



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**“IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE FUSIÓN *PML/RAR α* Y *CBF β /MYH11*
EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA”**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

Heriberto Santander Lucio

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Sergio Gutiérrez Castellano

CO-DIRECTOR

Dra. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja

Morelia, Mich. Enero 2017

CONTENIDO

Índice general.....	li
Índice de figuras.....	Iv
Índice de tablas.....	V
Abreviaturas.....	Vi
Resumen.....	Vii
Abstract.....	viii

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HEMATOPOYESIS.....	2
1.1.1 Bases moleculares de la hematopoyesis.....	4
1.2 LEUCEMIA AGUDA.....	5
1.2.1 Definición.....	5
1.2.2 Leucemogénesis.....	5
1.2.3 Epidemiología.....	8
1.2.4 Manifestaciones clínicas.....	9
1.2.5 Clasificación y diagnóstico de la leucemia.....	9
1.2.5.1 FAB.....	9
1.2.5.2 Leucemia Linfoblástica Aguda.....	10
1.2.5.3 Leucemias mieloblástica aguda.....	10
1.2.5.4 Morfología.....	11
1.2.5.5 Citoquímica.....	11
1.2.5.6 Inmunofenotipo.....	12
1.2.5.7 Genética.....	13
1.2.5.8 Análisis molecular.....	14
1.2.5.8.1 LMA con t(8;21)(q22;q22)(<i>AML1/ETO</i>).....	14
1.2.5.8.2 LMA con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22)(<i>CBFβ/MYH11</i>)..	14
1.2.5.8.3 LMA con t(15;17)(q22;q21)(<i>PML/RARα</i>).....	16
1.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	18
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. HIPOTESIS.....	22
V. OBJETIVOS.....	23
5.1. General.....	23
5.2. Específicos.....	23
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
6.1 UNIVERSO DE TRABAJO.....	24

6.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	24
6.2.1 Pacientes a estudiar.....	24
6.2.2 Controles positivos.....	24
6.2.3 Controles negativos.....	24
6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	24
6.3.1. Criterios de inclusión.....	24
6.3.2. Criterios de no inclusión.....	24
6.3.3 Criterios de exclusión.....	24
6.4 MÉTODOS.....	25
6.4.1 Recolección de las muestras.....	25
6.4.2 Purificación de glóbulos blancos.....	25
6.4.3 Conteo de células y evaluación de la viabilidad.....	26
6.4.4 Extracción del RNA total por el método TriPure.....	26
6.4.5 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA.....	27
6.4.6 Verificación de la integridad del RNA.....	27
6.4.7 Síntesis de cDNA.....	27
6.4.8 Gen control <i>abl</i> normal.....	28
6.4.9 Condiciones de PCR y amplificado de los transcritos de fusión.....	28
6.4.9.1 Método 1.....	28
6.4.9.2 Método 2.....	29
6.4.10 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
VII. RESULTADOS.....	31
7.1 Recolección de las muestras.....	31
7.2 Conteo de células y evaluación de la viabilidad.....	31
7.3 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA.....	31
7.4 Verificación de la integridad del RNA.....	31
7.5 Gen control <i>abl</i> normal.....	32
7.6 Condiciones de PCR y Amplificado de los transcritos de fusión.....	33
7.6.1. t(15;17) (q22;q21) <i>PML/RARα</i>	33
7.6.2 inv (16) (p13;q22) <i>CBFβ/MYH11</i>	34
VIII. DISCUSIÓN.....	35
IX. CONCLUSIÓN.....	37
X. BIBLIOGRAFÍA.....	38
XI. ANEXOS.....	44
XI. A Consentimiento informado.....	44
XI. B Datos generales.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación esquemática de la hematopoyesis normal.....	3
Fig. 2. Reguladores transcripcionales en el programa de desarrollo hematopoyético definitivo.....	4
Fig. 3. Modelo de leucemogénesis en la leucemia mieloide aguda.....	6
Fig. 4. Proteínas de fusión y desregulación epigenética.....	7
Fig. 5. Distribución de neoplasias malignas en México.....	8
Fig. 6. Pasos sugeridos en el análisis de un aspirado de medula ósea para establecer el diagnóstico.....	11
Fig. 7. <i>AML1/ETO</i> funciona como represor o un activador de la transcripción.....	15
Fig. 8. Representación esquemática de los intrones y exones de los genes <i>AML1</i> y <i>ETO</i> involucrados en la t(8;21)(q22;q22).....	16
Fig 9. Representación esquemática de los intrones y exones del gen <i>MYH11</i> involucrados en la inv(16)(p13;q21).....	17
Fig 10. Representación esquemática de los intrones y exones de los genes <i>PML</i> y <i>RARA</i> involucrados en la t(15;17)(q22;q21).....	18
Fig 11. Esquema general de trabajo.....	25
Fig 12. Integridad del RNA.....	32
Fig 13. Productos de PCR del gen <i>abl</i>	32
Fig 14. Gel de electroforesis de los productos de PCR método 1.....	33
Fig 15. Gel de electroforesis t(15;17) (q22;q21) <i>PML/RARα</i>	34
Fig 16. Gel de electroforesis para el gen de fusión <i>CBFβ/MYH11</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comportamiento citoquímico de las leucemias mieloblástica agudas (FAB).....	12
Tabla 2. Principales anormalidades cromosómicas en LAs.....	13
Tabla 3. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la t(15;17)(q22;q21) con el gen de fusión <i>PML/RARα</i>	29
Tabla 4. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la t(15;17)(q22;q21) con el gen de fusión <i>PML/RARα</i>	30
Tabla 5. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la inv(16)(p13;q;22) con el gen de fusión <i>CBFβ/MYH11</i>	30

ABREVIATURAS

ABL	Homólogo de oncogén viral de la leucemia murina de Abelson
AML1	Gen de Leucemia Mieloide Aguda 1
BCR	Región punto de corte
BrEt	Bromuro de etidio
CBF	Factor de unión al núcleo
CBFα	Subunidad α del CBF
CBFβ	Subunidad β del CBF
CD	Cúmulo de diferenciación
CEBPA	Proteína α de unión al potenciador CCAAT
c-Kit	Factor de crecimiento Kit de la célula madre
CLP	Progenitor común linfoide
CMP	Progenitor común mieloide
cDNA	Acido Desoxirribonucleico complementario
DNMT	DNA metil transferasa
dNTP	Desoxinucléotido trifosfato
FLT3	Tirosina kinasa 3 relacionada a fms
GATA 1	Proteína de unión a GATA
HSC	Célula tronco hematopoyética
LA	Leucemia aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LTR	Reconstitución a largo plazo
MMP	Progenitor multipotente
MYH11	Cadena pesada de miosina del musculo liso
NCOR	Correpresor nuclear
NPM1	Nucleofosmina 1
PBS	Solución amortiguadora de fosfato
PB	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RARα	Receptor alfa del ácido retinoico
PML	Leucemia promielocítica aguda
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	PCR acoplado a transcripción inversa
RUNX1	Factores de transcripción relacionados a Runt 1

RESUMEN

Palabras claves: hematopoyesis, leucemia mieloblástica aguda, genes de fusión, *AML1/ETO*, *PML/RAR α* , *CBF β /MYH11*.

Introducción: La caracterización molecular de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) permite al médico tener información adicional sobre el pronóstico y evolución de la enfermedad, así como el tratamiento más adecuado. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la LMA con anomalías genéticas recurrentes t(8;21) (q22;q22) *AML1/ETO*, t(15;17) (q22;q21) *PML/RAR α* e inv (16) (p13;q22) *CBF β /MYH11*, son considerados de buen pronóstico.

Objetivo: Evaluar la expresión de los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11* en pacientes con leucemia mieloblástica aguda.

Materiales y métodos: Se tomaron muestras de médula ósea o sangre periférica de 14 pacientes con LMA, se purificaron los leucocitos mediante lisis de eritrocitos. Se aisló el RNA por el método de Tripure, se generó el cDNA y se buscaron los genes de fusión mediante PCR y PCR anidada.

Resultados: Se incluyeron 6 pacientes con LMA-M3 y 8 pacientes con LMA-M4. Se amplificó el gen control ABL y sólo se logró identificar en 10 casos y sólo en estos casos se sometieron a la búsqueda de los genes de fusión. De los 4 casos con LMA-M3 analizados, 2 expresaron el gen de fusión *PML/RAR α* , isoforma bcr1 y bcr3. De los 6 casos de LMA-M4, sólo uno expresó el gen de fusión *CBF β /MYH11*, isoforma A.

Conclusiones: Se lograron establecer las condiciones de RT-PCR para la identificación de ambos genes de fusión. La frecuencia de expresión de los genes de fusión *PML-RAR α* y *CBF β -MYH11* fueron inferiores a los reportados en la literatura. Esto se debió probablemente al tamaño de la muestra y que varias de las muestras provenían de pacientes con tratamiento.

ABSTRACT

Key words: hematopoiesis, acute myeloid leukemia, fusion genes, *AML1/ETO*, *PML/RAR α* , *CBF β /MYH11*.

Introduction: Molecular characterization of patients with acute myeloid leukemia (AML) provide to doctors additional information about prognosis and evolution of the disease, as well as the proper treatment. According to the World Health Organization (WHO), the AML with recurrent genetic abnormalities t(8;21) (q22; q22) *AML1/ETO*, (q21; q22) t(15;17) *PML/RAR α* and inv (16) (p13; q22) *CBF β -MYH11*, are considered as good prognosis.

Objective: To evaluate the expression of fusion genes *PML/RAR α* and *CBF β /MYH11* in patients with acute myeloid leukemia.

Material and methods: Samples of bone marrow or peripheral blood of 14 patients with AML, were taken, and leukocytes were purified. RNA was isolated by Tripure method, cDNA was generated and fusion genes were detected by PCR and nested PCR.

Results: Were included 6 patients with AML-M3 and 8 patients with AML-M4. Was amplified the control gene *ABL* in 10 cases and only in these cases were submitted into the search of the fusion genes. Of the 4 cases with AML-M3 analyzed, 2 expressed the bcr1 and bcr3 isoforms of the gene fusion *PML/RAR α* . Of the 6 cases of AML-M4, only one expressed the fusion gene *CBF β /MYH11*, A isoform.

Conclusions: We established the conditions of RT-PCR for identification of both fusion genes. The frequency of expression of the fusion genes *PML/RAR α* and *CBF β /MYH11* were lower than reported in the literature. This is due probably to the small size of the samples, and that several of them came from patients with treatment.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se le atribuyen 7,9 millones de defunciones ocurridas en 2007.^(1,2) En 2016, se estima que habrá 1,685,210 nuevos casos de cáncer y un estimado de 595,690 personas morirán de esta enfermedad. A nivel nacional la leucemia representa el 5.6% de las muertes por tumores malignos y el 0.7% sobre el total de defunciones.⁽³⁾

La leucemia mieloide aguda (LMA), el segundo tipo de leucemia más frecuente en niños después de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), tiene una incidencia que aumenta con la edad.⁽⁴⁾

La patogénesis molecular de la LMA ha sido estudiada con el uso de análisis citogenético durante más de tres décadas. Variaciones estructurales cromosómicas recurrentes están bien establecidas como marcadores de diagnóstico y pronóstico, lo que sugiere que las anomalías genéticas adquiridas (es decir, las mutaciones somáticas) tienen un papel esencial en la patogénesis.^(5,6) Estas variaciones estructurales resultan en la generación de proteínas de fusión quiméricas que en la mayoría de los casos funcionan como reguladores transcripcionales. Estos incluyen *AML1/ETO*, *CBFβ/MYH11*, *PML/RARα*, *MOZ/CBP*, *MORF/CBP*, *MOZ/TIF2* y *MLL*. Todos ellos contribuyen a la leucemogénesis, al menos en parte causando desregulación transcripcional a través de modificaciones epigenéticas.⁽⁷⁾ El diagnóstico oportuno de la LMA se basa en trabajos multidisciplinarios que implican la morfología, citometría de flujo, citogenética y los análisis de genética molecular. Además, los avances en la genómica del cáncer han identificado que muchas de estas mutaciones pueden definir un pronóstico claro y/o la importancia terapéutica.⁽⁸⁾

1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es un proceso continuo de producción de células sanguíneas, que ocurre a través de la proliferación, auto renovación, diferenciación y maduración orquestadas de las células tronco hematopoyéticas en la médula ósea, seguida por el egreso de la progenie madura a la circulación sanguínea.⁽⁹⁾

Durante el desarrollo embrionario, el proceso se inicia en el saco vitelino, en las llamadas islas sanguíneas. Conforme progresa el desarrollo del embrión, la formación de las células sanguíneas continúa predominante en el hígado y después del nacimiento la médula ósea asume el proceso de hematopoyesis.⁽¹⁰⁾

Como la mayoría de las células sanguíneas maduras tienen una vida útil limitada, las células continuamente deben ser generadas a lo largo de la vida. En un adulto sano, esto resulta en la producción estimada de aproximadamente 10^{10} nuevas células sanguíneas por hora.⁽¹¹⁾ Los diversos tipos de células sanguíneas maduras se originan de una población heterogénea de células que residen en la médula ósea, denominadas células tronco hematopoyéticas (*del ing. Hematopoietic Stem Cell-HSC*). Estas células han sido caracterizadas por dos propiedades principales: multipotencialidad y autorrenovación.^(12,13) La multipotencialidad es definida por la capacidad de una simple célula de generar a todas las células hematopoyéticas maduras, este hecho fue estudiado *in vitro* por protocolos de diferenciación clonal.⁽¹³⁾ La autorrenovación, es la propiedad que permite el mantenimiento del pool de las HSC, probablemente a través de una división celular asimétrica, así, cuando una HSC se divide al menos una de las células hijas debe autorrenovarse para evitar la depleción de células troncales, la otra sencillamente sigue su etapa de diferenciación y maduración, este hecho fue evaluado *in vivo* por experimentos de reconstitución a largo plazo (*del ing. Long Term Reconstitution-LTR*).^(13,14)

En un proceso estrictamente regulado, la HSC multipotente se puede dividir en LT-HSC (*del ing. Long Term-HSC*), una célula con alta capacidad de autorrenovación que puede reconstituir un animal para toda su vida útil, o ST-HSC

(del *ing.* Short Term-HSC), con capacidad de reconstituir un animal durante un periodo limitado. La ST-HSC puede diferenciarse en un progenitor multipotente (MPP), que pierde la capacidad de auto-renovación, pero tiene la capacidad de diferenciarse en progenitores oligolinaje que finalmente dan lugar a la progenie diferenciada a través de los pasos de maduración “funcionalmente irreversibles”. El progenitor linfoide común (CLP) da lugar a los linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales (NK). El progenitor mieloide común (CMP) da lugar al progenitor de granulocitos y monocitos (GMP), y al progenitor eritroide-megacariocítico (MEP), que luego se diferencian en los monocitos/macrófagos y granulocitos y megacariocitos/plaquetas y eritrocito, respectivamente. Se cree que tanto CMP y CLP pueden dar lugar a células dendríticas. Todas estas poblaciones madre y progenitoras son separables como poblaciones puras mediante el uso de marcadores de superficie celular (Fig. 1).⁽¹⁵⁻²¹⁾

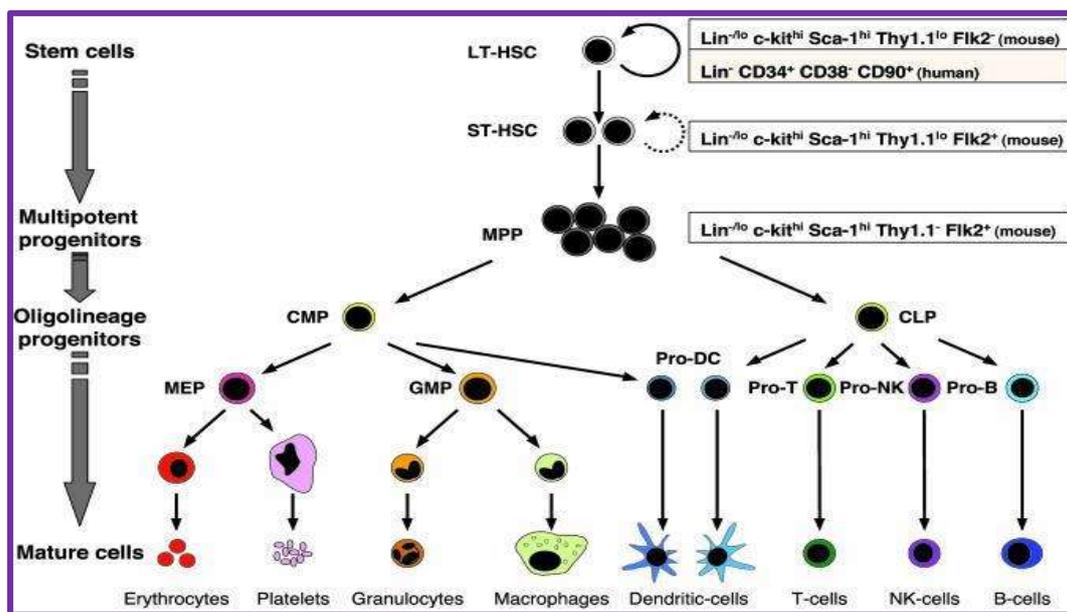


Figura 1. Representación esquemática de la hematopoyesis normal. La HSC se puede dividir en LT-HSC, o ST-HSC. La ST-HSC puede diferenciarse en un MPP, que pierde la capacidad de auto-renovación, pero tiene la capacidad de diferenciarse en progenitores oligolinaje que finalmente dan lugar a la progenie diferenciada. El CLP da lugar a los LT, LB y NK. El CMP da lugar a GMP, que luego se diferencian en los monocitos / macrófagos y granulocitos, y al MEP, que producen megacariocitos / plaquetas y eritrocitos. Tomado de Passegué E. y col, 2003.⁽²¹⁾

1.1.1 Bases moleculares de la hematopoyesis

Gracias a los avances en Biología molecular, genómica y ahora también la epigenética, se ha podido comprender mejor los mecanismos moleculares de este proceso. Se ha establecido que Runx1 (también conocido como Aml1 o Cbf α 2), perteneciente a la familia de factores de transcripción relacionados a Runt (RUNXs), es uno de los principales reguladores de la hematopoyesis.⁽²²⁾

Para estudiarlo a fondo Okuda y col (1996) generaron un ratón deficiente (*knockout*) en Runx1 y descubrieron que esta perturbación genética es embrionariamente letal. Por otro lado, cuando el ratón se examinó de cerca había señales de la hematopoyesis primitiva, pero no de la hematopoyesis definitiva.⁽²²⁾ Runx1 fue así establecido como un factor de transcripción clave en el programa de desarrollo hematopoyético definitivo. Otros reguladores transcripcionales que actúan río arriba de Runx1 incluye el complejo de proteínas Ldb1, Lim 2, Scl y GATA 2, que impulsan la expresión de Runx1 (Fig. 2).^(23, 24)

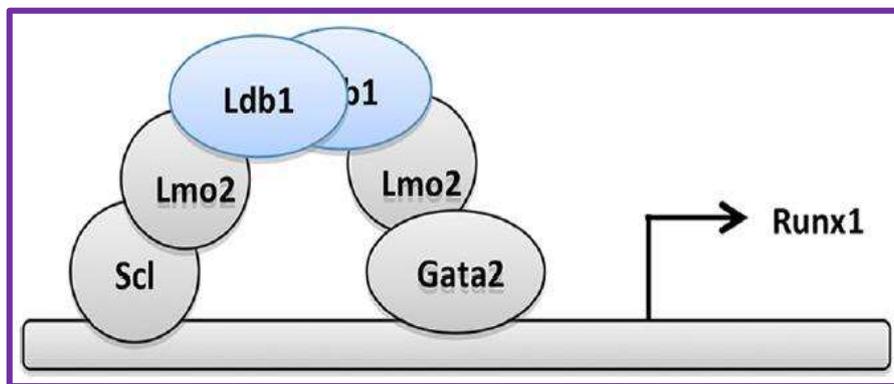


Figura 2. Reguladores transcripcionales en el programa de desarrollo hematopoyético definitivo. El dominio de unión a Lim 1 (Ldb1) estabiliza un complejo de factores de transcripción con motivo de Lim 2 (Lmo2), stem cell leukemia (Scl) y proteína de unión a GATA caja 2 (GATA2). Durante la diferenciación hematopoyética, este complejo induce la expresión de la proteína Runx1, que es necesaria para la hematopoyesis definitiva. Tomado de Liang & Zúñiga-Pflücker, 2015.⁽¹⁰⁾

La deficiencia en Ldb1 abroga la expresión de Runx1.⁽²³⁾ Por otra parte, la ausencia de la proteína Scl conduce a una reorientación del programa de desarrollo hematopoyético hacia el linaje del músculo liso cardíaco.^(25, 26) Por último, la pérdida de la función de la proteína de unión a GATA 2 también

resulta en la letalidad embrionaria.⁽²⁷⁾ Los factores río abajo de Runx1 son factores de transcripción que desempeñan distintos papeles en los programas de desarrollo eritroide, mieloide y linfoides tales como la proteína de unión a GATA 1 (factor de transcripción de globina 1), proteína de unión a PU.1 (SPI1) y el propio Runx1, respectivamente.⁽²⁸⁻³⁰⁾

Estos genes también están involucrados en la diferenciación de linaje. Se sabe que niveles altos en la expresión de PU.1 se asocian con la diferenciación granulocítica, mientras que su baja expresión se asocia con diferenciación hacia el linaje eritroide. PU.1 junto con los factores de transcripción GATA 1, GATA 2 y FOG, son esenciales para la maduración y diferenciación eritroide y megacariocítica.⁽³¹⁾

1.2 LEUCEMIA AGUDA

1.2.1 Definición

Se define a la leucemia aguda (LA) como un desorden clonal heterogéneo de las células madre/progenitor hematopoyético caracterizado por el crecimiento anormal de glóbulos blancos inmaduros (blastos) que se acumulan en la médula ósea e interfiere con la producción de las células sanguíneas normales.⁽³²⁻³⁴⁾ De manera general se clasifican según el linaje de la célula progenitora afectada en leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA).^(34,35)

1.2.2 Leucemogenesis

Nuestro entendimiento de la leucemogenesis ha sido sustancialmente apoyado por el descubrimiento de las translocaciones cromosómicas que transforman a la célula hematopoyética normal en una célula leucémica.⁽⁷⁾ Las variaciones estructurales cromosómicas recurrentes (p. ej., t(15;17), t(8;21), inv (16), t(9;21), t(9;11), del5, del7, etc.) están bien establecidos como marcadores de diagnóstico y pronóstico, lo que sugiere que las anomalías genéticas adquiridas tienen un papel esencial en la patogénesis.⁽³⁶⁻³⁷⁾ Sin embargo, casi

el 50% de las muestras de AML tienen un cariotipo normal y muchos de estos genomas carecen de anomalías estructurales, lo que lleva a pensar que debe haber otras de mutaciones que, en conjunto, causen las leucemias.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

Técnicas de secuenciación selectiva han identificado mutaciones recurrentes en *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *CEBPA*, y *TET2*.⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾

En 2002, Kelly y Gilliland introdujeron el modelo de “dos golpes” (*del ing.* two-hit), este modelo plantea la hipótesis de que las leucemias son el resultado de una colaboración entre al menos dos tipos de mutaciones que ocurren en una CPH.⁽⁴⁷⁾ Las mutaciones de tipo I, ejemplificados por la activación constitutiva de la tirosin quinasa o sus efectores río abajo (*del ing.* downstream), tales como *BCR/ABL*, *TEL/PDGFR*, *N-RAS*, *K-RAS*, o *FLT3* confieren una ventaja proliferativa y/o supervivencia a las células hematopoyéticas. Cuando estos genes mutados se expresan solos, confieren un fenotipo parecido a leucemia mieloide crónica caracterizado por una leucocitosis, pero con una maduración y función normal en las células (Fig. 3).⁽⁴⁷⁾

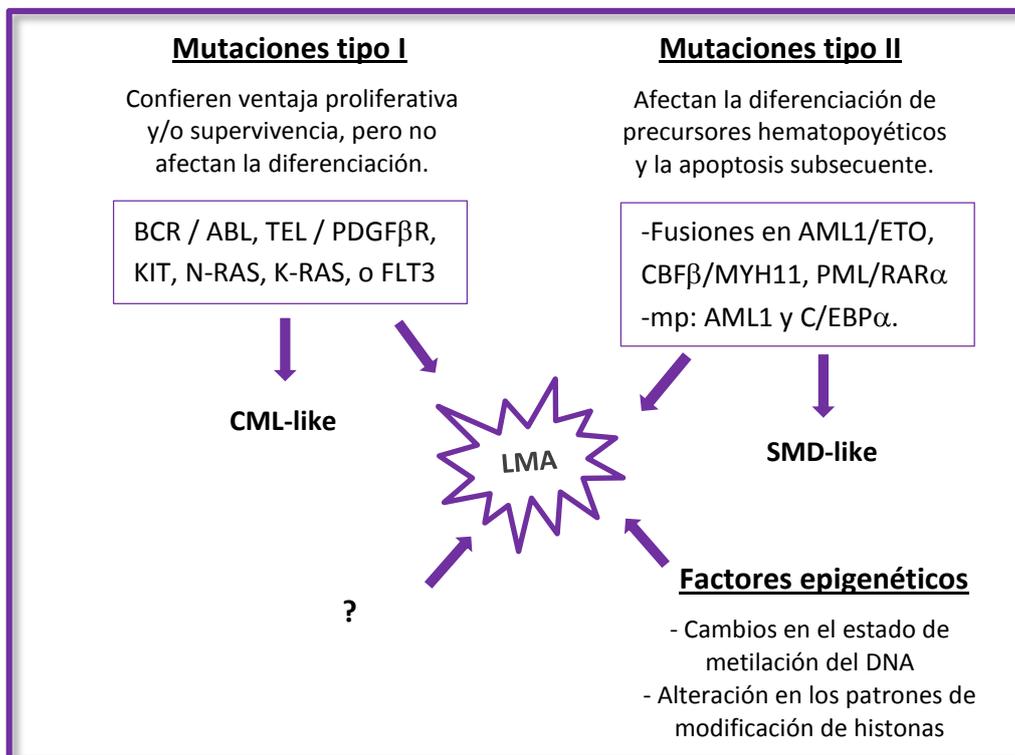


Figura 3. Modelo de leucemogénesis en la leucemia mieloide aguda. Este modelo plantea que deben ocurrir al menos dos tipos de mutaciones (tipo I y tipo II) para que se exprese un fenotipo clínico de LMA. SMD; Síndrome Mielodisplásico. CML; Leucemia Mieloide Crónica. MP; mutación puntual. *Adaptado de Kelly LM, Gilliland DG 2002.*⁽⁴⁷⁾

Las mutaciones tipo II son típicamente translocaciones recurrentes que confieren pérdida de la función en factores de transcripción importantes para la diferenciación y maduración de progenitores hematopoyéticos tempranos, tales como *AML1/ETO*, *CBFβ/MYH11*, *PML/RARα*, *TEL/AML1*, *TCF3/PBX1* y *NUP98/HOXA9*, así como mutaciones puntuales de los factores de transcripción *AML1* y *C/EBPα*. Estas mutaciones podrían perjudicar la apoptosis subsecuente en células que no se someten a diferenciación terminal. Cuando estas mutaciones se expresan solas, confieren un fenotipo más parecido a SMD.^(47,48) Sin importar el momento o el orden de adquisición de las mutaciones, los individuos que acumulen ambos tipos de mutaciones tienen un fenotipo clínico de LMA caracterizado por una proliferación y/o ventaja de supervivencia de las células y por alteración de la diferenciación hematopoyética (Fig. 3).

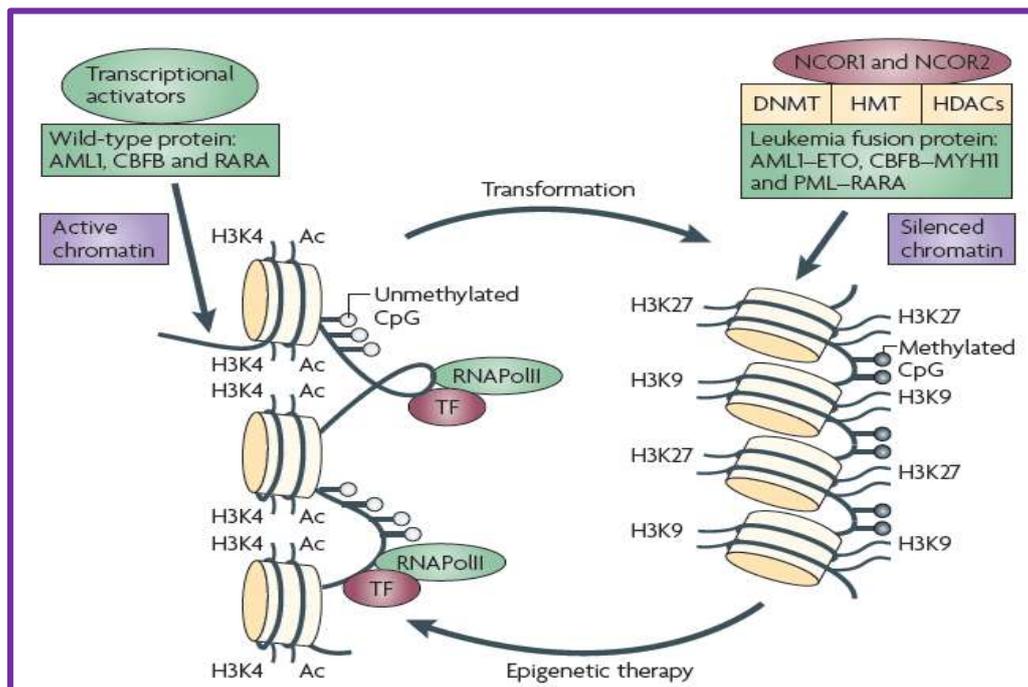


Figura 4. Proteínas de fusión y desregulación epigenética. Las proteínas de fusión *AML1/ETO*, *CBFβ/MYH11* y *PML/RARα* reclutan complejos de co-represores transcripcionales (incluyendo co-represor 1 de receptor nuclear (NCOR1) y NCOR2) que resultan en la pérdida de acetilación de histonas y metilación del DNA, de este modo la cromatina se mantiene una estructura cerrada. Esto conduce al silenciamiento transcripcional de varios genes target, incluyendo genes cruciales para la diferenciación hematopoyética. Ac, Acetilación de histona; CpG, residuos de citocinas que preceden a guanina; DNMT, DNA metiltransferasa; HDAC, histona deacetilasa; HMT, histona metiltransferasa; RNAPolII, RNA polimerasa II; TF, factor de transcripción. Tomado de Jianjun Chen y col, 2010.⁽⁷⁾

Las modificaciones epigenéticas, que incluyen metilación del DNA, desmetilación del DNA y cambios en las histonas, conducen a la activación o represión de la expresión de los genes. Se ha observado que cambios epigenéticos aberrantes ocurren frecuentemente en las leucemias agudas. Los genes de fusión resultado de las translocaciones cromosómicas pueden ser reguladores de la maquinaria epigenética (Fig. 4).⁽⁷⁾

1.2.3 Epidemiología

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En el caso México solo es superado por las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.⁽⁴⁹⁻⁵³⁾ Sin embargo la información en nuestro país era escasa hasta la creación del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM). En 2012 Meneses García y col, realizaron un estudio descriptivo observacional de los casos registrados en el RHNM de 1993-2002, con un total de 767,464 casos nuevos, de los cuales las leucemias se registraron 17,187 que representan el 2% de las mismas (Fig. 5). En este mismo estudio se concluye que las neoplasias malignas muestran una tendencia ascendente y directamente proporcional a la edad, en lo que respecta a las leucemias hay una mayor incidencia en la zona norte y centro del país.⁽⁵⁴⁾ Hoy en día se puede estimar que las leucemias representan entre 3.5 y 4% del total de las neoplasias malignas.⁽⁵⁵⁾

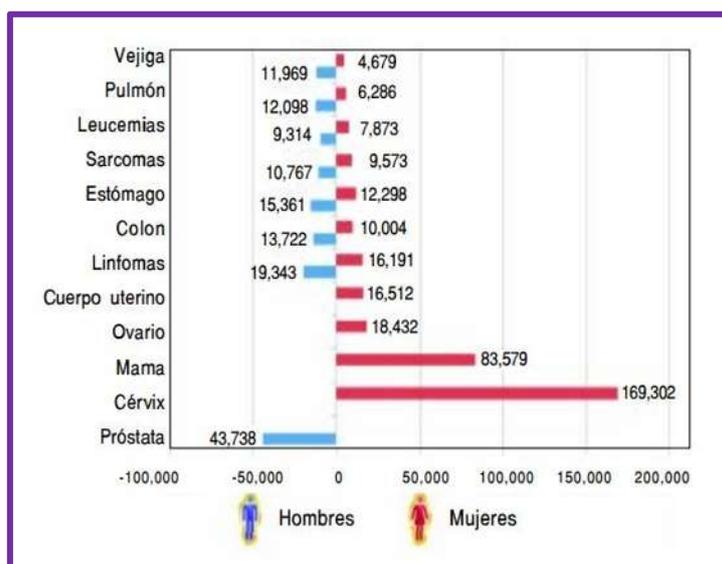


Figura 5. Distribución de neoplasias malignas en México (1993-2002). Se muestran las principales neoplasias malignas más frecuentes registradas en el RHNM en la década de 1993-2002. Obsérvese que en el caso de las leucemias hay una mayor incidencia en hombres que en mujeres. Tomado de Meneses-García y col, 2012.⁽⁵⁴⁾

1.2.4 Manifestaciones clínicas

La presentación de los síntomas en la leucemia es variable y con frecuencia repentina. Surgen principalmente por inhibición de la formación de células sanguíneas funcionales, debido a la acumulación de blastos leucémicos en la medula ósea. El 80% de pacientes presenta anemia de intensidad variable, de tipo normocítica-normocrómica, que se manifiesta con palidez, fatiga y dolor de cabeza. La trombocitopenia se registra en el 80-90% de casos, con un 40-60% de pacientes que manifiestan signos hemorrágicos en el momento del diagnóstico, más frecuente si la cifra de plaquetas es inferior a $20 \times 10^9/L$. La fiebre también es una característica frecuente y se debe, mayoritariamente, a una etiología infecciosa. Presentan neutropenia entre el 30 y 50% de enfermos y es la máxima causante de las infecciones. Los blastos pueden infiltrar otros órganos, tales como hígado, bazo y testículos causando organomegalia y al sistema nervioso central (SNC) o presentarse esporádicamente como masas leucémicas localizadas (cloromas).^(33, 34, 56)

1.2.5 Clasificación y diagnóstico de la leucemia

1.2.5.1 FAB

La clasificación de las leucemias agudas que ha gozado de mayor difusión y aceptación en el ámbito hematológico internacional fue elaborada en 1976 por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB). Esta clasificación se basa en el aspecto morfológico, línea celular afectada, grado de maduración, y comportamiento citoquímico de las células blásticas antes de establecer cualquier terapéutica. Posteriormente, con el uso de anticuerpos, se pudo establecer el inmunofenotipo de la leucemia; de esta forma, fue posible subclasificar a las LMAs en 8 categorías; una leucemia aguda con mínima diferenciación mieloide o M0, tres de componente neutrófilo (M1, M2, M3), una de componente neutrófilo-monocítico (M4), una monocítica (M5), una mieloeritroide (M6) y una variedad denominada leucemia megacarioblástica aguda o M7. Las LLAs tanto del linaje B como T, las divide en tres categorías morfológicas: L1, L2 y L3.^(35,57)

1.2.5.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

La clasificación FAB describe tres subtipos morfológicos (L1, L2 y L3), teniendo sólo un valor histórico debido a que no son subgrupos biológicamente relevantes y su valor como factor pronóstico es limitado. La clasificación actual de la LLA se basa en el inmunofenotipo la cual identifica al menos ocho subtipos, correspondiendo cuatro de LLA de estirpe B (LLA-B) y cuatro para la estirpe T (LLA-T).⁽³⁵⁾

En principio, todos los casos de LLA son positivos a la desoxinucleotidil transferasa (TdT), con todos los blastos precursores de LLA-B también expresando CD79 en su citoplasma (CD79c⁺) y todos los LLA-T mostrando expresión citoplasmática de CD3 (CD3c⁺).⁽³⁵⁾

Los sistemas de clasificación inmunológicos en la LLA en cierto modo imitan la diferenciación normal de las células linfoides precursoras. Por lo tanto, los nombres de los subgrupos particulares de LLA se relacionan al estadio de diferenciación de las contrapartes normales de las células leucémicas.⁽⁵⁸⁾

1.2.5.3 Leucemias mieloblástica aguda

En la clasificación de las LMA del FAB, se realiza un conteo celular diferencial en medula ósea y si se registran menos del 50% de precursores de glóbulos rojos, sobre el total de células medulares y el 30% o más de células blásticas (a diferencia del 20%, según la clasificación de la OMS), también sobre el total de celular, se diagnostica una leucemia mieloide aguda, variedades M0, M1-M5 y M7.^(57,59) Por el contrario, si hay un 50% o más de eritroblastos, sobre el total de células medulares, pero menos del 30% de blastos (a diferencia del 20% de la clasificación de la OMS) sobre un total de células no eritroides, el diagnóstico resultante es un SMD. Solo en el caso de que exista una eritroblastosis del 50% o más y la cifra de blastos mieloides, calculada sobre el total de células no eritroides iguale o supere el 30% (el 20% según la clasificación de la OMS), puede establecerse el diagnóstico de variedad M6 (Fig. 6).^(35,57,59,60)

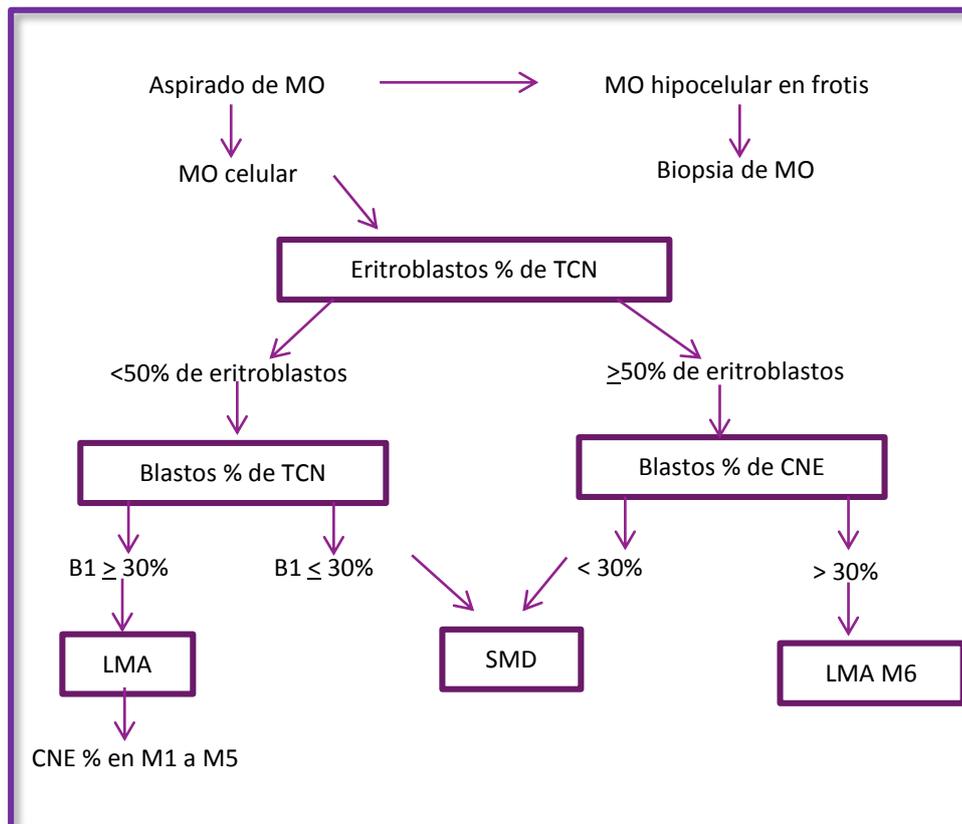


Figura 6. Pasos sugeridos en el análisis de un aspirado de médula ósea para establecer el diagnóstico. MO; médula ósea, TCN; todas las células nucleadas, CNE; células no eritroides, B1; células blásticas. Adaptado de McKenzie (2002).⁽³⁵⁾

1.2.5.4 Morfología

Respecto a la morfología, aparte de la asignación a una variedad concreta, se debe comentar el significado clínico de la presencia de signos morfológicos displásicos. La mielodisplasia que afecta simultáneamente a las líneas eritroides, granulocítica y megacariocítica se observa en el 12-15% de leucemias agudas *de novo*. Los pacientes con morfología mielodisplásica son clasificados, con mayor frecuencia, en la variedad M6, M7 y M4 y prácticamente nunca en la variedad M3. El porcentaje de remisión completa (RC) es menor en las leucemias mieloides con estas características.^(35,57)

1.2.5.5 Citoquímica

La citoquímica utilizada para ayudar a tipificar el linaje de una leucemia se centra básicamente en las tinciones de la mieloperoxidasa (MPO), negro Sudán

y esterasas. La presencia del más del 3% de blastos MPO positivos permite verificar su filiación como Mieloblastos. Junto con ellas, en algún caso se utiliza la reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) y la peroxidasa plaquetar a nivel ultraestructural (Tabla 1).^(57,61-63)

Tabla 1. Comportamiento citoquímico de las leucemias mieloblástica agudas (FAB)

Reacción citoquímica	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Mieloperoxidasa	-	+	++	+++	++	-/+	+	-
Negro Sudán B	-	+	++	+++	++	-/+	+	-
Cloroacetatoesterasa	-	-/+	++	+++	-/+	-	+	-
Glucógeno PAS	-	+d	+d	+d/m	+d	+d/m	+d/m	+m
Esterasas inespecíficas (FNa sensibles)	+/-	-	-	-	+	++	-	+
Fosfatasa ácida tartrato-sensible	-	+d	+d	+d	+d	++d	+d	++
Betaglucuronidasa	-	+d	+d	+d	+d	++d	++d	

-/+, +/-, +, ++, +++: diferentes grados de positividad; d: difuso; m: mazacotes; FNa: fluoruro sódico.

1.2.5.6 Inmunofenotipo

La caracterización inmunofenotípica se lleva a cabo mediante una batería de anticuerpos monoclonales, algunos de estos reaccionan con antígenos bien definidos, específicos para una determinada línea celular e, incluso, para un estado madurativo concreto, otros son menos restrictivos, pero, cuando se emplean como parte de una serie, también presentan una valiosa contribución diagnóstica y pronóstica al delimitar nuevas variantes y reconocer leucemias con marcadores linfoides y mieloides. El uso de 2 ó 3 anticuerpos para cada una de las principales estirpes (B, T y mieloides) permite establecer una clasificación inmunológica de las leucemias agudas, que identifica correctamente la estirpe en un 98-99% de casos; precursores hematopoyéticos (CD34, HLA-DR, TdT, CD45), línea B (CD19, CD20, CD22, CD79a), línea T (CD2, CD3, CD5, CD7), mieloides (CD13, CD33, CD15, MPO, CD117), línea megacarioblástica (CD41, CD61), línea eritroblástica (CD36, CD71, antiglicoforina A y C).^(64,65)

1.2.5.7 Genética

La citogenética ofrece una valiosa información desde el punto de vista etiológico, pronóstico y terapéutico (tabla 2). Para el análisis citogenético se prefiere el estudio de la medula ósea al de sangre periférica, se utilizan cultivos cortos de 24 a 48 horas, e identificación cromosómica con técnica de bandeo y debe examinarse una cantidad suficiente de metafases (20 a 30). Estos estudios se complementan con técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La gran mayoría de las alteraciones típicas de la LMA son reordenamientos equilibrados o balanceados y mucho de ellos se conoce su equivalente molecular o gen de fusión, que pueden ser detectados mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa inversa (RT-PCR) de manera rutinaria.⁽⁶⁶⁾

Tabla 2. Principales anomalías cromosómicas en LAs.⁽⁷⁾

FAB	Anormalidad cromosómica	Alteraciones moleculares (genes involucrados)	Frecuencia en LMA	Frecuencia en LLA	Asignación a grupo de riesgo
M2	t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	5-12%	NA	Favorable
M4Eo	inv(16)(p13;q22)/	CBFβ-MYH11	3-10%	NA	Favorable
M3	t(15;17)(q22;q21)	PML-RARα	6-15%	NA	Favorable
M4 y M5 o LLA	t(11q23)	MLL-varios	5-8%	7-10%	No favorable o intermedio
LMA	-5/del5(q)	NA	1-11%	NA	No favorable
LMA	-7/del7(q)	NA	1-7%	NA	No favorable
LMA	+8	NA	3-10%	NA	No favorable
LMA o LLA	cariotipo normal	NA	30-50%	20-45%	Favorable o intermedio
LMA o LLA	t(9;22)(q34;q11.2)	BCR-ABL1	1-2%	5-20%	No favorable
L1 o L2	t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	NA	10-25%	Favorable
L1 o L2	t(1;19)(q23;p13.3)	TCF3-PBX1	NA	2-5%	Favorable o intermedio
LLA	t(17;19)(q22;p13)	TCF3-HLF	NA	1%	No favorable
LLA	t(8;14), t(2;8), t(8;22)	MYC-varios	NA	1-2%	No favorable
L1 o L2	Hiperdiploidia (>50 cromosomas)	NA	NA	10-25%	Favorable
LLA	Hipodiploidia (<45 cromosomas)	NA	NA	1-5%	No favorable o intermedio

1.2.5.8 Análisis molecular

1.2.5.8.1 LMA con t(8;21)(q22;q22)(AML1/ETO)

El gen *AML1* codifica la subunidad $\alpha 2$ de CBF (*del ing. core binding factor*), un factor de transcripción heterodimérico, importante para la diferenciación hematopoyética.⁽⁶⁷⁾ En 1972 Janet Rowley informó por primera vez la t(8;21)(q22;q22). Esta se encuentra generalmente en la LMA *de novo* subtipo M2 del FAB (20-40%). La t(8;21) fusiona el gen *AML1* (*del ing. acute myeloid leukemia 1*), también conocido como *PEBP2a* o *CBFA2*, al gen *ETO* (*del ing. eight twenty one*), también denominado *CDR* o *MTG8*. La proteína de fusión resultante es caracterizada por un bloqueo de la transcripción en los genes target de *AML1* por reclutamiento directo de HDACs o cooperando con corepresores incluyendo *NCOR1*, *NCOR2* y *SIN3A*. Recientemente también se ha mostrado que *AML1/ETO* recluta DNMTs, este hallazgo implica que el silenciamiento transcripcional de los genes target de *AML1* ocurren en parte, a través de una relación entre la deacetilación de histonas y metilación del promotor en el DNA (Fig 5 y 7).^(7,68)

El gen *AML1* se compone de nueve exones abarcando una región de 150 kb y el gen *ETO* está formado por trece exones abarcando 87 kb (Fig. 8). El transcrito de fusión *AML1/ETO* se detecta por RT-PCR por lo regular en pacientes positivos a la t(8;21), generando un transcrito de tamaño constante que corresponde a la fusión del exón 5 *AML1* al exón 2 de *ETO*. Los sitios de rompimiento de *AML1* se localizan entre los exones 5 y 6. Los sitios de rompimiento de *ETO* están río arriba del exón 2 (Fig. 8).^(69,70) La t(8;21) se asocia con un buen pronóstico con una respuesta buena a ciertos agentes terapéuticos. Esas observaciones han dado pie al uso de una terapia adaptada según el riesgo basada sobre pruebas citogenéticas y/o moleculares.⁽⁷¹⁾

1.2.5.8.2 LMA con inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22)(CBF β /MYH11)

Por su parte el gen *CBF β* codifica para la subunidad β de CBF.⁽⁷³⁾ La inversión pericéntrica del cromosoma 16, inv(16) (p13q22), se encuentra en alrededor del 16% de los pacientes con LMA *de novo*, asociándose hasta en 50% con el subtipo M4 eosinofílico.⁽⁷⁴⁾ La inv(16) conduce a la fusión del gen *CBF β* con el

gen de la cadena pesada de la miosina del músculo liso (*MYH11*). La mayoría de los sitios de rompimiento caen en un intrón de 15 Kb entre los exones 5 y 6. El gen *MYH11* se compone de 21 exones abarcando 37 Kb. La región 5' frecuentemente se pierde durante el proceso de inversión, de esa forma sólo el gen *CBFβ/MYH11* se expresa en los casos de la inv(16) (p13q22).

Dependiendo de los exones que se recombinan entre los genes, se pueden generar 10 transcritos diferentes de *CBFβ/MYH11* (Fig. 9). Más del 85% de los pacientes presentan el transcrito tipo A; los tipos D y E representan alrededor del 10% y los demás transcritos se presentan esporádicamente.⁽⁶⁹⁾ La presencia de esta anomalía cromosómica se considera un factor de pronóstico favorable, observándose que más del 50% de los pacientes alcanzan remisión completa a largo plazo. Estos resultados tan favorables con la quimioterapia convencional, conducen a algunos autores a recomendar que el trasplante de células progenitoras no es indicativo para consolidar la remisión completa.^(75,76)

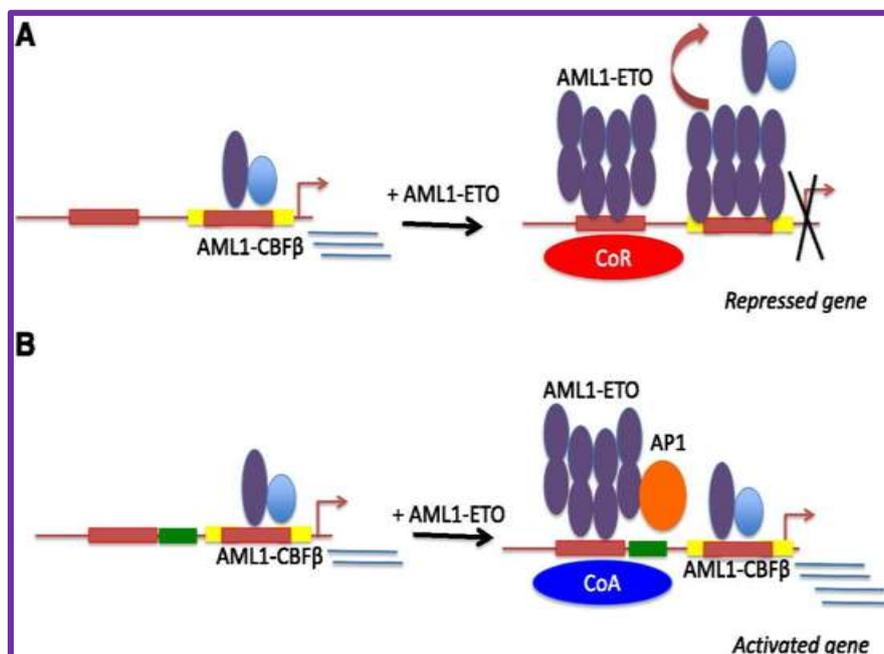


Figura 7. AML1/ETO funciona como represor o un activador de la transcripción. (A) La Unión de AML1-ETO en lugares asociados con genes reprimidos conduce al desplazamiento de AML1 (que se une al DNA como heterodímero con CBFβ (*del inglés*, core-binding factor β) a sitios con motivos un poco diferentes) y el reclutamiento de complejos corepresores (CoR) que conducen a la disminución de la transcripción. (B) La unión de AML1/ETO en lugares asociados con genes activados se produce en combinación con otros factores de transcripción como AP1 y el reclutamiento de complejos co-activadores (CoA), en este caso, AML1 no es desplazado y se queda en su sitio de unión y la cantidad de AML1/ETO presente es menor que lo observado en los genes reprimidos. Tomado de Saverio (2016).⁽⁷²⁾

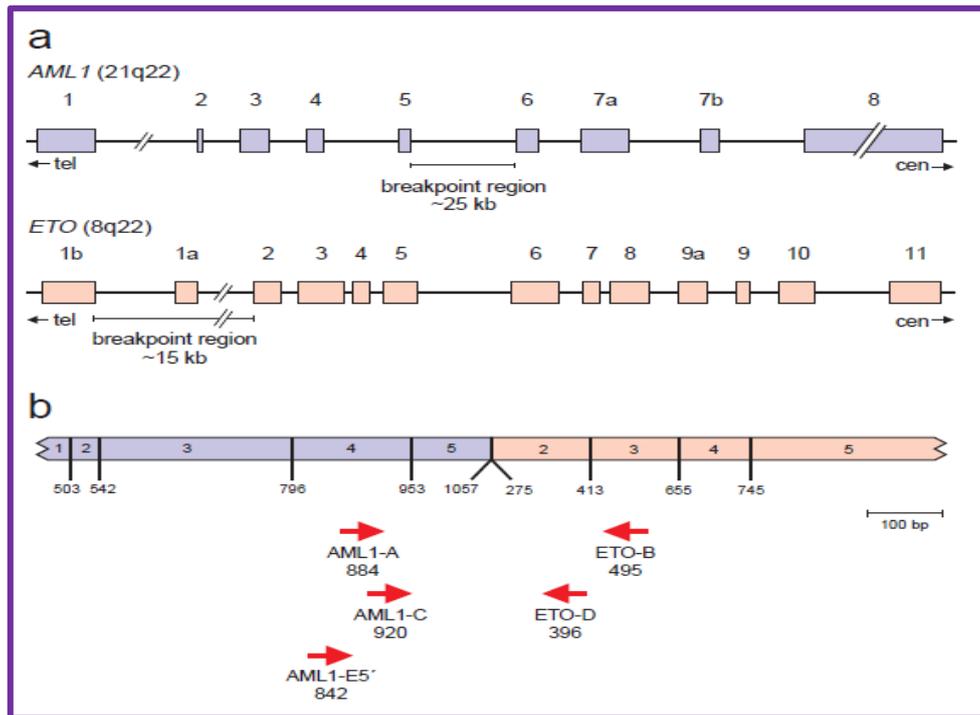


Figura 8. Representación esquemática de los intrones y exones de los genes AML1 y ETO involucrados en la t(8;21)(q22;q22). A) muestra los puntos de ruptura en cada gen. B) Diagrama esquemática del transcrita de fusión *AML1/ETO* con el exón 5 de *AML1* fusionado al exón 2 de *ETO*. Las flechas indican la posición relativa de los oligonucleótidos. Tomado de *JJM van Dongen y col, 1999.* ⁽⁶⁹⁾

1.2.5.8.3 LMA con t(15;17)(q22;q21)(PML/RAR α)

La translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17, t(15;17)(q24;q21), se limita a la Leucemia Promielocítica Aguda (LMA-M3) presentándose entre el 90 y 95% de los pacientes.⁽⁶⁶⁾ Esta translocación involucra al gen del receptor alfa del ácido retinoico (*RAR α*) en el cromosoma 17 y al gen *PML* en el cromosoma 15. Los puntos de ruptura en el gen *RAR α* generalmente ocurren en el intrón 2, mientras que en el gen *PML*, los puntos de ruptura ocurren en el intrón 6 (bcr1: 55% de los casos), exón 6 (bcr2: 5%) e intrón 3 (bcr3: 40%). Como consecuencia, se presentan tres isoformas referidas como Larga (L, bcr1), variante (V, bcr2) y corta (S, bcr3).⁽⁶⁹⁾ El gen *RAR α* es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Estos receptores tienen dos dominios, uno enlaza al DNA y el otro a hormonas retinoides. Los retinoides son reguladores de la proliferación y diferenciación. El *RAR α* se activa al enlazar al retinoide, donde una vez activado se une a sitios específicos del DNA, actuando en el control transcripcional directo de genes blanco específicos. El gen *PML-RARA* codifica la producción de un receptor alfa mutado, mismo que

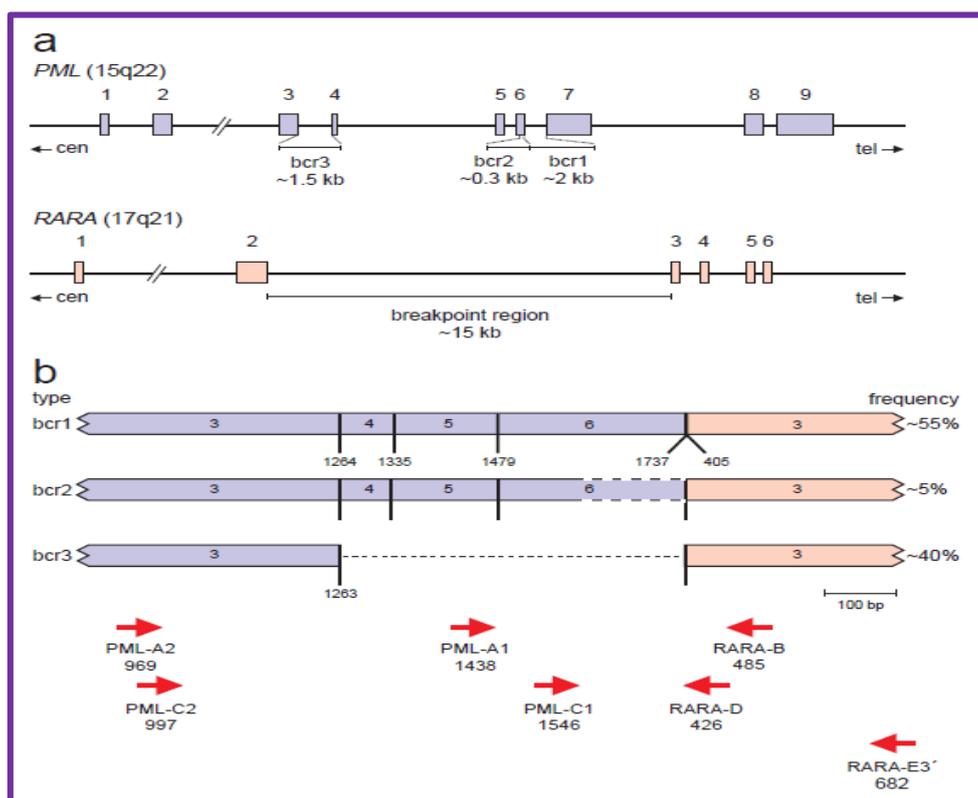


Figura 10. Representación esquemática de los intrones y exones de los genes PML y RARA involucrados en la t(15;17)(q22;q21). A) muestra los puntos de ruptura en cada gen. B) Diagrama esquemático de los tres diferentes transcritos de fusión *PML/RAR α* . Las flechas indican la posición relativa de los oligonucleótidos. Tomado de JJM van Dongen *col*, 1999.⁽⁶⁹⁾

1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Considerada hoy en día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de Biología Molecular e Ingeniería Genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmente de DNA, o indirecta de un RNA (en este caso, a través de su propio cDNA). Uno de los requisitos para esta metodología es que se conozca la secuencia de una parte de la región de DNA o RNA que se quiere amplificar, esto nos permitirá diseñar un par de oligonucleótidos que hibridaran en los extremos 3' de la región diana. Ahora han surgido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad. Esta última puede aumentar con una segunda PCR (PCR anidada), con dos cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos. Las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias

a los nuevos cebadores, a diferencia de los productos no específicos generados en la primera PCR, que por ello no resultarán amplificadas en la segunda (Fig. 9-11).⁽⁷⁹⁾

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Con que frecuencia se presenta los rearrreglos *PML/RAR α* y *CBF β -MYH11* para los subtipos M3 y M4, respectivamente, en los pacientes con leucemia mieloblástica aguda?

III. JUSTIFICACIÓN

La leucemia aguda es una neoplasia maligna que representa un problema de salud pública en Michoacán. En el Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos y Hospital General Dr. Miguel Silva de la Secretaría de Salud (SSA), se diagnostican y tratan alrededor de 80 casos nuevos cada año entre niños, adolescentes y adultos en edad productiva, con supervivencia variable en los adultos dependiendo del tipo de leucemia, siendo en términos generales la supervivencia media de dos años y en niños se trata de un padecimiento altamente curable.

Para el diagnóstico y clasificación completo de la leucemia se debería hacer uso de (1) la clasificación FAB (Franco-Americano-Británica), que incluye criterios morfológico y citoquímico; (2) de la MIC, que adiciona perfil inmunológico y citogenético y (3) alteraciones moleculares de las células neoplásicas (OMS). Sin embargo, la carencia en las instituciones públicas del estudio de biología molecular en forma rutinaria como parte del diagnóstico, evita poder subclasificar a los pacientes en aquellos que tienen alteraciones genéticas de buen ó mal pronóstico. Es por ello, que el médico inicia el tratamiento de manera igual para ambos grupos, por tanto, la posibilidad de alcanzar remisión y supervivencia libre de enfermedad es más limitante.

El establecimiento metodológico para clasificar molecularmente a cada paciente con leucemia mieloide aguda *de novo* y si presenta alguna alteración molecular de buen pronóstico, serán determinantes para elegir el esquema quimioterapéutico específico. Además, de esta manera se tendrá la información molecular que oriente la probable evolución del paciente, esperando que tengan más oportunidades de aumentar su supervivencia, libre de enfermedad y, por consiguiente, mejorar su calidad de vida.

IV. HIPOTESIS

Los pacientes con LMA subtipos M3 y M4, expresarán los rearrreglos *PML/RAR α* o *CBF β /MYH11*, respectivamente, según lo reportado en la literatura.

V. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar la expresión de los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11* en pacientes con leucemia mieloblástica aguda.

5.2 Específicos

- Establecer las condiciones de la PCR para identificar los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11*.
- Determinar la expresión de los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11* en pacientes con LMA M3 y LMA M4, respectivamente.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes de los servicios de Hematología y Oncología de los hospitales: Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos y Hospital General Dr. Miguel Silva de la Secretaría de Salud (SSA), pertenecientes al estado de Michoacán.

6.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS

6.2.1 Pacientes a estudiar:

Se incluyeron 14 muestras de médula ósea y/o sangre periférica de pacientes diagnosticados con leucemia mieloblástica aguda subtipo M3 y M4 (LMA-M3 y LMA-M4) que ingresaron a las instituciones arriba mencionadas.

6.2.2 Controles positivos:

Se emplearon muestras de pacientes conocidos con LMA-M3 y LMA-M4 que expresaron los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11*.

6.2.3 Controles negativos:

Se empleó el RNA de leucocitos de sangre periférica de sujetos libres de enfermedad.

6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.3.1 Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de LMA.

6.3.2 Criterios de no inclusión

Muestras de pacientes con conteo absoluto de leucocitos disminuidos y bajo porcentaje de viabilidad celular.

6.3.3 Criterios de exclusión

Pacientes que no expresaron el gen normal *abl*.

6.4 MÉTODOS

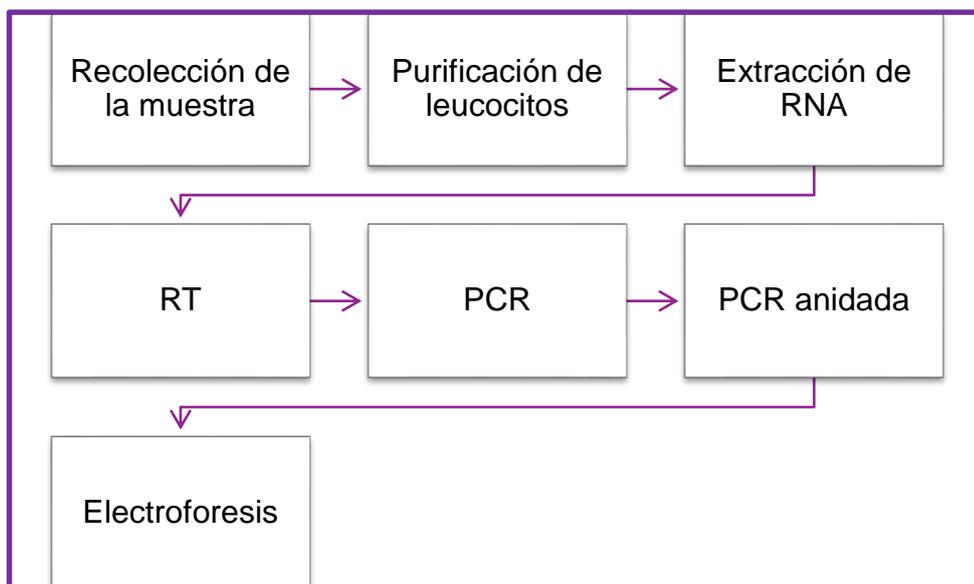


Figura 11. Esquema general de trabajo. Se indican los pasos en forma secuencial del protocolo. PCR, reacción en cadena de la polimerasa; RT-PCR, PCR con transcriptasa inversa (iniciales de *reverse transcriptase*).

6.4.1 Recolección de las muestras

Se recolectaron 4-5 mL de muestra de medula ósea o sangre periférica en tubo con EDTA.

6.4.2 Purificación de glóbulos blancos

La muestra se diluyó 1:10 con solución de lisis fría (4 a 8°C), se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 1500 g durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular (contiene los leucocitos) en 1 mL de solución amortiguadora de fosfato (PBS) a pH de 7.4, se agregaron 10mL de PBS y se volvió a centrifugar. Por segunda vez, se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 1 mL de PBS y se pasó a un tubo Eppendorf de 2 mL nuevo y estéril.

6.4.3 Conteo de células y evaluación de la viabilidad

La muestra se diluyó 1:40 (5 μ L de células purificadas con 195 μ L del colorante azul de tripano 1%) y se realizó el conteo en cámara de Neubauer con microscopio de luz óptica.

El promedio de las células contadas en los cuatro cuadrantes para glóbulos blancos se multiplicó por 10 (volumen de la cámara), luego por 40 (factor de dilución), este resultado representa el número de leucocitos en 1 μ L. Para determinar la viabilidad celular, se realizó a partir del porcentaje de células vivas y muertas, el cual debe ser mayor a 90% (viables) para seguir con el proceso de extracción de ARN.

6.4.4 Extracción del RNA total por el método TriPure.

De los glóbulos blancos purificados, se transfirió el volumen correspondiente a 10 millones de células a un tubo Eppendorf nuevo, se centrifugó a 1500 g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 mL del reactivo TriPure Isolation Reagent®, se resuspendió el botón celular con la ayuda de una micro pipeta y luego con una jeringa de insulina. Se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente y se guardó a -20 °C.

Siguiendo el protocolo, se descongeló la muestra en hielo, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 1 min, se centrifugó a 7200 g durante 10 min a 4°C.

Se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, se adicionaron 500 μ L de isopropanol (grado biología molecular), se mantuvo la muestra a -20°C por un máximo de 24 horas para lograr un mayor rendimiento de los ácidos nucleicos.

Luego se centrifugó con las mismas condiciones mencionadas en el párrafo anterior. Se desechó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol 75% (grado biología molecular), se volvió a centrifugar. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar por completo para posteriormente resuspender el precipitado (contiene el RNA) con 20 μ L de agua libre de RNasa (RNase-free water QIAGEN®).

6.4.5 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA

El RNA se diluyó 1:50 con agua inyectable y se cuantificó en espectrofotómetro de luz UV con una celda de 1 cm de paso de luz a una longitud de onda de 260 nm.

Una unidad de absorbancia (1A) 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, proporciona el valor de pureza del RNA. Esta pureza se evaluó por la relación entre las concentraciones de RNA-Proteína donde éstas deberían estar entre 1.7 a 2.0.

6.4.6 Verificación de la integridad del RNA

Se mezcló aproximadamente 1 µg de RNA con el colorante azul de bromofenol y se colocaron en los pozos del gel de agarosa al 1.5%. Se dejaron correr a 85V durante 40 min. Luego, se tiñó el gel con bromuro de etidio al 0.01% durante 15 min y se visualizó en analizador de imágenes. La presencia de 3 bandas bien delimitadas que corresponde a las bandas 28S, 18S y 5S además, de una relación 2:1 de las intensidades de las bandas 28S y 18S, indicaron un ARN de buena integridad.

6.4.7 Síntesis de cDNA

El volumen de RNA correspondiente a 2 µg se mezcló con 1 µL de hexámeros al azar en un tubo (A) y se incubaron a 65°C durante 10 min, luego se colocó en hielo inmediatamente.

Se preparó una mezcla madre en otro tubo (B) con 2 µL de buffer 10X, 4 µL de MgCl₂ 25 Mm, 1 µL de Inhibidor de RNAsas 1 U/µL, 8 µL de dNTPs 2.5 mM, 1 µL de enzima MuLV Reverse 2.5 U/µL. Se mezclaron los tubos A y B, y se aforó a 20 µL de volumen final con agua inyectable. Se incubó en el termociclador bajo el siguiente ciclo: 42°C durante 45 min, a 99°C durante 5 min y 5°C durante 5 min. El cDNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su uso.

6.4.8 Gen control *abl* normal

En un tubo Eppendorf se preparó una mezcla con 2 µL de buffer 10X (conteniendo 15 mM de MgCl₂), 0.5 µM del oligonucleótido directo (5'-GAGGGCGTGTGGAAGAAATA-3'), 0.5 µM del oligonucleótido reverso (5'-GCTGTGTAGGTGTCCCCTGT-3'), 0.2 mM de dNTPs, 0.8 U de Taq DNA polimerasa, 2 µL de cDNA y H₂O cbp 20 µL. Se sometió a las siguientes condiciones de reacción en el termociclador; desnaturalización inicial (94°C por 3 min), desnaturalización (94°C por 1 min), alineación (57°C por 1 min), extensión (72°C por 1 min) y extensión final (72 °C por 5 min) por 30 ciclos.⁽⁸⁰⁾

6.4.9 Condiciones de PCR y amplificado de los transcritos de fusión

6.4.9.1 Método 1

PCR. En la primera ronda de PCR se mezclaron: 2 µL de buffer 10X (conteniendo 15 mM de MgCl₂), 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada oligonucleótido (Tabla 3), 0.025U de Taq DNA polimerasa, 2 µL de cDNA y H₂O cbp 20 µL. La reacción se llevó a cabo en termociclador bajo las siguientes condiciones; una etapa de activación inicial de la polimerasa a 95 °C durante 15 min, seguido de 25 ciclos de amplificación de PCR: desnaturalización (95 °C durante 30 s), alineación (58 °C durante 30 s), y extensión (72 °C durante 60 s).

PCR anidada. Al producto de PCR se le realizó una dilución 1:100 con agua inyectable. De esta dilución se mezcló 1 µL con 2 µL de buffer 10X (conteniendo 15 mM de MgCl₂), 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de oligonucleótidos, 0.025U de Taq DNA polimerasa, 2 µL de cDNA y H₂O cbp. 20 µL. La reacción se llevó a cabo en termociclador bajo las siguientes condiciones: una etapa de activación inicial de la polimerasa a 95 °C durante 15 min, seguido de 25 ciclos de amplificación de PCR: desnaturalización (95 °C durante 30 s), alineación (58 °C durante 30 s), extensión (72 °C durante 60 s) y un ciclo de extensión final (72 °C durante 10 min).

Tabla 3. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la t(15;17)(q22;q21) con el gen de fusión PML/RAR α . Pallisgaard et al 1998.⁽⁸¹⁾

Código del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Código del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'
PML3:1211U19	CAAGAAAGCCAGCCCAGAG	PML3:1370U21	GCCAGTGTACGCCTTCTCCATC
PML3:861U19	GTGCGCCAGGTGGTAGCTC	PML3:930U20	CAGCGCGACTACGAGGAGAT
RARA:540L19	AAGCCCTTGCAGCCCTCAC	RARA:508L22	CCCATAGTGGTAGCCTGAGGAC
E2A:1075U21*	TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC	E2A:1173U19*	CTACGACGGGGGTCTCCAC
E2A:1883L22*	TTTTCTCTTCTCGCCGTTTCA	E2A:1844L19*	AGGTTCCGCTCTCGCACTT

Al lado izquierdo de la tabla se encuentran los oligonucleótidos empleados en la PCR y al lado derecho los de la PCR anidada.

* Se emplearon como controles internos para la PCR y PCR anidada, correspondiente.

6.4.9.2 Método 2

PCR. En un tubo Eppendorf se preparó una mezcla con 2 μ L de buffer 10X (conteniendo 15 mM de MgCl₂), 1 mM de MgCl₂ adicional, 0.5 μ M del oligonucleótido directo, 0.5 μ M oligonucleótido reverso (Tabla 4 y 5), 0.2 mM de dNTPs, 0.025U de Taq DNA polimerasa, 2 μ L de cDNA y H₂O cbp 20 μ L, posteriormente se sometió a las siguientes condiciones de reacción en el termociclador: desnaturalización inicial (95 °C durante 30 s), desnaturalización (94 °C durante 30 s), alineación (65 °C durante 60 s) y extensión (72 °C durante 60 s) por 35 ciclos. Detención de la PCR a 16 °C.

PCR anidada: el producto amplificado en la PCR se sometió a una segunda ronda. Para llevarlo a cabo se realizó una dilución 1:100 del primer amplificado, del cual se mezcló 1 μ L con los reactivos para PCR. La mezcla se sometió a las mismas condiciones arriba descritas, disminuyendo a 25 la cantidad de ciclos.

6.4.10 Electroforesis en gel de agarosa.

Se mezclaron 5 μ L de los productos de PCR con 1 μ L del colorante azul de bromofenol y se colocaron en los pozos del gel de agarosa al 1.5%, se conectaron a una fuente de poder y se corrieron a 85 V durante 40 min aprox. Luego, se tiñó el gel con bromuro de etidio al 0.01% durante 15 min y se visualizó en luz ultravioleta.

Tabla 4. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la t(15;17)(q22;q21) con el gen de fusión *PML/RAR α* . Van Dongen y col, 1999.⁽⁶⁹⁾

Código del oligonucleótido	Posición 5' (tamaño)	Secuencia 5' - 3'
PML-A1	1438 (21)	CAGTGTACGCCTTCTCCATCA
PML-A2	969 (18)	CTGCTGGAGGCTGTGGAC
RARA-B	485 (20)	GCTTGTAGATGCGGGGTAGA
PML-C1	1546 (21)	TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG
PML-C2	997 (19)	AGCGCGACTACGAGGAGAT
RARA-D	426 (20)	CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT

En una reacción se ensayaron los oligonucleótidos PML-A1 con RARA-B y en otro los oligonucleótidos PML-A2 con RARA-B para la PCR. En la PCR anidada se ensayaron PML-C1 con RARA-D y PML-C2 con RARA-D.

Tabla 5. Oligonucleótidos para el análisis por RT-PCR de la inv(16)(p13;q;22) con el gen de fusión *CBF β /MYH11*. Van Dongen y col, 1999.⁽⁶⁹⁾

Código del oligonucleótido	Posición 5' (tamaño)	Secuencia 5' - 3'
CBFB-A	253 (22)	GCAGGCAAGGTATATTTGAAGG
MYH11-B1	1316 (20)	TGAAGCAACTCCTGGGTGTC
MYH11-B2	2116 (22)	TCCTCTTCTCCTCATTCTGCTC
CBFB-C	345 (20)	GGGCTGTCTGGAGTTTGATG
MYH11-D1	1225 (20)	TCCCTGTGACGCTCTCAACT
MYH11-D2	2061 (18)	CTTGAGCGCCTGCATGTT

En una reacción se ensayaron los oligonucleótidos CBFB-A con MYH11-B1 y en otro los oligonucleótidos CBFB-A con MYH11-B2 para la PCR. En la PCR anidada se ensayaron oligonucleótidos CBFB-C con MYH11-D1 y CBFB-D con MYH11-D2.

VII. RESULTADOS

7.1 Recolección de las muestras

El estudio inicio con 14 muestras de pacientes diagnosticados con leucemia mieloblástica aguda subtipo M3 (LMA-M3) y M4 (LMA-M4), distribuidos en 6 y 8 pacientes, respectivamente. La recolección de las muestras se llevó a cabo de septiembre 2014 a agosto 2015 (Anexo A).

7.2 Conteo de células y evaluación de la viabilidad

La mayoría de los pacientes presentó cifras absolutas de leucocitos elevadas, con una media de $51 \times 10^3/\mu\text{L}$.

En lo que respecta a la viabilidad, hubo un porcentaje aceptable de células viables, siendo en promedio de 92%. Solo hubo excepción en un caso que presentó viabilidad de 70 %, esta se dio seguimiento hasta la evaluación de la integridad del RNA (Fig. 12), y tal como se esperaba, fue de mala integridad. Dicha muestra se descartó y tomamos una nueva al mismo paciente.

7.3 Cuantificación y determinación de la pureza del RNA

Hubo variaciones en las concentraciones de RNA en cada muestra, pero todos con valores óptimos a los requeridos para la síntesis de cDNA.

Por su parte, la pureza fue determinada por la relación entre las concentraciones de RNA-Proteína (como se explicó en materiales y métodos), siendo esta aceptable, pues se trató de un valor promedio de 1.9.

7.4 Verificación de la integridad del RNA

En nuestro laboratorio clasificamos la integridad del RNA en tres categorías: *buena*, *regular* y *mala*. De las 14 muestras que se procesaron, solo una fue de mala integridad, una regular y el resto de buena integridad (Fig 12). La de mala integridad, se descartó.

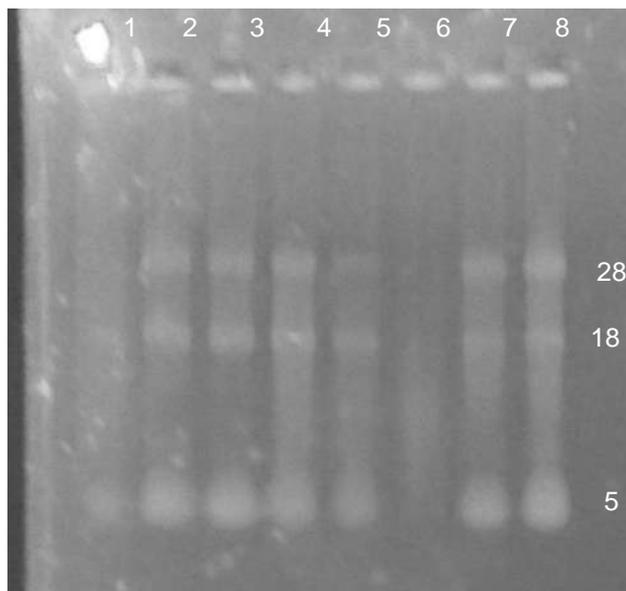


Figura 12. Integridad del RNA. La imagen revela la integridad del RNA de las muestras procesadas. Carril 1; regular. Carril 2-5, 7 y 8: buena. Carril 6: mala. Todos los productos se corrieron en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con BrEt al 0.01% y observados en luz UV.

7.5 Gen control *abl* normal

De las 14 muestras ensayadas 10 fueron positivas y 4 negativas al gen *abl*, lo que representó el 71.5% de casos con los que se pudo continuar para la búsqueda de los genes de fusión (Fig. 13).

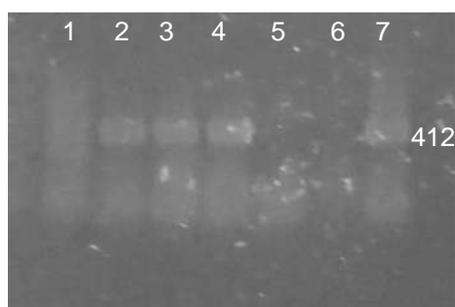


Figura 13. Productos de PCR del gen *abl*. El tamaño de los productos es de 412 pb, para los oligonucleótidos empleados. Carril 1, 5 y 6: negativos. Carril 2, 3, 4 y 7: positivos.

7.6 Condiciones de PCR y Amplificado de los transcritos de fusión

Se establecieron las condiciones de PCR para amplificar los transcritos de fusión de los casos con LMA-M3 y LMA-M4. En el primer ensayo se siguió el protocolo empleado por Neils Pallisgaard y col, (1998), el cual no resulto exitoso, en el gel solo era posible observar algunas bandas que posiblemente corresponden a los oligonucleótidos (Fig. 14). En el segundo ensayo nos basamos en el protocolo de Van Dongen y col, (1999), esto implicó un cambio en los oligonucleótidos empleados en el primer ensayo, concentraciones de los reactivos, condiciones de reacción (ver materiales y métodos). Este último nos permitió amplificar los transcritos de fusión, tanto para los controles positivos como de los casos de LMA.

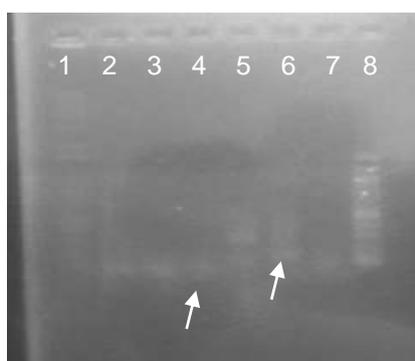


Figura 14. Gel de electroforesis de los productos de PCR método 1. En la imagen solo es posible observar algunas bandas en la parte inferior del gel que pudiéramos atribuir a los oligonucleótidos (flechas blancas). Carril 1 y 8: MPM. Carril 2-4: productos de PCR. Carril 5-7: Productos de PCR anidada

7.6.1 t(15;17) (q22;q21) *PML/RAR α*

De los 6 casos iniciales de LMA-M3, solo 4 expresaron el gen *abl* normal, estos últimos fueron quienes se incluyeron al estudio, de los cuales 2 casos fueron positivos al gen de fusión *PML/RAR α* que representan el 50%, tratándose de las isoformas *bcr1* y *bcr3*. Dichas isoformas se confirmaron por la presencia de un producto de aproximadamente 381 pb y 376 pb en la PCR, otra de 214 pb y 284 pb en la PCR anidada para *bcr1* y *bcr3*, respectivamente (Fig. 15)

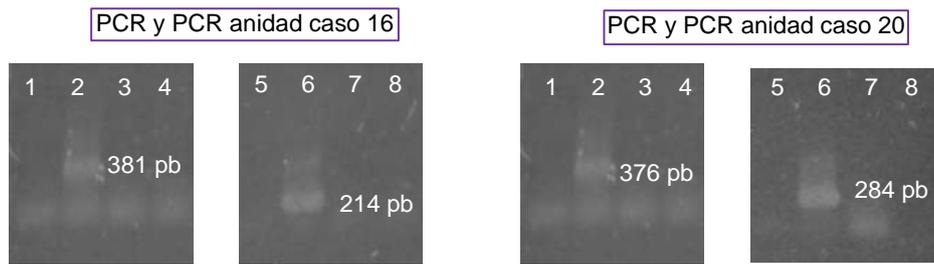


Figura 15. Gel de electroforesis t(15;17) (q22;q21) *PML/RARα*. Panel izquierdo; carriles 2 y 6 amplicones que identifican la isoforma bcr1, carril 1,3,4 casos negativos. Panel derecho; carriles 2 y 6 amplicones de la isoforma bcr3, carriles 1,3,4 casos negativos.

7.6.2 inv (16) (p13;q22) *CBFβ/MYH11*

Para los 8 casos evaluados de LMA-M4, solo un caso fue positivo al gen de fusión, que representa el 12.5%. Este se trata de la isoforma A, el cual se confirmó por la presencia de un producto de 400 pb en la PCR y otro de 270 pb en la PCR anidada (Fig. 16).

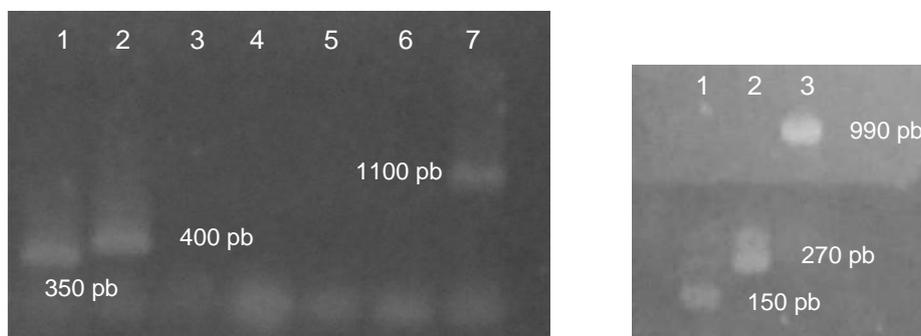


Figura 16. Gel de electroforesis para el gen de fusión *CBFβ/MYH11*. Panel izquierdo; productos de PCR. Carril 1 y 7: control positivo, en 1 hay un producto de 350 pb y en 7 otro de 1100 pb. Carril 2: caso positivo, Carril 3-6. Panel derecho; productos de PCR anidada. Carril 1 y 3; control positivo, carril 2; caso positivo.

VIII. DISCUSIÓN

La t(15:17) e inv(16) son dos de los rearrreglos cromosómicos más comunes, juntos representan aproximadamente el 25% de las LMA *de novo*.⁽¹⁰⁾ Debido a que las LMA con la t(15:17) e inv(16) se asocia con una respuesta favorable al tratamiento, la identificación de estas anomalías en el momento del diagnóstico, puede proveer información útil acerca del pronóstico y evolución.^(66,74,76) Aunque la t(15:17) puede ser fácilmente detectada mediante análisis citogenético, no es así para la inv(16). Nosotros empleamos RT-PCR para identificar los transcritos de los dos rearrreglos cromosómicos.

Primero diseñamos las condiciones para la RT-PCR comparando dos trabajos reportados previamente (referencias 69 y 81). En una, desafortunadamente no se logró detectar los transcritos de fusión. Sin embargo, basándonos en el trabajo de Van Dongen y col, (1999), pudimos amplificar ambos rearrreglos.

En el estudio incluimos 14 muestras de pacientes diagnosticados con LMA M3 y M4. 6 muestras correspondieron al subtipo M3 y 8 muestras al subtipo M4. En el subtipo M3 identificamos las isoformas bcr1 y bcr3 en solo dos casos para el gen de fusión *PML/RAR α* , sin embargo, la frecuencia de expresión de este rearrreglo fue solo del 50%, muy inferior a los 90% reportado en la literatura.^(82,83) Esto se debió probablemente a que algunas de las muestras provenían de pacientes con tratamiento.

A nivel molecular, la proteína de fusión *PML/RAR α* funciona como un represor transcripcional (Fig. 5). En células que contienen la translocación, el tratamiento con ATRA permite la liberación de co-represores y el reclutamiento de complejos co-activadores. Esto resulta en la transcripción de los genes blanco de RARA, también como los factores de transcripción cruciales para la hematopoyesis normal tales como PU.1 y CEBPB con subsecuente diferenciación de las células leucémicas. Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento con ATRA también resulta en la degradación de la proteína de fusión. En estos casos, se sabe que el nivel de expresión de los transcritos está afectado por los agentes quimioterapéuticos en la fase de inducción. Añadiendo a esto, el conteo absoluto de glóbulos blancos se ve afectado y la

probabilidad de encontrar el gen de fusión disminuye.^(83,84) Lo anterior, podría explicar la baja frecuencia encontrada del gen de fusión *PML/RAR α* .

En 8 casos de LMA M4 donde evaluamos el gen de fusión *CBF β /MYH11*, solo uno presento el transcrito, que corresponde al 12.5% de todos los casos, tratándose de la isoforma A. Según el reporte de Dongen y cols. (1999), la frecuencia de la isoforma A es de aproximadamente el 88% de los casos que expresan el gen de fusión *CBF β /MYH11*. La frecuencia de expresión de la *inv(16)* en pacientes con LMA M4 es variable. En un análisis de Langabeer y cols. (1997) reportaron que el transcrito se encuentra en aproximadamente el 10% de los casos con LMA M4Eo *de novo*. Por su parte Liu y cols. (1995), también reportaron 10% del gene fusión. En nuestro trabajo, sin embargo, por el número reducido de pacientes incluidos, no podemos descartar la posibilidad de que el porcentaje de transcritos encontrado podría tener variaciones. Además, aunque esta anomalía cromosómica es característica para la LMA M4Eo, también se ha reportado en los subtipos M2, M5, en M1, M6 y M7 puede ser raro.⁽⁷⁴⁾

Por último, se contaron con controles positivos para verificar que los productos de PCR y PCR anidad de nuestra metodología, realmente amplificaron los genes de fusión evaluados y así, corroborar su reproducibilidad.

De acuerdo a nuestros resultados reiteramos la importancia de establecer la clasificación molecular de los pacientes con LMA antes de iniciar cualquier tratamiento, debido a que estos genes de fusión son vulnerables al daño causados por ciertos tipos de quimioterapia y la probabilidad de encontrar resultados falsos negativos aumenta.

IX. CONCLUSIÓN

Se establecieron las condiciones de RT-PCR para la detección de los genes de fusión *PML/RAR α* y *CBF β /MYH11* en pacientes con LMA-M3 y LMA-M4, respectivamente. La frecuencia de casos encontrados, fue menor a lo esperado, probablemente por el tamaño de muestra y porque algunos pacientes estaban bajo tratamiento quimioterapéutico al momento de realizar el estudio.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Dirección General de Epidemiología (DGE). Base de datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 2004-2006 (RHNM). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). [México]: Secretaría de Salud.
2. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud.
3. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html> (revisado el 10 de julio de 2016).
4. International Society of Pediatric Oncology. Cancer in Children; Clinical Management. 6 th edition. OXFORD. pp 174-187
5. Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 2008; 112:2183-2189
6. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18:115-136
7. Chen J., Odenike O. and Rowley J. Leucemogenesis: more than mutant genes. *Natural Reviews Cancer* 2010; 10:23-26
8. McKerrell et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies. *Blood* 2016; 128:e1-e9
9. Mendelson and Frenette. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med.* 2014; 20(8):833-46
10. Liang HC, Zuñiga JC. Hematopoiesis: from start to immune reconstitution potential. *Stem cell Research and Therapy.* 2015; 6:52
11. Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: principles and practice of hematology.* 2nd Edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA 2003.
12. Jagannathan BM, Zon, LI. Hematopoiesis. *Development.* 2013; 140:2463-2467.
13. Cumano A, Godin I. Ontogeny of Hematopoietic System. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25:745-85.
14. Ayako NI, Hitoshi T, Toshio S. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Biologists Ltd.* 2014; 141:4656-4666
15. Hollink I. Molecular genetic insights in cytogenetically normal pediatric acute myeloid leukemia. Rotterdam, The Netherlands. 2011; pp12-22
16. Kondo, M., Weissman, I. L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 91:661–672.
17. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 1999; 404:93–197.

18. Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. & Weissman, I. L. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000; 290:2152–2154.
19. Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L. & Akashi, K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001; 97:3333–3341.
20. NaNakorn, T., Traver, D., Weissman, I. L. & Akashi, K. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J. Clin. Invest.* 2002; 199:1579–1585.
21. Passegué E. et al. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNAS* 2003; 100
22. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.* 1996; 84:321–30.
23. Nottingham WT, Jarratt A, Burgess M, Speck CL, Cheng JF, Prabhakar S, et al. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood.* 2007; 110:4188–97.
24. Meier N, Krpic S, Rodriguez P, Strouboulis J, Monti M, Krijgsveld J, et al. Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development* 2006; 133:4913–23.
25. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 1995; 373:432–4.
26. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.* 1998; 12:473–9.
27. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 1994; 371:221–6.
28. Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, et al. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet.* 2008; 40:51–60.
29. Li L, Lee JY, Gross J, Song SH, Dean A, Love PE. A requirement for Lim domain binding protein 1 in erythropoiesis. *J Exp Med.* 2010; 207:2543–50.
30. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:9–21.
31. Mayani et al. Hematopoyesis. *Cancerología 2* 2007: 95-107
32. Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: principles and practice of hematology*, Volume 1, 2nd Edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA 2003.

33. Ruiz AG. Fundamentos de hematología. 4a edición. Médica Panamericana. México. 2009.
34. Jaime PJ, Gómez AD. Hematología la sangre y sus enfermedades. 2a edición. McGraw-Hill. México. 2009
35. McKenzie SB. Hematología Clínica. 2a edición. El Manual Moderno. México. 2009.
36. Rowley JD. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 2008; 112: 2183-9.
37. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18:115-36.
38. Walter MJ, Payton JE, Ries RE, et al. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:12950-5.
39. Bullinger L, Krönke J, Schönbach C, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia* 2010; 24:438-49.
40. Suela J, Alvarez S, Cigudosa JC. DNA profiling by array CGH in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cytogenet Genome Res* 2007; 118:304-9.
41. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:650-65.
42. Bacher U, Schnittger S, Haferlach T. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:646-55.
43. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1079-89.
44. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 2010; 29:3723-31.
45. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. *DNMT3A* mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 363:2424-33.
46. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; 361:1058-66.
47. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of Myeloid Leukemias. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2002. 3:179–98
48. Gertjan K and Dirk R. (2012) *Cancer in Children: Clinical Management*. Sixth edition, international society of pediatric oncology. OXFORD. pp 174-188
49. Murray JLCh, Dias HR, Kulkarni CS, Lozano R, Stevens AG, Ezzati M. Improving the comparability of diabetes mortality statistics in the U.S. and Mexico. *Diabetes Care* 2008; 31: 451-8.

50. Martínez-Palomino G, Vallejo M, García-Moreno J, López-Pérez M, Díaz-Granados R, Badillo-Castillo MO, Garza-Rodarte A. Comparison of traditional cardiovascular risk factors frequency among women of different education levels. *Arch Cardiol Mex* 2008; 78: 285-92.
51. Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Mundo-Rosas V, MoralesRuán C, Cervantes-Turrubiates L, Villalpando-Hernández S. Health and nutrition status of older adults in Mexico: results of a national probabilistic survey. *Sal Pub Mex* 2008; 50: 383-9.
52. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2012 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr> [Accessed on 20/07/2016].
53. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
54. Meneses García y cols. Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica (1993-2002). *Revista de Investigación Clínica* 2012; 64:4:322-329
55. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html> (revisado el 20 de julio de 2016).
56. Kenneth B, Daoust M: Clinical manifestations of acute myeloid leukemia. En: Hoffman R (ed.). *Hematology. Basic Principles and Practice*. Elsevier: 2005:1155-1162
57. Beutler E, Litchman M, Coller B, Kipps T. *Williams Hematology*. 5ª edición. McGraw-Hill, Inc., New York. 1995
58. Campana D. Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243:59-75.
59. Vardiman et al. TheWorld Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *BLOOD* 2002;100(7): 2292- 2302
60. Vardiman et al. The 2008 revision of theWorld Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *BLOOD* 2009;114(5): 937-951.
61. Flandrin. G. and Bernard, J. Cytological classification of acute leukemias. A survey of 1400 cases. *Blood Cells* 1975; 1:7-15.
62. Gralnick, H., Galton, D. A. G., Catovsky, D., Sultan, C., Bennett, J. Classification of acute leukemias. *Ann. Intern. Med.*, 1977; 87:740-753.
63. Hayhoe, F. G. I., Quaglino, D., Doll, R. The cytology and citochemistry of acute leukemias. *Medical Research Council Special Report Series, No. 304*, Her Majesty's Stationary Office, London 1964:11-23.
64. Legrand O. The immunophenotype of 177 adults with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood* 2000; 96:870-877.

65. Campana D. Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological Methods* 2000; 243:59-75.
66. Sans Sabrafen. *Hematología Clínica*. 5ª edición. Elsevier. España. 2006; pp. 409-436.
67. Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997; 82(3):364-70.
68. Wang J. et al. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR /mSin3 / HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:10860-5
69. JJM van Dongen 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
70. Gubert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D y col. 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.
71. Cho E. Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. *Korean J Intern Med* 2003;18(1):13-20.
72. Saverio M. DNA binding modes of leukemia oncoproteins. *Blood Journal* 2016; 127:177-178
73. Lutterbach, B., Hou., Y., Durst, K.L. & Hiebert, S. W. The inv(16) encodes an acute myeloid leukemia 1 transcriptional co-repressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1999; 96:12822-12827.
74. Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. (published erratum: *Blood* 1997; 89: 1842). *Blood* 1995; 85:2289-2302.
75. Shurtleff SA et al. Heterogeneity in *CBFbeta/MYH11* fusion messages encoded by the inv(16)(p13q22) and the t(16;16)(p13;q22) in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1995; 85: 3695–3703.
76. Claxton DF et al. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83:1750-1756.
77. Zhu, J. et al. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and oncogenic RAR alpha fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96:14807-14812.
78. Rihab Nasr et al. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nature Medicine* 2008; 14:1333-1342.
79. Luque J., Herráez A., 2ª edición. Elsevier. España. 2010; pp 187-196

80. Roche LC, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood Journal*. 2002; 100:1014-1018.

81. Niels Pallisgaard et al. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. *Blood* 1998; 92:574-588.

82. Grignani Fr, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, Mencarelli, Grignani F, Peschle C, Nicoletti I, Pelicci PG: The acute promyelocytic leukemia specific *PML/RAR α* fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 74:423, 1993.

83. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, et-al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor a fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 82: 492-7, 1992

84. Grignani Fr, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, Mencarelli, Grignani F, Peschle C, Nicoletti I, Pelicci PG: The acute promyelocytic leukemia specific *PML/RAR α* fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* 74:423, 1993.

85. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, et-al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor a fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 82: 492-7, 1992

XI. ANEXOS

ANEXO XI. A. Consentimiento informado



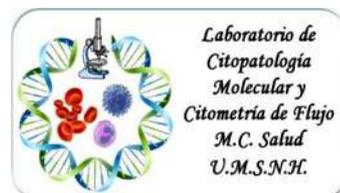
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLÁS DE HIDALGO

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. – IMSS – SSA

Carta de consentimiento para la participación de proyectos de investigación científica

Morelia, Mich. a ____ de _____ del 20__

La presencia alteraciones moleculares y la clasificación inmunofenotípica, se pueden asociar a un buen o mal pronóstico, su detección oportuna es de suma importancia para aplicar los esquemas de tratamiento más adecuados dependiendo del tipo de alteración y con ello alcanzar la remisión completa.

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación “IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE FUSIÓN *PML/RAR α* Y *CBFB/MYH11* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA MEDIANTE RT-PCR.” registrado ante el comité local de investigación con el número: _____. El objetivo de este trabajo es determinar al diagnóstico alteraciones moleculares en pacientes con leucemia mieloblástica aguda y asociarlos. Se me ha explicado que se utilizarán las mismas muestras de sangre periférica o médula ósea para definir mi diagnóstico. Declaro que se me ha informado que NO REPRESENTA UNA INTERVENCIÓN DIRECTA Y ADICIONAL a las intervenciones normales de diagnóstico. 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.

Nombre y firma del participante

Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos Nombre y
firma del Investigador Titular

Nombre y firma del testigo

Heriberto Santander Lucio
Nombre y firma de quien procesa las
muestras

*En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a: Investigador Responsable: Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos, Tel. 4431802719. Correo electrónico: sergutica@yahoo.com.mx.

ANEXO XI. B Datos completos de los pacientes incluidos en el estudio

CLAVE	EDAD (años)	ISTITUCIÓN	WBC (10 ³ /μL)	RBC (10 ⁶ /μL)	HB (g/dL)	PLT (10 ³ /μL)	FAB	INTEGRIDAD DEL RNA	[RNA] (μg/mL)	GEN <i>abl</i>	TRANSCRIPTO	ISOFORMA
RRMA/01	20	IMSS	3.04	3.3	12.0	63.0	M3	BUENA	12.1	+	-	
GCJC/02	17	H. CIVIL	15.2	2.3	7.0	11.0	M3	BUENA	34.0	+	-	
LGJC/03	36	H. CIVIL	26.5	2.8	8.8	36.0	M4	BUENA	10.0	+	+	A
CAF/05	81	IMSS	34.44	2.4	9.0	12.0	M5	BUENA	11.4	-	-	
MGMF/08	29	IMSS	3.7	3.7	11.6	537.0	M3	REGULAR	14.5	-	-	
VGRM/09	69	IMSS	208.5	1.6	4.7	417.0	M4	BUENA	16.6	-	-	
VVJ/11	44	IMSS	12.91	2.3	7.9	44.0	M4	BUENA	22.8	+	-	
CBC/13	85	IMSS	37.3	2.8	8.7	5.0	M4/M5	BUENA	8.5	-	-	
PCM/14	65	IMSS	258.97	1.3	3.7	23.0	M4	BUENA	37.1	+	-	
BAS/16	30	H. CIVIL	7.1	2.5	8.8	12.0	M3	BUENA	25.4	+	+	bcr1
ERCA/17	34	IMSS	16.3	4.0	10.7	41.0	M4Eo	BUENA	21.7	+	-	
PHS/18	29	IMSS	2.82	4.4	14.2	234.0	M3	BUENA	10.0	+	-	
NME/19	29	IMSS	22.7	1.6	4.7	24.0	M4/M5	BUENA	31.2	+	-	
AHLD/20	14	H. INFANTIL	74.7	2.84	9.46	33.0	M3	BUENA	27.7	+	+	bcr3