsos nerviosos, la contracción muscular y el buen funcionamiento renal.	Cuantitativa Dependiente	El análisis es realizado por equipo automatizado con valores normales entre 3.6-5.1 mmol/L. niveles por encima del limite se denomina hiperkalemia; niveles bajos se denominan hipokalemia.
DHL	Oxidoreductasa presente en las células que cataliza la formación de lactato a partir de piruvato en una reacción redox de NADH a NAD ⁺ .	Cuantitativa Dependiente	Su análisis es por equipo automatizado con valores normales entre 105-333 UI/L los valores elevados son considerados anormales e indican lesión celular.
Creatinina	La creatinina es un compuesto orgánico generado por la degradación de la creatina su presencia indica principalmente la función renal.	Cuantitativa Dependiente	Su análisis es por equipo automatizado con valores normales entre 0.3-1.3mg/dL.
Urea	La urea es el producto de degradación de las proteínas llevada a cabo por el hígado y su presencia indica el funcionamiento renal	Cuantitativa Dependiente	El análisis se realiza con equipo automatizado con valores normales entre 15-44 mg/dL.
Ácido úrico	El ácido úrico es un metabolito de las purinas	Cuantitativa Dependiente	El análisis se realiza con equipo automatizado con valores normales entre 4.8-8.7mg/dL.

5. Selección de los pacientes

a) Tamaño de la muestra.

Se incluyeron 18 pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda durante el periodo de abril 2016 a enero 2017.

b) Criterios de selección

Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de LLA confirmado por citomorfología e inmunofenotipo.

Criterios de no inclusión

Pacientes con tratamiento antineoplásico previo

Pacientes cuyo tutor no deseó participar en el estudio

Criterios de Exclusión

Pacientes cuyo tutor no deseó continuar en el estudio

Pacientes con terapia Inducción a la remisión incompleta

Pacientes que abandonen el tratamiento.

Consideraciones éticas

Los pacientes fueron incluidos sólo bajo su consentimiento o el de su padre o tutor. Se les explicó la finalidad del proyecto, para lo cual firmaron la carta de consentimiento en caso de estar de acuerdo con los términos del proyecto. Se explicó que las muestras requeridas son aquellas normalmente tomadas durante el diagnóstico y vigilancia clínica, sin que se requieran muestras adicionales. Las muestras de médula ósea y sangre periférica fueron tomadas por el personal capacitado adscritos al servicio pertinente, bajo las medidas necesarias para prevenir cualquier complicación.

Recursos Físicos y materiales

El laboratorio de Citopatología Molecular de la división de estudios de Posgrado de la UMSNH se compone de un área física con las condiciones y equipamiento adecuados para el desarrollo del protocolo. Cuenta con Campana de Flujo laminar, congeladores, ultracongeladores, centrifugas, ultracentrifugas, termociclador, reactivos y materiales de biología molecular necesarios para la extracción de RNA, obtención de cDNA y para la Reacción en Cadena de la polimerasa. No se generó ningún costo a los pacientes o familiares participantes de este proyecto.

6. Procedimientos

A) DATOS HEMATOLÓGICOS

-Estudios de laboratorio

Los estudios de laboratorio que se realizaron a los pacientes fueron: biometría hemática (hemoglobina, cuenta de leucocitos, cuenta diferencial, plaquetas) y química sanguínea. Los datos de estos resultados se obtuvieron del expediente clínico.

B) EXTRACCIÓN DE RNA

El ácido ribonucleico (RNA) total se obtuvo por el método de TRIpure[®] Reagent, siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Diez millones de leucocitos se colocaron en tubo Eppendorf y se lisaron con 1 ml de Tripure. Se dejaron en reposo 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto manualmente.

Posteriormente se mantuvieron en reposo 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (capa superior) se transfirió a otro tubo y se añadieron 500 µL de isopropanol, se mezcló suavemente, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, resuspendió con vortex y centrifugó a 12,000 g durante 5 min a 4°C. Al botón de RNA se le eliminó el etanol, decantando y dejando evaporar durante 10 a 15 min. Finalmente, el RNA se disolvió en 20 µL de agua libre de RNAsas y se almacenó a -70°C hasta su uso.

-Determinación de pureza del RNA

El RNA se diluyó 1:100 en agua inyectable y se leyó en espectrofotómetro, empleando una cubeta de 1 cm de paso de luz a una longitud de onda de 260 nm. 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 puras presentan valor de relación ácidos nucleicos/proteínas mayor a 1.7.

C) DETERMINACIONES MOLECULARES

-Síntesis de cDNA

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se efectuó de acuerdo al estuche GeneAmp® RNA PCR, con algunas modificaciones. En un tubo Eppendorf se colocaron por reacción, 2 µg de RNA, más 0.5 µg de solución de Hexámeros al azar (Random Hexamers Invitrogen® 50µM), adicionando agua cbp 10 µL. Después se sometió a calentamiento a 65°C durante 10 minutos y posteriormente se colocó en hielo. Por otro lado, en otro tubo se realizó la mezcla de reacción con la solución amortiguadora 1X, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's Sigma-Adrich®), 20 U de inhibidor de RNasas Invitrogen® y 4 U de enzima retrotranscriptasa inversa (M-MLV Reverse Transcriptase 5U/µL Invitrogen®).

Después, la mezcla de reacción se agregó al primer tubo, se sometió a incubación a 37°C durante 60 min y después a 93°C durante 5 min en el cual se empleó el termociclador Techne Genius®. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

-Estandarización del PCR:

a) Análisis por PCR

En tubo Eppendorf se colocaron solución amortiguadora 1X (CoralLoad Buffer QIAGEN®), 0.2 mM de dNTP's, 0.1 µl de enzima Taq Polimerasa (Taq DNA polimerase 5U/µL QIAGEN®), 2mM de cloruro de magnesio (QIAGEN®), los respectivos iniciadores TEL-A: TGCACCCTCTGATCCTGAAC, AML1-B: AACGCCTCGCTCATCTTGC, agua inyectable cbp. 20 µL de reacción y 2 µL de cDNA de la muestra.³⁶ La amplificación se realizó durante 1 ciclo a 96°C/5 min, luego 30 ciclos a 96°C/30 s, 65°C/60 s, 72°C/60s. Finalmente se incubó a 72°C/5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñido en solución 0.05% de bromuro de etidio a 85 voltios durante 45 min. La presencia de una banda de 298 pb en el gel de agarosa, indicó la expresión del gen de fusión. El gen *ABL* se empleó como control interno en cada una de las reacciones.

-b) PCR anidado

Se llevó a cabo una segunda serie de PCR (PCR anidado) tomando una alícuota de la primera reacción de PCR descrita anteriormente con la misma formulación y se usaron los oligos TEL-C: AAGCCCATCAACCTCTCTCATC y AML1-D: TGGAAGGCGGCGTGAAGC.³⁶ La amplificación se realizó durante 1 ciclo a 96°C/5 min, luego 25 ciclos a 96°C/30 s, 65°C/60 s, 72°C/60s. Finalmente se incubó a 72°C/5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñido en solución 0.05% de bromuro de etidio a 85 voltios durante 45 min. La presencia de una banda de 181 pb en el gel de agarosa, indicó la expresión del gen de fusión con una posible variante que da un producto de 142 pb.

-Expresión Semicuantitativa del gen de fusión *ETV6/RUNX1*

Primeramente se realizó una curva de amplificación del gen *ABL* y del *BCR/ABL* a 23, 25 y 27 ciclos de la línea celular K562 para establecer la fase logarítmica de la reacción. Así se estableció, que 25 ciclos fue la cantidad adecuada para continuar con el estudio. (Figura7). Una vez tomando esta referencia se realizaron los amplificadores de las muestras de los pacientes con expresión del gen de fusión *ETV6/RUNX1* a 35 ciclos por PCR y 25 ciclos en PCR anidado junto a su respectivo control *ABL* a 25 ciclos.

El gen *ABL* sirvió como referencia para el análisis densitométrico, fue tomado como base para realizar el cociente de la intensidad de banda del gen de fusión entre la intensidad del gen *ABL*. La medición de la intensidad de los amplificados se realizó en el fotodocumentador BIO-RAD® modelo RS170 con el programa ChemiDoc.

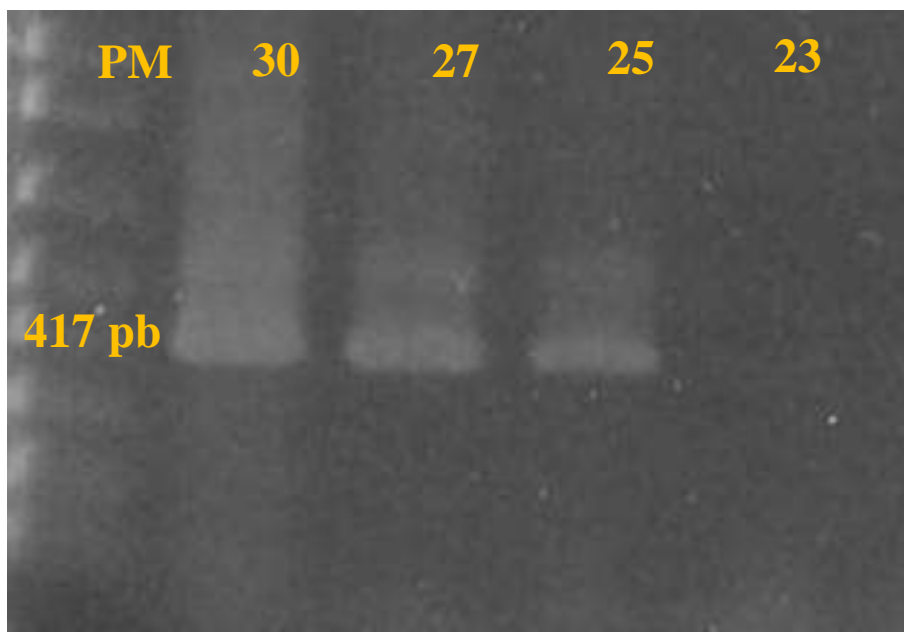


Figura 7 Curva de amplificación BCR/ABL de la línea celular K562. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Amplificación del BCR/ABL de la línea celular K565 a 23, 25, 27 y 30 ciclos el producto mostró un amplificado de 417pb. PM=Marcador de Peso Molecular

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La correlación de las variables fue realizada mediante la determinación W de Wilcoxon y la tabla de Supervivencia mediante el análisis Kruskal Wallis.

VIII RESULTADOS

Se obtuvieron 35 muestras de 31 pacientes de los cuales 10 (32.3%) correspondieron a población adulta en tanto que 21 (67.7%) fueron pediátrica. Tres pacientes (9.67%) fueron descartados por inmunofenotipo mieloide. Se descartó a la población adulta por fines estadísticos dejando una n=18. Se presentaron un 55.5% de decesos de los cuales el 40% correspondió a la población positiva para el gen de fusión **ETV6/RUNX1**. El total de pacientes que expresaron el gen de fusión **ETV6/RUNX1** fue de 9 (29%).

Objetivo a)

-Estandarización de la técnica RT- PCR, PCR y PCR anidada

Para evaluar la viabilidad de las muestras de RNA se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.05%. Las muestras presentaron las bandas 28s y 18s (Figura 8) en distinto grado de integridad; se observaron 6 muestras con integridad buena, 20 con integridad regular y 4 con mala integridad (El total incluyó muestras repetidas y muestras de seguimiento).

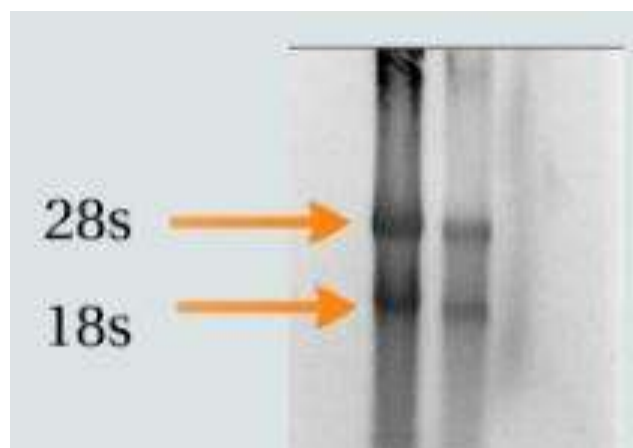


Figura 8 análisis de RNA. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de RNA control teñido en bromuro de etidio al 0.05%. Las bandas 28s y 18s presentes indican una buena integridad del RNA de la muestra.

Se realizó el análisis de la viabilidad la muestra con una PCR del gen control ABL encontrando como viables las muestras que expresaron las bandas correspondientes a 419 pares de bases (pb) como se muestra en la figura 9. Las muestras de los carriles 6, 7, 11 y 21 no presentaron amplificado visible fueron descartadas (figura 9).

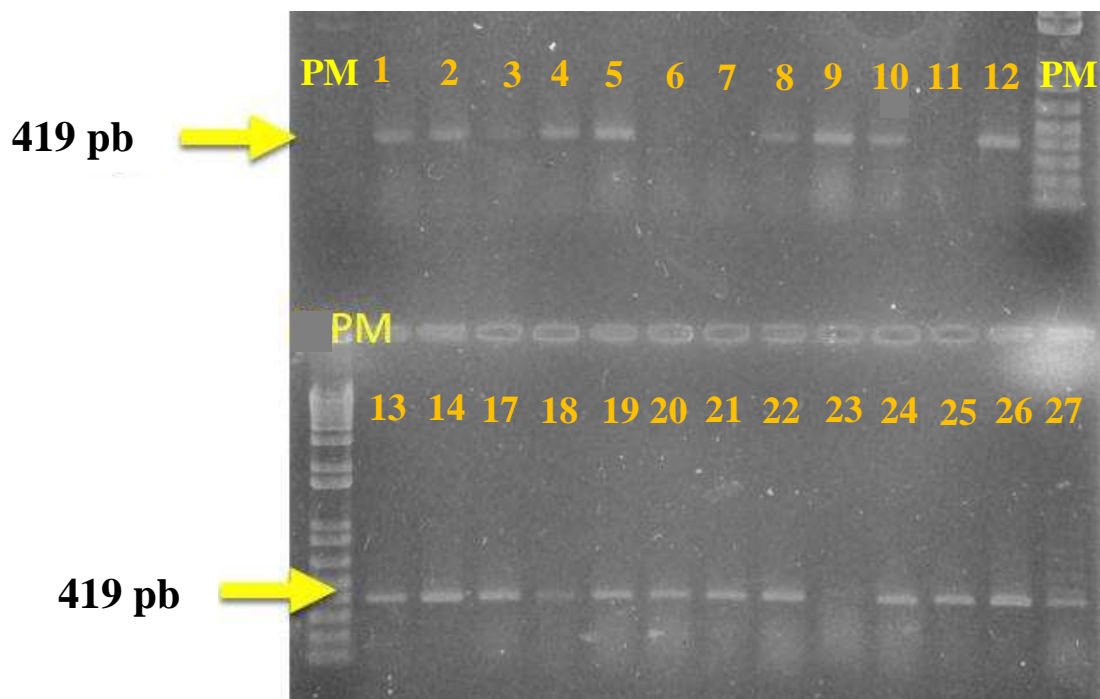


Figura 9. Expresión del gen control ABL. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de muestras de pacientes con amplificación del gen control ABL teñido en bromuro de etidio al 0.05%. Las bandas de 400pb indican la presencia del gen control ABL; las muestras en los carriles 6,7, 11 y 21 no presentan amplificado. MPM= Marcador de peso molecular.

Los 24 cDNA de las muestras que presentaron el gen control ABL positivo se sometieron a la prueba para el gen de fusión *ETV6/RUNX1*. En una primera ronda la evaluación arrojó un solo caso positivo visualizado en la PCR anidada (Figura 10a); sin embargo, debido a la alta inespecificidad presente en el gel así como la baja intensidad y nitidez de la banda la muestra fue tomada como presunta positiva. Se hizo un análisis y corrección de la concentración de oligos TEL A, AML1 B, TEL C Y AML1D (Figura 11) y

Genes de fusión como marcador molecular para el estudio de la enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda

con ello, se realizó una segunda ronda de PCR y PCR anidada con los oligos corregidos, encontrando 9 casos positivos para el transcrito *ETV6/RUNX1*. (Figura 10b)

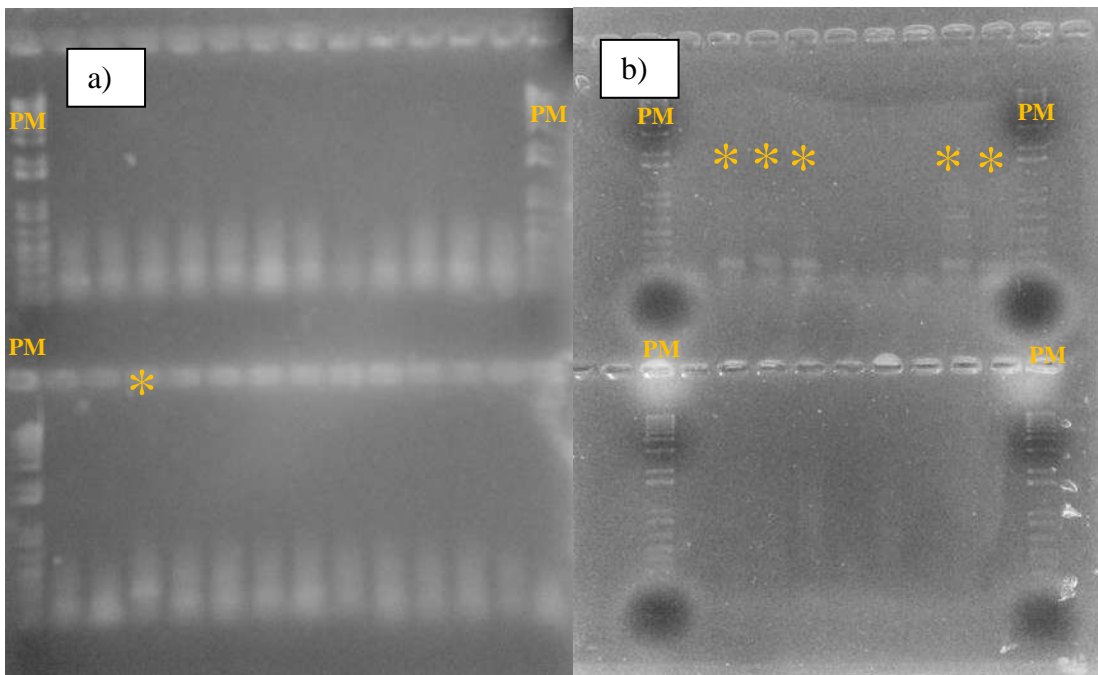


Figura 10 Expresión del gen de fusión *ETV6/RUNX1*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de muestras de pacientes con amplificación del gen *ETV6/RUNX1* teñido en bromuro de etidio al 0.05%. **a)** primera ronda de análisis del gen *ETV6/RUNX1*; el carril 15 presentó un producto débil correspondiente al gen de fusión *ETV6/RUNX1*. **b)** Segunda ronda de amplificación con oligos ajustados. Se muestran 5 de los 9 casos positivos con bandas de 181pb. PM= Marcador de peso molecular.

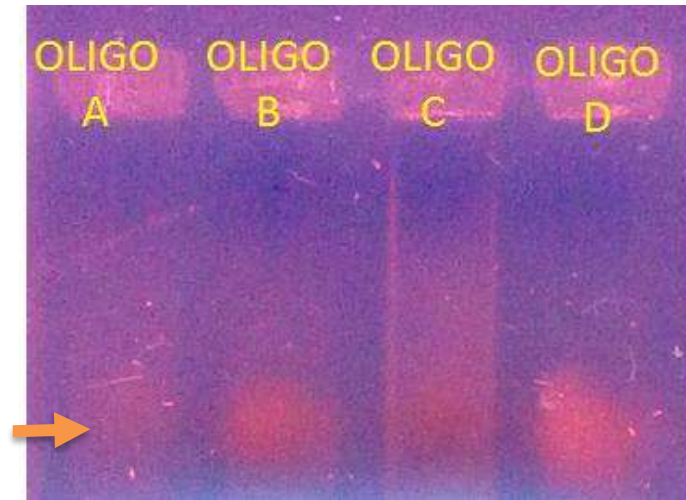


Figura 11. Evaluación de oligos. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido en bromuro de etidio al 0.05%. La electroforesis muestra diferencias en la concentración de pares de oligos TEL-A, AML1-B, TEL-C, AML1-D.

Objetivo b)

Determinar la expresión y cuantificación relativa del rearrreglo molecular *ETV6/RUNX1* en muestras de sangre periférica y/o médula ósea de los pacientes.

Las muestras positivas observadas en gel de agarosa fueron re-evaluadas en gel de poliacrilamida utilizado para el análisis semicuantitativo por la mayor sensibilidad y nitidez que ofrece con respecto a la agarosa (Figura 12). En el carril 1, 7, y 9 se observaron bandas únicas en el orden de las 289 pb, los carriles 5 y 6 mostraron bandas en el orden de las 181 pb y los carriles 2,4 y 5 muestran ambas bandas.



Figura 12. Muestras positivas a el gen *ETV6/RUNX1*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido en bromuro de etidio al 0.05%. Se obtuvieron bandas de 298pb y de 181pb que corresponden al esperado para *ETV6/RUNX1* PM= Marcador de peso molecular

De los 9 pacientes que fueron positivos para el gen de fusión **ETV6/RUNX1**, hubo 4 decesos (44.4%) De los cinco pacientes restantes, sólo se pudo dar seguimiento a cuatro casos durante la fase de consolidación. Dos de los cuatro pacientes evaluados, continuaron expresando el gen de fusión (50%). La figura 13 muestra la evaluación de la presencia del gen de fusión **ETV6/RUNX1** y consecuentemente el gen control ABL de cada uno.

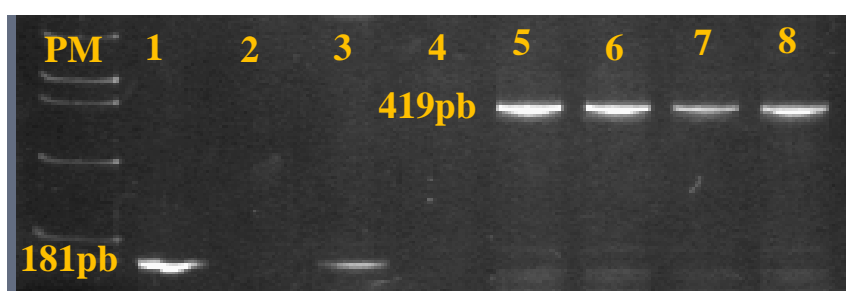


Figura 13 Análisis de muestras post-inducción Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido en bromuro de etidio al 0.05%. Los carriles 1,3 pacientes MRCA45 y RME47 presentan banda de 181pb compatible con la esperada para **ETV6/RUNX1** los carriles 2 y 4 de los pacientes QSC46 y ZRI48 no presentaron amplificado. Los carriles 5-8 muestran una banda de 419pb compatible con ABL que corresponde al de las muestras de los carriles 1-4 respectivamente. MP=marcado de peso molecular

Para la semi cuantificación se obtuvo el valor arbitrario (UA)de densidad de la banda del gen de fusión y del gen ABL al diagnóstico y postinducción de los cuatro sobrevivientes. . El periodo post tratamiento de inducción a la remisión se realizó en un periodo de 6 meses después de la prueba de diagnóstico. La intensidad obtenida se presenta en el cuadro 2. La relación de intensidad postinducción/diagnóstico en los dos pacientes positivos post inducción se vio aumentada a pesar del tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2. Relación de intensidad de muestras al diagnóstico y muestras postinducción

Paciente	Intensidad <i>ETV6/RUNX1/ABL</i> Diagnóstico (UA)	Intensidad Relativa diagnóstico %	Intensidad <i>ETV6/RUNX1/ABL</i> Postinducción	Intensidad Relativa Postinducción %	Relación de intensidad Final /inicial (UA)
MRCA01	59.17/109.86	53.85	158.74/ 236.15	144.49	2.683
VSJM10	68.36/ 154.45 51.24/ 154.45^a	44.26 33.17	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b
RME11	58.41/ 190.95 118.29/ 190.95^a	20.58 61.89	97.88/ 130.84 165.01/ 130.84	74.80 126.11	3.634 2.037
DPJ13	184.68/ 186.42	99.17	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b
IGEG14	86.08/ 176.56 140.11/ 176.56^a	48.75 79.35	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b
MGFJ29	62.04/ 191.83	32.34	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b
ZRI31	83.00/ 137.59	60.32	NEGATIVO	N/D ^b	N/D ^b
QSC38	64.22/ 122.63 34.13/ 122.63^a	52.36 27.83	NEGATIVO	N/D ^b	N/D ^b
RPAY44	100.13/ 137.22	72.97	N/D ^b	N/D ^b	N/D ^b

a: Se indican los valores de intensidad de ambas bandas en el gel

b: No determinado

Objetivo c)

Asociar la respuesta al tratamiento según la presencia del gen de fusión *ETV6/RUNX1* y cantidad de EMR

-Respuesta al tratamiento

Se evaluó la respuesta al tratamiento de los pacientes pediátricos mediante el seguimiento del paciente comparando el estado clínico al diagnóstico y postinducción a la remisión tomando como parámetros las variables hematológicas y bioquímicas. El análisis fue realizado con la prueba no paramétrica W de Wilcoxon para muestras relacionadas. El análisis general mostró que existe diferencia significativa en la cuenta de leucocitos ($P = 0.013$) porcentaje de blastos ($P = 0.003$), plaquetas ($P = 0.002$) y ácido úrico ($P = 0.009$) como se muestra en el Cuadro 3. Al clasificar por expresión de *ETV6/RUNX1* los grupos de pacientes se asignaron como: grupo 1 pacientes con LLA sin expresión del gen *ETV6/RUNX1* 9 (50%) y grupo 2 pacientes con LLA con expresión del gen *ETV6/RUNX1* 9 (50%).

Los pacientes del grupo 1 presentaron una diferencia significativa en leucocitos ($P = 0.015$) blastos ($P = 0.021$) y urea ($P = 0.028$). Las plaquetas mostraron un valor limítrofe de $P = 0.051$. En el grupo 2 las variables que mostraron resultados significativos fueron: plaquetas ($P = 0.012$) y ácido úrico ($P = 0.043$) (Cuadro 3). Las variables creatinina, LDH (Lactato deshidrogenasa), AST (Aspartato amino transferasa), ALT (Alanin amino transferasa), Fosforo (P), Magnesio (Mg^{++}), Calcio (Ca^+), Sodio (Na^+), Potasio, (K^+) y Cloro (Cl^-) no mostraron diferencia significativa (datos no mostrados).

Cuadro 3 Análisis estadístico de variables hematológicas

	Con ETV6/RUNX1	Sin ETV6/RUNX1	General
Leucocitos totales	0.208 ^a	0.015	0.013
Plaquetas	0.012	0.051	0.002
Blastos	0.063	0.021	0.003
Ácido Úrico	0.043	0.093	0.009
Urea	0.674	0.028	0.191

*Valor significativo de $p < 0.005$

a: Valor de p

La comparación entre los grupos ETV6/RUNX1 positivo y ETV6/RUNX1 negativo se realizó con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Se hicieron dos comparaciones para ver si existió diferencia entre los grupos, una con los datos al diagnóstico y otra después del tratamiento. Los análisis mostraron que no existe diferencia entre grupos en ambos casos (datos no mostrados).

-Supervivencia. Se realizó un análisis de supervivencia en días desde el diagnóstico de los pacientes hasta el día de fallecimiento o último registro obtenido. Se dividió en dos grupos: el grupo que presentó gen ETV6/RUNX1 y el grupo en que no se detectó el transcrito (Figura 14). La estimación de la media mostró que el grupo con la translocación tuvo una supervivencia media de 237.9 días, en tanto que el grupo que no presentó el rearrreglo presentó una media de 186 días (Figura 14). La diferencia en la supervivencia no mostró valores significativos ($P=0.253$)

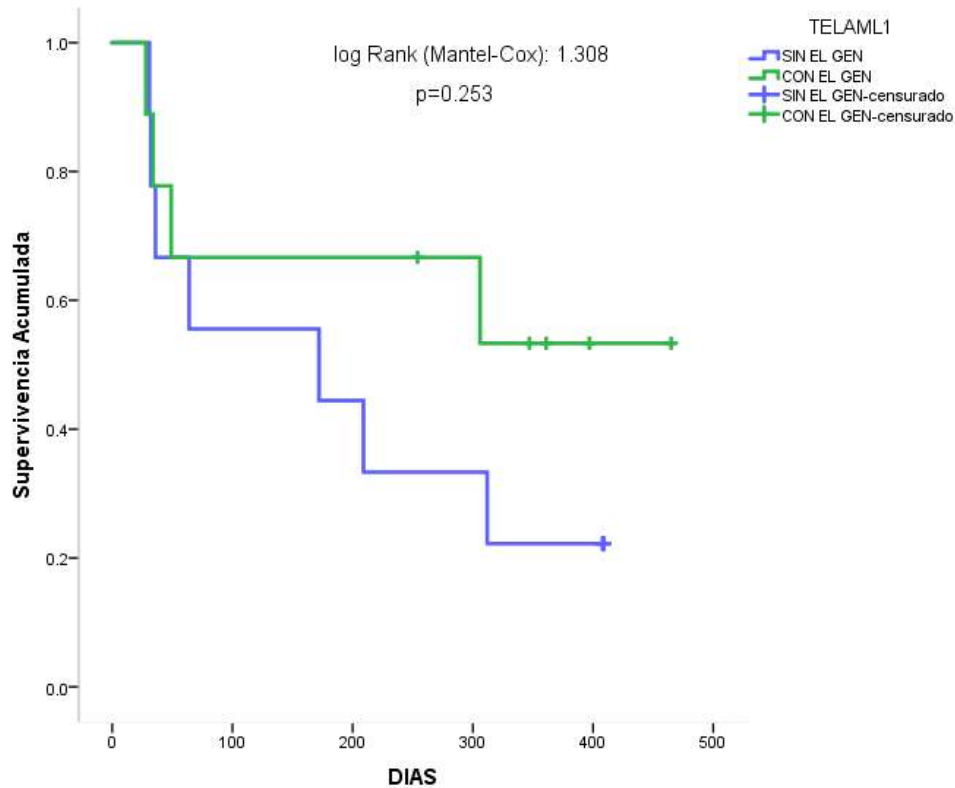


Figura 14. Análisis de supervivencia de los pacientes con LLA. Las curvas representan a los pacientes con expresión de ETV6/RUNX1 (n =9) y sin expresión de ETV6/RUNX1 (n =9).

-Edad

De acuerdo a la edad se tomó en consideración los pacientes de alto riesgo en edad mayor a 10 años y menor a 1, en tanto que el riesgo estándar fue representado por los que se presentaron entre los 1 a 10 años .El total de riesgo estándar fue de 44.4% mientras que de riesgo alto comprendió el 50% (un caso fue indeterminado). Del total de pacientes que expresaron el gen de fusión 5 (55.5%) fueron de riesgo estándar y de ellos 3 fallecieron, en cuanto al riesgo alto en pacientes con el gen de fusión 1 paciente de 4 falleció. Los pacientes sin la presencia del gen presentaron 5 casos de alto riesgo y tres de riesgo estándar de los cuales 4 de alto riesgo fallecieron, mientras que un caso de los tres en riesgo estándar falleció (Cuadro 4).

Cuadro 4 Frecuencia de casos por edad/riesgo y decesos/riesgo

	Edad 1-10años (Riesgo estándar)	Edad >10años <1 año (Riesgo alto)	Decesos 1-10años	Decesos >10años <1 año
Con gen ETV6/RUNX1	5 (55.5)	4 (44.5)	3 (60%)	1 (25%)
Sin gen ETV6/RUNX1	3 (33.3%)	5 (55.5%)	1 (33.3%)	4 (80%)
Total	8 (44.4%)	9 (50%)	4 (50%)	5 (55.5%)

* Un caso no se contabilizó por datos incompletos

-Inmunofenotipo.

El subtipo LLA B Temprana fue el más frecuente con expresión del gen de fusión, sin embargo; de manera general el inmunofenotipo Pre B fue el más frecuente. Un caso reportado como LLA de células T presentó la translocación, así como uno reportado inicialmente como LMA; sin embargo, la información disponible de este último no arrojó información precisa (Cuadro 5)

Cuadro 5 Frecuencia de inmunofenotipo.

Inmunofenotipo	Casos sin ETV6/RUNX1	Casos con ETV6/RUNX1	Total de casos
LLA B Temprana	1 (5.5%)	3 (16.6%)	4 (22.2%)
LLA B	0	1 (5.5%)	1 (5.5%)
LLA Pre B	4 (22.2%)	2 (11.1%)	6 (33.3%)
ND*	4 (22.2%)	3(16.6%)	7 (38.8%)

*No determinado

IX. DISCUSIÓN

El gen de fusión *ETV6/RUNX1* es la alteración más frecuente en niños con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, representando entre 25-30% de los casos; sin embargo, los estudios que informan estos datos son de países de primer mundo y la muestra representa a un sector poblacional similar. Estudios como el de Gao y col.⁵¹ en China, indican que el tipo de población puede ser un factor importante que influya en la frecuencia de pacientes que presentan translocaciones. En México, el grupo de trabajo de Jiménez-Morales⁵² y el de Daniel-Cravioto⁵³, realizaron estudios de frecuencia de los principales rearrreglos moleculares en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en la que incluyeron los genes de fusión *TCF3/PBX1*, *MLL/AF4*, *BCR/ABL* y *ETV6/RUNX1* donde se encontraron variación en el reporte de frecuencia ya que uno reporta al gen *MLL/AF4* como el más frecuente con un 65.4% de los casos mientras que el *ETV6/RUNX1* mostro sólo un 3.8% de los casos en la población mexicana estudiada, el otro estudio, describe una frecuencia de 13.5% que concuerda con el descrito en la literatura. En nuestro estudio se encontraron 50% de los casos con expresión del gen de fusión *ETV6/RUNX1*, lo cual se ve aumentado respecto con lo que reporta la literatura. Por esto, debido a que en nuestro país muestra la más elevada mortalidad a nivel mundial por leucemia linfoblástica aguda en pediatría, consideramos que es de suma importancia la evaluación rutinaria de la búsqueda de genes de fusión para poder establecer si existe una relación con el alto índice de mortalidad.

La presencia del gen de fusión *ETV6/RUNX1* en pacientes con leucemia linfoblástica aguda ha sido reconocida como un factor de buen pronóstico y es tomado como un factor de estratificación de pacientes como lo muestran estudios de Gao y col.⁵¹ quien realizó una clasificación en distintos factores de riesgo siendo el principal la EMR y entre ellos, la presencia del gen *ETV6/RUNX1* se muestra como un factor de clasificación de buen pronóstico dando como resultado general una supervivencia libre de enfermedad a 5 años del 92%. De manera sorpresiva, nuestros resultados mostraron una supervivencia libre de enfermedad a menos de 1 año del 44.5%, es decir que 55.5% de los pacientes fallecieron. En este mismo sentido, de los pacientes que fallecieron, 40% expresaron el gen de fusión, lo que es totalmente opuesto a lo

que se informa en la mayoría de estudios. Sin embargo, existen otros factores que pueden influir en estos resultados como lo indican el grupo de Deepa Bhojwani y col.⁵⁴ donde encontraron que el gen de fusión *ETV6/RUNX1* está considerado como factor pronóstico independiente por el estudio del Children's Oncology Group (COG)⁵⁵. No obstante, el Dana Farber Cancer Institute⁵⁶ establece que este gen no constituye un factor pronóstico independiente, sino que debe considerarse después de la edad de presentación de la enfermedad, la cantidad inicial de leucocitos y el grupo de tratamiento, es decir, se le da muy poco valor pronóstico a la expresión del gen de fusión. En nuestro estudio, 3 de los 4 pacientes con gen de fusión *ETV6/RUNX1* que fallecieron se encontraron en el grupo de riesgo estándar de 1 – 10 años, mientras que solo un paciente de riesgo alto por edad con expresión del gen de fusión falleció, lo cual no concuerda con lo reportado por Lin y col.⁵⁷ donde encontraron en su estudio realizado en un grupo de 20 pacientes, (similar al tamaño de muestra de nuestro estudio) una frecuencia del rearrreglo *ETV6/RUNX1* del 30% de los cuales sólo se presentó un deceso, lo que pone de manifiesto la diferencia que existe entre una población y otra. El análisis de supervivencia no arrojó una diferencia significativa entre el grupo con *ETV6/RUNX1* y el grupo sin el rearrreglo ($P=0.253$) resultó alarmante que en la estimación media fue de 237.9 días con una mortalidad del 55.5% en tanto que estudios como el de Mignon y col.⁵⁸ muestran supervivencia de 90% en un periodo de 5 años.

Una de las atribuciones más importantes en este trabajo es la semicuantificación del *ETV6/RUNX1* en los pacientes al diagnóstico y en el seguimiento, dando lugar a la enfermedad mínima residual, que como muchos trabajos demuestran, es el factor pronóstico más importante independiente de otros factores pronóstico. Estudios como los de Borowitz⁵⁹ y Conter⁶⁰ demuestran cómo es posible estratificar y tratar a los pacientes de acuerdo a la EMR y además alcanzar tasas de supervivencia cercanos al 90%. En nuestro estudio se evaluaron 4 pacientes (44.4%) en un periodo postinducción de 6 meses desde la prueba diagnóstica, en donde el 50% presentaron EMR negativa en tanto que los otros 2 pacientes evaluados presentaron un aumento en la cantidad del transcrito. De acuerdo a lo que se espera después del tratamiento es que se negativice la expresión del gen de fusión siendo el periodo óptimo establecido el día +31 o fin de la inducción a la remisión; en nuestro caso, el periodo de muestreo se

extendió por problemas durante la toma de muestra al fin de la inducción, donde la muestra obtenida no era suficiente para los análisis ya que se tomaron de las muestras de rutina en el hospital; además, la toma de instalaciones universitarias limitó el acceso al laboratorio durante ese periodo; sin embargo los resultados mostraron que pese a que los dos pacientes positivos recibieron tratamiento durante ese periodo, no lograron remisión molecular y más aún se observó un aumento del transcrito que indica el aumento de clonas leucémicas en el paciente esto contrasta bastante con diversos estudios como el de Bhojwani y col⁵⁴. donde 9 de 94 pacientes 9.5% presentaron EMR positiva al día 46 en tanto que este estudio reportó el 50% de los casos.

El inmunofenotipo en mayor proporción presente fue el de células pre B con un 33.3% seguido de B temprana con un 22.2% la literatura como indica Ahmad-Reza y col.⁶¹ donde afirma que la asociación inmunofenotípica B temprana con la expresión del ETV6/RUNX1 se encuentra en aproximadamente el 25% de los casos. Nuestra muestra ETV6/RUNX1 presentó una frecuencia de 16.6% para inmunofenotipo B temprana que concuerda con la literatura. La comparación de grupos no arrojó diferencias significativas entre las variables hematológicas ni en la enfermedad mínima residual lo cual indica que la población estudiada se comporta de manera homogénea por lo que no existe asociación entre la presencia del gen ETV6/RUNX1 con ninguna de las variables estudiadas. En la literatura se encuentra que los pacientes con el gen ETV6/RUNX1 tienen una mejor respuesta medular en comparación con pacientes sin la presencia del gen como lo menciona Gao y col⁵¹. en su estudio. El análisis de variables hematológicas al diagnóstico y post tratamiento mostró diferencia significativa global en la cuenta de leucocitos ($p=0.013$) porcentaje de blastos ($p=0.003$), plaquetas ($p=0.002$) y ácido úrico ($p=0.009$), lo que indica que la función medular se restableció después del tratamiento y es concordante a la literatura que indica que los valores deben normalizarse en lo posible para que la remisión morfológica y clínica se lleve a cabo donde la principal variable es el porcentaje de blastos, seguido de la cuenta de leucocitos, neutrófilos y plaquetas como indica la guía de práctica clínica del consejo de salubridad general así como Yanada y Col.⁶² Al separar los grupos en ETV6/RUNX1

positivo y ETV6/RUNX negativo se encontraron diferencias significativas entre ellas; para el grupo con expresión de ETV6/RUNX1 fueron la cuenta de plaquetas ($p=0.012$) y ácido úrico ($p=0.043$) en tanto que para el grupo sin expresión del gen las variables significativas fueron la cuenta de leucocitos ($p=0.015$), blastos (0.021), plaquetas ($p=0.051$) y urea ($p=0.028$); la variable ácido úrico puede reflejar un cambio en la destrucción celular como lo indica Campbell y col⁶³. sin embargo existe la posibilidad de sesgo en las variables ácido úrico y urea, ya que las variables bioquímicas de los pacientes en algunos casos no se presentaban completas.

X. CONCLUSIONES.

- 1.-**Las alteraciones hematológicas no están relacionadas con la EMR ya que no existe diferencia entre los grupos ETV6/RUNX1 positivo y ETV6/RUNX1 negativo.
- 2.-**Las variables hematológicas mostraron mayor diferencia en el grupo con ETV6/RUNX1 negativo con respecto al grupo positivo, lo cual implica que los pacientes a pesar de tener el gen de fusión presente, conservan en promedio los valores de ingreso.
- 3.-**El uso de la PCR semi-cuantitativa es útil para la determinación de EMR en pacientes con LLA
- 4.-**La frecuencia de gen de fusión ETV6/RUNX1 en la población estudiada es mayor a la reportada en la literatura
- 5.-**Pese a la alta frecuencia de ETV6/RUNX1 se presentó una mortalidad alta en un lapso de tiempo menor al reportado en la literatura

XI. PERSPECTIVAS

La determinación del gen de fusión *ETV6/RUNX1* sirvió como un filtro primario para la clasificación de los pacientes con Leucemia infoblástica aguda, se requiere además la identificación a la par de los genes de fusión más comunes en esta enfermedad, como son *E2A/PBX1* *MLL/AF4* y *BCR/ABL*. Así mismo el aumento de número de muestra y realizar por lo menos tres seguimientos a nivel molecular para un control correcto del paciente.

La determinación de la EMR es el factor pronóstico más importante reportado en la leucemia y la identificación de genes de fusión provee un factor pronóstico adicional, por lo que se espera que este estudio sirva como base para establecerlo de forma rutinaria y que se tome a consideración para la estratificación y asignación de tratamiento de los pacientes.

La existencia de estudios en nuestro país que evalúen la EMR, presencia de genes de fusión y evaluación de parámetros clínicos a la par podría esclarecer las causas de la alta mortalidad por leucemia en México por lo que es recomendable continuar con trabajos en esta línea de investigación.

XII ANEXOS

ANEXO 1.- Carta de consentimiento informado.

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS
LABORATORIO DE CITOPATOLOGÍA MOLECULAR Y CITOMETRÍA DE FLUJO

HOSPITAL _____ MORELIA, MICH.
Servicios de Medicina Interna – Hematología – Oncología
U.M.S.N.H. –HIM

Carta de consentimiento para la participación de proyectos de investigación científica

Morelia, Mich., a ____ de _____ del 20__

La presencia de la Enfermedad Mínima Residual puede determinar el riesgo a recaída en los pacientes con Leucemia Linfocítica Aguda, su detección oportuna es de suma importancia para aplicar los esquemas de tratamiento más adecuados dependiendo del tipo y magnitud de alteración y con ello alcanzar la remisión completa.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación "Genes de fusión como marcadores para el estudio de la enfermedad residual en pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda" registrado ante el comité local de investigación con el número: _____ El objetivo de este trabajo es determinar la cantidad de células leucémicas remanentes después de haber cursado el protocolo de tratamiento en pacientes pediátricos con leucemia aguda y asociarlos al progreso de la enfermedad. Se me ha explicado que se utilizarán aproximadamente 10 mL de médula ósea y 5 mL de sangre periférica los cuales serán tomados por punción de la cresta iliaca y punción venosa respectivamente, esta se me realizará en la toma para definir mi diagnóstico. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos: dolor, moretón y / o hinchamiento en el sitio de la toma de médula ósea. El investigador principal se ha comprometido a responder las preguntas o cualquier duda que yo le planteé acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento sin que esto influya sobre la atención que recibo por esta institución, así como que dicha participación no tendrá ningún costo (no pagaré por participación del estudio).

El investigador principal me ha dado la seguridad de que los datos obtenidos serán en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionar la información actualizada que se obtenga durante el estudio.

Dr. en C Sergio Gutiérrez Castellanos

Nombre y firma del Padre o tutor

Nombre y firma de testigo

Nombre y firma de testigo

Datos que debe leer el paciente antes de firmar la carta de consentimiento

- Finalidad de la investigación: Evaluar la cantidad de células leucémicas (Enfermedad Mínima Residual) y su relación con la recaída en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) atendidos en el Hospital Infantil de Morelia.
- Naturaleza de la investigación: consiste en tomar una muestra de 5 a 10mL ya sea sangre periférica o médula ósea, posteriormente analizar la muestra para aportar un diagnóstico.
- Razones para el diagnóstico molecular: el médico puede ordenar este examen si uno tiene tipos o cantidades anormales de glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas. El examen se utiliza para diagnosticar leucemia, determinar el estado y respuesta al tratamiento de la enfermedad.
- Consecuencias y beneficios de la investigación: al momento de la toma de muestra puede haber dolor. Posterior a la toma de muestra, la aparición de un hematoma. El beneficio será conocer el resultado del diagnóstico de la muestra aportada a la investigación.
- Al presentarse una consecuencia o efecto secundario al paciente, se dará atención médica adecuada.
- De poder tomar decisiones el menor de edad, se tomara en para la autorización del consentimiento informado.
- El padre familia o tutor tiene la obligación de firmar la carta de consentimiento informado.
- De no estar de acuerdo con los datos provistos en esta carta, evitar firmar la autorización de consentimiento informado.

NOTA: En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Investigador Responsable: D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos, Tel. 4431802719. Correo electrónico: sergutica@yahoo.com.mx. Colaboradores: Médico Hematopatólogo. D.C. Martha Eva Viveros Sandoval, Tel. 4432278553. Q.F.B.Daniela Alvarado Coria, Tel. 4432691283. Comisión de Ética de Investigación de la división de estudios de posgrado de Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Dirección: Dr. Rafael Carrillo Esq. Dr. Salvador González Herrejón, Bosque Cuauhtémoc, Col. Centro, Morelia, Mich., C.P. 58000. Tel. 443) 3 12 00 14.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. MAYANI H, FLORES-FIGUEROA E, PELAYO R, *et al.* Hematopoyesis. *Cancerología* 2007; 2: 95–107.
2. ACKERMANN M, LIEBHABER S, KLUSMANN JH, *et al.* Lost in translation: Pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. *EMBO Molecular Medicine* 2015; 7(11): 1388-1402
3. ROSSI D, JAMIESON C, and WEISMANN I. Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell* 2008; 132: 681-696
4. Facts 2014-2015. Leukemia and Linfoma Society. 800.955.4572 (2005) disponible en WWW.LLS.org
5. BUITRÓN-SANTIAGO N, ARTEAGA-ORTIZ L, ROSAS-LÓPEZ A, *et al.* Experiencia del INCMNSZ en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda. Cohorte 2003-2008. *Revista de Investigación Clínica* 2010; 62(2), 100–108.
6. GONZÁLEZ-SALAS W, OLARTE-CARRILLO I. GUTIERREZ-ROMERO M, *et al.* Frecuencia de leucemias agudas en un hospital de referencia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2012; 50(2): 167–171
7. JUH-YEOH A, ARIFFIN A, CHAI E, *et al.* Minimal Residual Disease–Guided Treatment Deintensification for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From the Malaysia-Singapore Acute Lymphoblastic Leukemia 2003 Study. *American Society of Clinical Oncology* 2012; 19: 30
8. PUI CH, ROBINSON L, LOOK A. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* , Volume 371 , Issue 9617 , 1030 - 1043
9. HURTADO R, ESTRADA B, VIVEROS P. Leucemia para el médico general. 2012; 55(2) 11-25
10. GALLEGOS-ARREOLA M, BORJAS-GUTIERREZ C, ZUÑIGA-GONZÁLEZ G, *et al.* Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. In J. M. Mejia-Arangure (Ed.), *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic*. InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/clinical-epidemiology-of-acute-lymphoblastic-leukemia-from-the-molecules-to-the-clinic/pathophysiology-of-acute-lymphoblastic-leukemia> 2013.
11. ROMERO A, JIMÉNEZ R. Leucemias agudas. *Medicina de Familia* 2002; 3(1): 40–48
12. FERNÁNDEZ-CANTÓN SB, LEÓN-ÁLVAREZ G, HERRERA-TORRES M DEL C, *et al.* SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. México: IEPSA, Impresora y encuadernadora Progreso, S.A. de C.V. 2011

13. RUBNITZ JE, PUI CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cancer treat* 2003; Rev, 29 (1):31-44
14. LIU Y, GRIMWADE D. Minimal residual evaluation in myeloid leukaemia. *The Lancet* 2002; 360:160-162
15. CAMPANA D. Applications of cytometry to study acute leukemia: In vitro determination of drug sensitivity and detection of minimal residual disease. *Cytometry* 1994; 18: 68-74
16. VIDRIALES MB, SAN-MIGUEL JF, ORFAO A, *et al.* Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract & Res Clin Haematol* 2003; 16:599-612
17. CAMPANA D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Society of Hematology, Hematology* 2010: 7-12
18. LAYTON-TOVAR C. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación* 2015; 3(1): 85-91
19. GCP Guías de práctica clínica de Diagnóstico y Tratamiento de leucemia Linfoblástica Aguda, 2009
20. PUI CH, EVANS W. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol* 2013; 50(3): 185-196 (2013)
21. ROWE J, TALLMAN M, GILLILAND D. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106(4): 1154-1163
22. PUI CH, ROBINSON L, LOOK A. Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Lancet* Volume 371, Issue 9617 , 1030 – 1043
23. CORTEZ MA, SCRIDEI CA, YUNES JA, *et al.* mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic Leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 53(6):996-1004.
24. CHONA De ARMAS Z, MONTERO-ÁVILA E, INATY -LAMILLO J. Leucemia linfoblástica aguda: Evaluación clínico terapéutica del protocolo total XV modificado. *Hospital universitario de Caracas* 2003-2007. *Arch Venez Puer Ped* 2010 v.73 n.2.
25. BACCARANI M, PANE F, SAGLIO G. Monitoring Treatment Of Chronic Myeloid Leukemia. *Haematologica* 2008; 93: 161-169

26. OBRO N, RYDER L, MADSEN H. *et al.* Identification of residual leukemic cells by flow cytometry in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic Leukemia: verification of leukemic state by flow-sorting and molecular/cytogenetic methods. *Hematologica* 2012; 97(1): 137-141
27. CIUDAD J, ORFAO A. Utilidad del inmunofenotipo en el diagnóstico y el seguimiento de la leucemia linfoblástica aguda del adulto. *Med Clin Monogr* 2007; (Barc); 129(Supl 1):3-14
28. CAMPANA D, COUNSTAN SE. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38: 139-152
29. GABERT J, BEILLARD E, VELDEN V, *et al.* Standardization and quality control studies of real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- A Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003; 17:2318-2357
30. ARTIGAS C, CABRERA M, MELO A, *et al.* Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista Médica Chile* 2006; 134: 1367-1376
31. MRÓZEK K, HARPER D, APLAN P. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23(5): 991-v
32. CROCE C. Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2008 358(5): 502-511
33. SAFFROY R, LEMOINE A, BRÉZILLON P, *et al.* Real time quantitation of bcr-abl transcripts in haematological malignancies *Eur J Haematol.* 2000; Oct; 65(4):258-66
34. O'BRIEN S, THOMAS D, RAVANDI F, *et al.* Outcome of adults with acute lymphoblastic Leukemia after second salvage therapy. *Cancer* 2008; 1; 113(11):3186-91.
35. WIEMELS JL, ALEXANDER FE, CAZZANIGA G, BIONDI A, *et al.* *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29 219-228.
36. ZELENT A, GREAVES M, ENVER T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene.* 2004; 23:4275-4283.

37. DONGEN J, MACINTYRE E, GABERT J, *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13, 1901-1928
38. HOCHHAUS A, CAZZANIGA G, GABERT J, *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17:1013-1034
39. BENÉ M, KAEDA J. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica* 2009; 94(8): 1135-1150
40. ZWAAN M, HEUVEL-EIBRINK MM. Pediatric Acute Myeloid Leukemia. In M. Antica (Ed.), *Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge* 2011; (pp. 235–277). InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/acute-leukemia-the-scientist-s-perspective-and-challenge/pediatric-acute-myeloid-leukemia>
41. ROMAN J, CASTILLEJO J, JIMÉNEZ J, *et al.* Monitorización del ARNm BCR-ABL mediante retrotranscripción PCR en pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula ósea por leucemia aguda linfoblástica con cromosoma Filadelfia positivo. *Med. Clin* 1999; 113: 779-782.
42. ALONSO C., GALLEGO M, ALFARO E, *et al.* Caracterización molecular en la leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria. *Hematología* 2006; 10 (1):8-12
43. PARK S, CHOI J, KANG S, *et al.* Clinical significance of cryptic chromosomal translocations detected by multiplex RT-PCR in patients with acute leukemia 2013; 36 (1) 20-23
44. CAMPANA D. Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009
45. HON CH, RELLING M, DOWNING J. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:1535-48
46. CILLO C, FAIELLA A, CANTILE M, BONCINELLI E. Homeobox genes and cancer. *Experimental Cell Research* 1999; 248: 1-9.
47. CAYADO N, MUÑIZ A, GONZÁLEZ A, *et al.* Estudio del reordenamiento molecular de los genes TEL/AML1 en la leucemia linfocítica aguda. Resultados preliminares. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000; 16(3):206-10
48. AMOR-VIGIL A, GONZÁLEZ-MEDINA Y, CAYADO-GUTIÉRREZ N, MARTÍNEZ-ANTUÑA G. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2012; 28 (4).

49. FLOHR A, SCHRAUDER G, CAZZANIGA R, FISCHER M, *et al.* Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008; 22, 771–782.
50. STAM R. MLL-AF4 driven leukemogenesis: what are we missing?. *Cell Research* 2012; 22, 948-949.
51. Chao G, Xiao-Xi Z, Wei-Jing L, Lei Ci, Wei Z, Shu-Guang L, *y col.* Clinical features, early treatment responses, and outcomes of pediatric acute lymphoblastic leukemia in china with or without specific fusión transcripts: a single institutional study of 1,004 patients.. *Am J. Hematol.* 2013; 87:1022–1027
52. JIMÉNEZ-MORALES S, MIRANDA-PERALTA E, SALDAÑA-ALVAREZ Y, PEREZ-VERA P, *y col.* BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res.* 2008;32 (10):1518-22
53. DANIEL-CRAVIOTO A., GONZALEZ-BONILLA CR, MEJIA-ARANGURE JM, PEREZ-SALDIVAR ML, FAJARDO-GUTIERREZ A, *y col.* Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leuk & Lymph.* 2009;50(8): 1352–1360
54. BHOJWANI D, PEI D, SANDLUND JT, JEHA S, RIBEIRO RC, *y col.* ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia.* 2012;26(2): 265–270
55. RUBNITZ JE, WICHLAN D, DEVIDAS M, SHUSTER J, LINDA SB, KURTZBERG J, *y coll.* Prospective analysis of TEL gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2008; 26(13):2186–2191.
56. LOH ML, GOLDWASSER MA, SILVERMAN LB, POON WM, VATTIKUTI S, CARDOSO A, *y col.* Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *Blood.* 2006; 107(11):4508–4513.
57. PEI-CHIN L, TAI-TSUNG C, SHIU-RU L, SHYH-SHIN C, REN-CHIN J, Y JIUNN-MING S. TEL/AML1 fusion gene in childhood acute lymphoblastic leukemia in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* 2008;24(6):289-96

58. MIGNON L, GOLDWASSER M, SILVERMAN L, POON W, VATTIKUTI S, *y col.* Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. *BLOOD*, 2006; 107 (11): 4508-13

59. BOROWITZ MJ, DEVIDAS M, HUNGER SP, BOWMAN WP, CARROLL A, *y col.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *BLOOD*, 2008;; 111, (12):5477.85

60. CONTER V, BARTRAM C, GRAZIA-VALESCCHI M, SCHRAUDER A, *Ky col.* Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *BLOOD*.2010;115 (16): 3206-14

61. AHMAD-REZA , FARHAD Z, MINA I, SHAHLA A, MD; BEHZAD, *y col.* Prevalence of ETV6/RUNX1 Fusion Gene in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Iran. *Iran J Pediatr.* 2013; 23 (6):681-68

62. YANADA M, BORTHAKUR M, GARCIA-MANERO G, RAVANDI F, FADERL S, PIERCE S. *y col.* Blood counts at time of complete remission provide additional independent prognostic information in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2008 ; 32(10): 1505–1509