



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:

**"DETERMINACIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN
PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MEDIANTE
GENES DE FUSIÓN".**

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

P R E S E N T A:

Química Farmacobióloga
Patricia Alejandra Ceja Silva

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

Co-directora de tesis:
Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Sandra Sánchez Ceja



Morelia, Michoacán,
México Agosto de 2017



**Secretaría
de Salud**

Gobierno del Estado de Michoacán

Hospital Infantil de Morelia
"Eva Sámano de López Mateos"
ENSEÑANZA E INVESTIGACION



ASUNTO: Aprobación de Protocolo de Investigación

Morelia Mich. a 11 de Mayo del 2016.

**C. QFB. PATRICIA ALEJANDRA CEJA SILVA
PRESENTE.-**

Por medio del presente informo a usted que su proyecto de investigación titulado **"DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA A PARTIR DE GENES DE FUSIÓN"** ha sido *Aprobado* por el comité de Ética en Investigación de este *Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos"*.

El número de registro asignado al protocolo es: **HIM/OH/02/2016**. Se le recuerda que deberá enviar a este Comité informes de avances e informe final de este proyecto de Investigación, con el cual obtendrá el grado de maestría, teniendo como director de tesis al Doctor en Ciencias Químico-Biológicas Sergio Gutiérrez Castellanos y asesor al Maestro en Ciencias y Oncólogo Pediatra Eloy Pérez Rivera.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ TOLEDO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACION**



**JEFATURA DE ENSEÑANZA
E INVESTIGACIÓN**

C.c.p. Archivo.-
/mlpr*



Int. Bosque Cuauhtémoc S/N Col. Centro
58000, Morelia, Michoacán
Tel. (443) 312-25-20 / 302-25-21
hospitalinfantilmorelia@yahoo.com.mx
www.michoacan.gob.mx



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

SECRETARÍA ACADÉMICA

A S U N T O: INFORMACIÓN

Morelia, Mich., 26 de Septiembre de 2016.

Q.F.B. PATRICIA ALEJANDRA CEJA SILVA
ALUMNA PROGRAMA DE POSGRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
P R E S E N T E

Le notifico que el protocolo de investigación que Usted presentó ante esta Secretaría Académica a mi cargo, y cuyo título es "**Detección de Enfermedad Mínima Residual en Pacientes con Leucemia Mieloide Aguda a Partir de Genes de Fusión**" y que fue sometido a la evaluación del Comité de Investigación y Ética en Investigación de esta Dependencia Universitaria, quien (es) de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación vigentes, por lo que el protocolo fue **AUTORIZADO**, habiéndose asignado el número de registro de la dependencia siguiente:

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	ÁREA	Nº DE REGISTRO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"	POSGRADO	002/P/2/2016

Se le solicita informar del grado de avance del mismo acorde al cronograma de actividades así como el título de la revista, volumen, año y páginas una vez que el mismo sea publicado. Como el presente protocolo contempla la graduación de un alumno indicar fecha y grado académico obtenido.

Atentamente:

DR. ARTURO VALENCIA ORTIZ
SECRETARIO ACADÉMICO

c.e.p. Coordinador de la Investigación Científica. UMSNH
c.e.p. Archivo y Correspondencia de la Facultad.
c.e.p. Archivo de la Secretaría Académica.
c.e.p. Jefatura de Investigación Fac Cs Med y Biol. "Dr. Ignacio Chávez"
DR.AVO/sgg*

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

La estudiante de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de estudios de Posgrado
Laboratorio de Citopatología Molecular
Recibió beca del CONACyT
durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

El presente trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica,
UMSNH, convocatoria 2016-2017.

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Aprobó la memoria de tesis que presentó:
Química Farmacobióloga Patricia Alejandra Ceja Silva.

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Martha Eva Viveros Sandoval

Maestro en Ciencias de la Salud
Eloy Pérez Rivera

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza

Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias Químico Biológicas
Sergio Gutiérrez Castellanos

Co-directora de tesis:
Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Sandra Guadalupe Sánchez Ceja.

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Citopatología Molecular
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

En memoria de los pacientes.

Dios.

Sus familias.

Su Fortaleza.

Mi familia.

Mis amigos.

“Haced el bien a cuantos más podáis y os sucederá frecuentemente hallaros con caras que os infundan alegría”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la vida ya que me permitió lograr lo que muchas veces parecía imposible. A todas y cada una de las personas que formaron parte de este proyecto, que me dieron apoyo cuando creía que nada saldría y que no podría culminarlo, cuando pensé seriamente en tirar la toalla. Gracias a todos ustedes.

A mi familia por el cariño brindado no solo en estos 2 años de maestría sino durante todas las cosas que emprendo y decido hacer. A mi hermana, mi madre y mi sobrina por su presencia en mi corazón, aunque no siempre estuvieran físicamente conmigo yo las sentía todo el tiempo.

Gracias a mis amigos, pero en especial a Lucia Salcido Cadena, por los ánimos, por la motivación, los apapachos y la tolerancia brindada durante este camino.

A Nayra Martínez Méndez, por las sonrisas, la paciencia y la maravillosa amistad de tantos años. A Miriam Lizeth Vidales Alipio por ser mi colega más que mi amiga, por darme material cuando me faltaba para algunas pruebas y por estar siempre que le necesito. A David González Gutiérrez, por sus grandes ocurrencias y escapadas cuando me sentía extremadamente estresada por el proyecto. A Andrea Monserrat Negrete Paz, por los viajes, los apoyos y las pláticas motivacionales. A Setzangari Prince Jacintos por todas sus charlas, por escucharme, por la paciencia y motivación.

A las personas maravillosas que conocí en el Posgrado esto incluyendo a todos los doctores que formaron parte de mi vida en este lapso, no cabe duda de que las mejores amistades se obtienen de estas experiencias.

ABREVIATURAS

ABL	Homólogo de oncogén viral de la leucemia murina de Abelson
AML-1	Gen de la leucemia mieloide aguda 1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CF	Citometría de Flujo
CTH	Células tronco hematopoyéticas
CBF	Factor de union al núcleo (por sus siglas en inglés <i>core binding factor</i>)
EMR	Enfermedad Mínima Residual
ETO	Gen Ocho-Veintiuno (por sus siglas en inglés <i>eight twenty one</i>)
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIG	Figura
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
MYH11	Cadena pesada de miocina 11
PBX1	Factor de transcripción de la leucemia de células Pre-B.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PML	Gen de la Leucemia promielocítica
RARA	Receptor del Ácido retinóico.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa
cADN	ADN complementario
dNTP`s	Desoxi-nucleótidos trifosforilados
X ²	Chi cuadrada

RELACIÓN DE TABLAS

Número	Título	Página
Tabla 1	Reactivos para la síntesis de cDNA	21
Tabla 2	Reactivos para la PCR de los genes de fusión	23
Tabla 3	Oligonucleótidos para el análisis RT-PCR	23
Tabla 4	Tamaño del producto de PCR en pares de bases	24
Tabla 5	Información general de los pacientes incluidos en el estudio	27
Tabla 6	Parámetros hematológicos en las muestras obtenidas para LMA	29
Tabla 7	Seguimiento molecular de los pacientes	33
Tabla 8	Semicuantificación para el gen de fusión <i>PML/RARA</i>	37
Tabla 9	Semicuantificación para el gen de fusión <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	40

RELACIÓN DE FIGURAS

Número	Título	Página
Figura 1	Mutación de progenitores hematopoyéticos normales	1
Figura 2	Hematopoyesis de célula madre pluripotente	2
Figura 3	Mortalidad por leucemia según lugar de residencia	3
Figura 4	Representación esquemática de los intrones y exones de los genes <i>AML1</i> y <i>ETO</i>	8
Figura 5	Representación esquemática de los intrones y exones de los genes <i>CBFB</i> y <i>MYH11</i>	10
Figura 6	Representación esquemática de los intrones y exones de los genes <i>PML</i> y <i>RARA</i>	12
Figura 7	Esquema general de trabajo.	26
Figura 8	Distribución por edad	28
Figura 9	Distribución por sexo	28
Figura 10	Cuenta de leucocitos pacientes LMA	30
Figura 11	Integridad del RNA	30
Figura 12	Expresión del gen control <i>ABL</i>	31
Figura 13	Expresión del gen de fusión <i>PML/RARA</i>	32
Figura 14	Expresión del gen de fusión <i>CBFB/MYH11</i>	34
Figura 15	Expresión del gen de fusión <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	35
Figura 16	Mediciones mediante software Quantity one	36
Figura 17	Expresión <i>PML/RARA</i> de acuerdo con análisis y tratamiento	37
Figura 18	Expresión <i>RUNX1/RUNX1T1</i> de acuerdo análisis y tratamiento	41

ANEXOS

ANEXO I.	Carta de consentimiento informado.	49
ANEXO II.	Formato de recolección de datos del paciente.	50
ANEXO III.	Actividades a realizar por los participantes del proyecto.	51
ANEXO IV.	Consentimiento informado para procedimientos quirurgicos	52
ANEXO V.	Documento de asentimiento informado para niños menores de 0 a 18 años	53

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	5
Enfermedad mínima residual.....	5
RT-PCR semicuantitativo para detectar enfermedad mínima residual (EMR).....	6
Translocación (8;21).....	7
Inversión 16.....	9
Translocación (15;17).....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
JUSTIFICACION.....	14
HIPOTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
PROCEDIMIENTOS.....	18
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	42
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”



RESUMEN

“DETECCION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON
LEUCEMIA MIELOIDE MEDIANTE DE GENES DE FUSION”

Introducción: La leucemia ocupa el segundo lugar de las neoplasias malignas del tejido hematopoyético y agrupa diferentes entidades celulares. En el caso de México la tasa reportada para el año 2008 fue de 13.9 por 100,000 habitantes. Los pacientes con leucemia al diagnóstico pueden tener alrededor de 10^{12} células malignas. Así, durante la inducción a la remisión se produce una reducción de 3 a 4 logaritmos de la masa tumoral, pero en el paciente permanecen alrededor de 10^8 a 10^9 células leucémicas. El establecer una clasificación a través de técnicas de biología molecular en las leucemias al diagnóstico y posteriormente cuantificar la enfermedad residual, generará la información necesaria para definir el riesgo del paciente. **Objetivo general:** Determinar la EMR en pacientes con leucemia mieloide aguda mediante la detección de los genes de fusión *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RARA* y *CBFB-MYH11*. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron los leucocitos de médula ósea o sangre periférica de pacientes con leucemia mieloide aguda al diagnóstico, termino inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento. Se aisló el ARN empleando el reactivo de TriPure Isolation Reagent® (roche). Se extrajo el RNA total de 10 millones de leucocitos de médula ósea y/o sangre periférica, se sintetizó la cadena complementaria de ADN (cDNA) con la enzima transcriptasa inversa y saturación de hexámeros. Se realizó la PCR con los oligos específicos para los rearrreglos *RUNX/RUNX1T1*, *PML/RARA*, *CBFB/MYH11* aplicando las condiciones de amplificación y temperaturas de fusión específicas para cada rearrreglo. El producto de PCR se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa y se tiñó con bromuro de Etidio al 0.01%. Posteriormente se realizó la semicuantificación con el software Quantity one versión 4.6.9 (Biorad) en geles de poliacrilamida a 25 y 30 ciclos respectivamente. **Resultados:** Se incluyeron 16 pacientes que se distribuyeron en 3 para LMA-M2, 9 para LMA-M3 y 4 para LMA-M4, de los cuales 2 expresaron para el gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1*, 7 para el gen de fusión *PML-RARA* y 1 para el gen de fusión *CBFB/MYH11*. De estos 10 pacientes positivos se semicuantifico para determinar porcentaje de EMR, donde se observaron principalmente valores en aumento de la expresión de los genes en cuestión (80%). Ya que solo fueron 2 pacientes (20%) donde se observó un descenso en la carga del gen de fusión, determinado en diferentes lapsos quimioterapéuticos.

Conclusión: La expresión del gen de fusión *PML-RARA* en nuestro estudio fue la población mayor y esto es concordante con la literatura europea, sin embargo, el conocimiento sobre la distribución genética de los subtipos de LMA en México, es incipiente. Existe información sobre un aumento en la prevalencia en *t(15;17)* mas no *t(8;21)*, *inv(16)* o alguna de sus variantes. Por lo que generar estudios de este tipo y por lapsos de tiempo mayor no solamente nos dará una incidencia y prevalencia más precisa sino también permitirá proporcionar cambios en esquemas quimioterapéuticos fundamentales para los pacientes con leucemia mieloide aguda esto con el fin de mejorar sus pronósticos.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad Mínima Residual, Leucemia Mieloide Aguda, Genes de Fusión, Ácido ribonucleico y Reacción de la cadena de la polimerasa.



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

ABSTRACT



"DETECTION OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA FROM FUSION GENES"

Introduction: Leukemia occupies the second place of the malignancies of the hematopoietic tissue and groups different cellular entities. In the case of Mexico the rate reported for the year 2008 was 13.9 per 100,000 inhabitants. Patients with leukemia at diagnosis may have around 10¹² malignant cells. Thus, during induction to remission a reduction of 3 to 4 logarithms of the tumor mass occurs, but in the patient remain about 10⁸ to 10⁹ leukemic cells. Establishing a classification through molecular biology techniques in leukemias at diagnosis and then quantifying the residual disease will generate the necessary information to define the patient's risk. Overall objective: To determine RMS in patients with acute myeloid leukemia by detecting RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA and CBFβ-MYH11 fusion genes. **Materials and methods:** Bone marrow or peripheral blood leukocytes were obtained from patients with acute myeloid leukemia at diagnosis, followed induction of remission, consolidation and maintenance. RNA was isolated using TriPure Isolation Reagent® (roche) reagent. Total RNA was extracted from 10 million leukocytes from bone marrow and / or peripheral blood, the complementary DNA strand (cDNA) was synthesized with the enzyme reverse transcriptase and hexameric saturation. PCR was performed with the specific oligos for the RUNX / RUNX1T1, PML / RARA, CBFβ / MYH11 rearrangements by applying amplification conditions and specific melting temperatures for each rearrangement. The PCR product was subjected to electrophoretic shift on agarose gel and stained with 0.01% Ethidium bromide. Subsequently, the semi-quantization was performed with the software Quantity one version 4.6.9 (Biorad) on polyacrylamide gels at 25 and 30 cycles respectively

Results: We included 16 patients who were distributed in 3 for AML-M2, 9 for AML-M3 and 4 for AML-M4, of which 2 were expressed for the RUNX1 / RUNX1T1 fusion gene, 7 for the fusion gene PML- RARA and 1 for the CBFβ / MYH11 fusion gene. Of these 10 positive patients were semiquantified to determine percentage of EMR, where they were mainly observed values in increase of the expression of the genes in question (80%). Since there were only 2 patients (20%) where a decrease in the load of the fusion gene, determined in different chemotherapy lapses, was observed.

Conclusion: The expression of the PML-RARA fusion gene in our study was the largest population and this is consistent with European literature, however, knowledge about the genetic distribution of AML subtypes in Mexico is incipient. There is information on an increase in prevalence in t (15; 17) but not t (8; 21), inv (16) or any of its variants. Therefore, to generate studies of this type and for longer periods of time will not only give us a more precise incidence and prevalence but also allow to provide changes in fundamental chemotherapeutic schemes for patients with acute myeloid leukemia in order to improve their prognosis.

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia ocupa el segundo lugar de las neoplasias malignas del tejido hematopoyético y agrupa diferentes entidades celulares. Los cuatro tipos principales de leucemia son leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia mieloide crónica (LMC).¹ La leucemia linfoblástica aguda representa aproximadamente 75% de los casos de leucemia infantil. En contraste, los tipos de leucemia más comunes en adultos son la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica crónica (LLC), seguidas por la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloide crónica (LMC).² La leucemia aguda es una enfermedad clonal que involucra la acumulación de mutaciones y alteraciones génicas en una célula tallo hematopoyética (Fig.1). Lo que genera proliferación anormal del blasto con desplazamiento de la hematopoyesis normal. (Fig. 2).

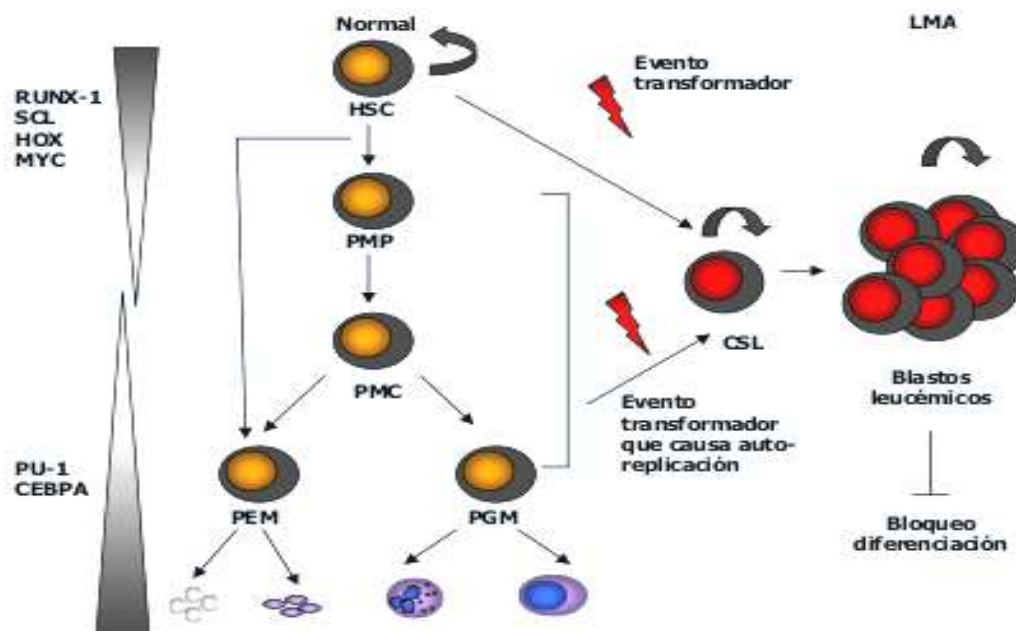


Fig. 1: Mutación de progenitores hematopoyéticos normales en células tronco leucémicas (*gudging in hematology education, 2009*)

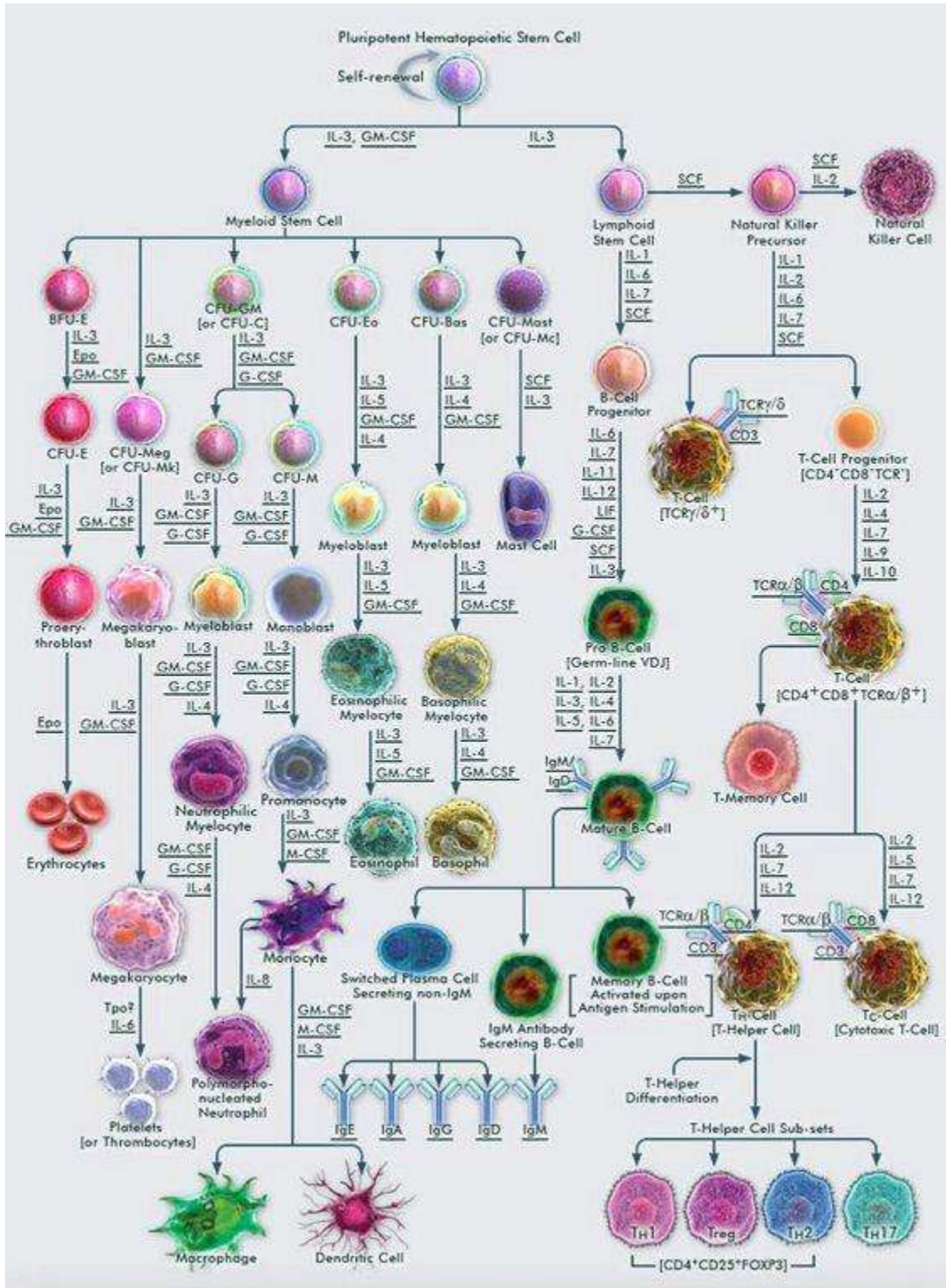


Fig. 2: Hematopoyesis de célula madre pluripotente. *Ebioscience* (2012).

La mortalidad por leucemias linfóide y mieloide en México, en el año 2002 fue del 4.6% respecto al total de defunciones registradas, ubicándose dentro de las primeras quince causas de mortalidad por neoplasias malignas. En el año 2002 la distribución geográfica mundial de la mortalidad por leucemia mostró que las mayores tasas de mortalidad (>8.0 por 100,000 habitantes), tanto en hombres como en mujeres, se localizaron en países desarrollados como Canadá, Estados Unidos, Europa y Australia. En el caso de México la tasa reportada para este año fue de 6.1 por 100,000 habitantes. En relación a la distribución geográfica de las leucemias se observó que las entidades federativas con mayores tasas de mortalidad, de acuerdo con el estado de residencia (Fig. 3) corresponden a las siguientes: Tabasco, Puebla, Distrito Federal, Baja California Sur, Nayarit, Yucatán, Michoacán, Tlaxcala, Jalisco y Colima.³

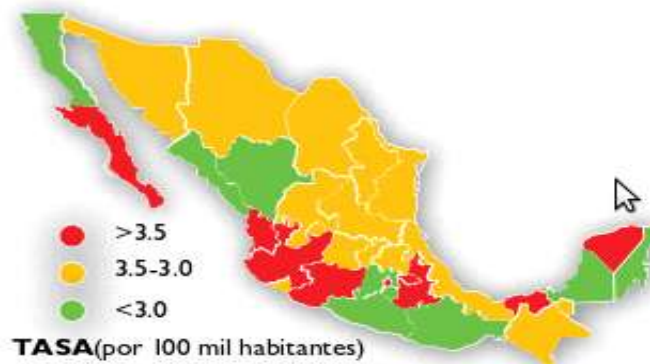


FIGURA 3

Mortalidad por leucemia, según lugar de residencia habitual. México, 2001

Fuente: Globocan 2002 World Health Organization .

En años recientes, se han desarrollado varios métodos para detectar la enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) en remisión morfológica.⁴ Actualmente, los métodos más utilizados para la detección y cuantificación de estas patologías son, la Citometría de flujo y los análisis basados en reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), que pueden alcanzar un nivel de sensibilidad de hasta 10^{-4} a 10^{-6} .⁵

El principal objetivo del tratamiento de la leucemia es la curación, sin embargo, esto ocurre sólo en un bajo porcentaje, alrededor del 10 -20% de los pacientes adultos; 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.⁶

2. ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL (EMR)

El término enfermedad mínima residual (EMR) fue creado para describir la enfermedad que es detectada solamente por técnicas de laboratorio más sensibles que la morfología. La enfermedad residual se consideraba como mínima, dado que se encontró en la ausencia de signos o síntomas clínicos. Y que se va a denominar como las células blásticas tumorales que permanecen en la médula ósea después del tratamiento quimioterapéutico o del trasplante de progenitores hematopoyéticos.⁹

El objetivo final de los ensayos de enfermedad mínima residual (EMR) es guiar las decisiones terapéuticas mediante el reconocimiento de los pacientes que respondieron bien a la terapia realizando una distinción también de los pacientes en los que el tratamiento se debe continuar o intensificar para minimizar la probabilidad de recaída clínica.¹⁰

Varios estudios establecen que el valor predictivo positivo y negativo del resultado de (EMR) específica depende de la sensibilidad de la técnica utilizada para medirlo, el punto en el que se mide y el tratamiento recibido por el paciente antes y después del punto de evaluación.^{29,30}

Se puede presentar en pacientes en mitad del proceso de tratamiento y también en pacientes que se cree están en remisión. La (EMR) es la causa más importante de recaída en pacientes después del tratamiento de quimioterapia. 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 la misma.¹¹ 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.^{12,13}

2.2 RT-PCR PARA DETECTAR ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL (EMR)

La RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa) es un método sensible para la detección de los niveles de expresión de *ARNm*. Tradicionalmente RT-PCR implica dos pasos: la reacción de transcripción reversa (RT) y la amplificación por reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). El ácido ribonucleico (RNA) se transcribe en primera inversa como ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) usando una transcriptasa inversa, el cDNA resultante se utiliza como plantillas para la amplificación de productos de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) subsiguiente utilizando cebadores específicos para uno o más genes.¹⁴

La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA) expresadas en las células tumorales, multiplicando por 100 el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA). Con la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), se puede analizar el ácido ribonucleico (RNA) de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por translocaciones primarias y de otros genes característicos asociados a determinados tipos de tumor. En la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) es importante la cuantificación de ésta mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación. Posee una sensibilidad que se sitúa entre 1×10^{-5} y 1×10^{-6} .^{15,16}

Por lo tanto, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para los transcritos de fusión de leucemia es una manera muy sensible para detectar enfermedad mínima residual (EMR), la importancia clínica de un resultado

positivo puede variar con el momento de la evaluación durante el curso clínico, es decir durante la fase de tratamiento a la que se encuentre sometida el paciente.^{17,18}

2.3 TRANSLOCACION t(8;21) (q22;q22)

Constituye alrededor del 5% al 10% de las leucemias mieloides agudas (LMA). La t(8;21)(q22;q22) se describió por primera vez en 1973, la cual se encuentra generalmente en la leucemia mieloide aguda (LMA) subtipo M2 (20-40%) y se ha identificado en la línea celular Kasumi-1 derivada de un paciente LMA-M2 en recaída. La t(8;21) fusiona el gen *AML1* (*acute myeloid leukemia 1*, por sus siglas en inglés), también identificado como *PEBP2a* o *CBFA2*. El gen *ETO* (*eight twenty one*), también identificado como *CDR* o *MTG8*. 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. 4). El transcrito fusionado *AML1-ETO* se encuentran por RT-PCR por lo regular en pacientes positivos a la t(8;21), generando un tamaño de transcrito 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. La t(8;21) se asocia con un buen pronóstico con 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.^{14,16,21} El gen *AML1* codifica la subunidad $\alpha 2$ del factor de transcripción heterodimérico core binding factor (CBF), el cual es crítico para el desarrollo hematopoyético.^{19,25,26}

Actualmente este gen de fusión se denomina *RUNX1/RUNX1T1*.

La t(8;21) fue la primera anomalía citogenética descrita en las leucemias mieloides agudas (LMA) en 1973 por Rowley.^{1,3} Esta alteración está presente en aproximadamente 5-10 % de todos los casos. Algunos autores plantean que los eventos iniciales de esta alteración ocurren en el útero y están relacionados con la exposición prenatal a pesticidas, dada la estrecha relación del transcripto de fusión y los niveles de pesticida en meconio. Factores como la tendencia a la colocación de los cromosomas 8 y 21 en las células mieloides y los desbalances en los niveles de histonas (H) con disminución de H1 e incremento de H3, pudieran ser algunas de las alteraciones de la microarquitectura nuclear y fenómenos epigenéticos directamente relacionados con esta mutación.²⁷

2.4 INVERSION 16 Inv(p13;q22)

Esta proteína tiene múltiples efectos en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la viabilidad de las células leucémicas. La translocación puede ser detectada como una sola anomalía genética o como parte de anomalías complejas. La enfermedad se caracteriza por anomalías genéticas adicionales, las células leucémicas muestran un perfil de expresión global de genes y un perfil de microARNs. Usualmente hay un bajo riesgo de recaída de la leucemia después de altas dosis de arabinósido de citosina^{27,28}

Dependiendo de los exones que se recombinan entre los genes, se pueden generar 10 transcritos diferentes de *CBFB-MYH11*. 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 (Fig.5). 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.²⁵

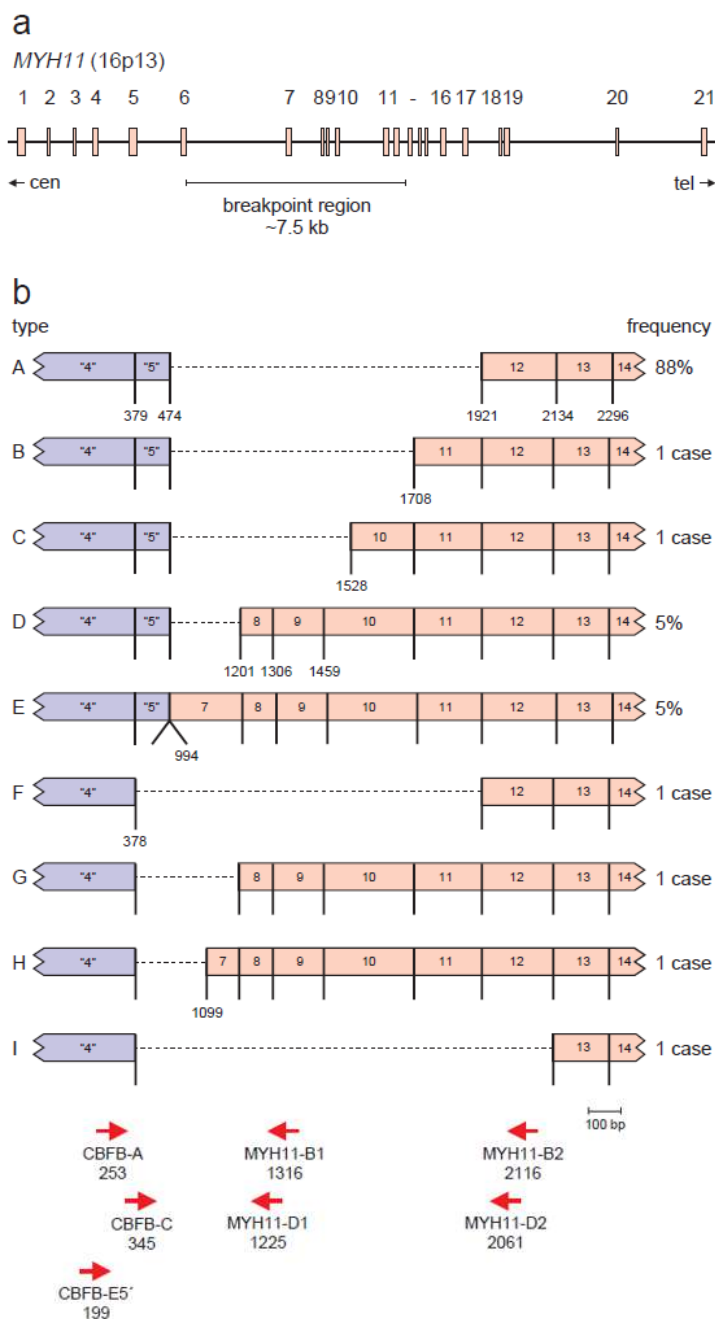


Fig. 5: Representación esquemática de los intrones y exones del gen *MYH11* involucrados en la inv(16)(p13;q21). A) muestra los puntos de ruptura del gen. B) Diagrama esquemática de los 10 diferentes tipos de transcritos de fusión *CBFβ-MYH11*. Los diferentes transcritos son generados principalmente por los puntos de ruptura en los diferentes intrones del gen *MYH11*. Las flechas indican la posición relativa de los oligonucleótidos. (Tomado de van Dongen y col.X)

2.5 TRANSLOCACION t(15;17) (q24;q21)

La translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17 [t(15;17)(q24;q21)], se limita a promielocitos neoplásicos, es decir a la leucemia promielocítica aguda (LMA-M3) presentándose entre el 90 y 95% de los pacientes. Esta translocación involucra al gen del receptor alfa del ácido retinoico (*RARA*) en el cromosoma 17 y al gen promielocítico leukemia (*PML*) en el cromosoma 15. Los puntos de ruptura en el gen *RARA* 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).^{21, 22} El gen *RARA* es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares. Estos receptores tienen dos dominios, uno enlaza al ácido desoxirribonucleico (*ADN*) y el otro a hormonas retinoides. Los retinoides son reguladores de la proliferación y diferenciación (Fig. 6). El *RARA* se activa al enlazar al retinoide, donde una vez activado se une a sitios específicos del *ADN*, actuando en el control transcripcional directo de genes blanco específicos. El gen *PML-RARA* codifica la producción de un receptor alfa mutado, mismo que no responde a niveles normales de ácido holotransretinoico (ATRA) pero sí a concentraciones muy altas de éste. Por ello, la presencia de la t(15;17) se vincula como un factor de buen pronóstico (mayor posibilidad de lograr la remisión y con supervivencias más largas) por la respuesta al ATRA, el cual logra inducir la diferenciación de los promielocitos a neutrófilos, de ahí la importancia de su determinación.²⁰

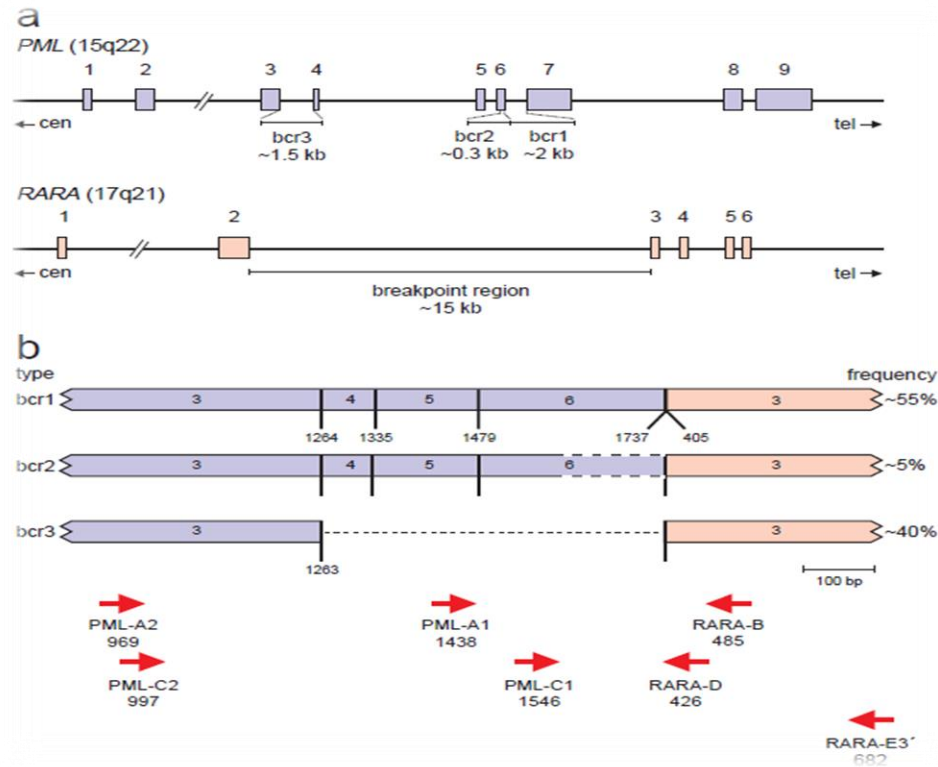


Fig. 6: Representación esquemática de los intrones y exones de los genes *PML* y *RARA* involucrados en la t(15;17)(q22;q21). A) Se muestran los puntos de ruptura en cada gen. B) Diagrama esquemática de los tres diferentes transcritos de fusión *PML-RAR α* . Las flechas indican la posición relativa de los oligonucleótidos. (Tomado de van Dongen y col^X)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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 representan 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.^{7, 8}

En México el estudio de enfermedad mínima residual (EMR) no se realiza de forma rutinaria, por la complejidad de los métodos y el alto costo que implica la determinación. En este contexto la técnica molecular de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) semi-cuantitativa parece ser una alternativa adecuada con un costo menor al de la citometría de flujo con una sensibilidad elevada de 10^{-3} – 10^{-5} . La técnica propuesta generará el conocimiento para evaluar la relación de la EMR y la probabilidad a recaída y es susceptible a ser considerada para la toma de decisiones terapéuticas de los pacientes.

En nuestro país los esquemas terapéuticos están regidos en general por las manifestaciones clínicas y la observación médica sin considerar a la enfermedad subclínica como una posibilidad de recaída.

La presencia de EMR es la causa más importante de recaída en pacientes después del tratamiento de quimioterapia. 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.

4. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, los avances en quimioterapia, radioterapia y en el trasplante de precursores hematopoyéticos han mejorado de forma considerable las posibilidades de supervivencia en neoplasias malignas. Sin embargo, el riesgo de recurrencia continúa siendo, en muchos casos, un obstáculo importante para su curación. En este sentido, la detección de enfermedad mínima residual (EMR) constituye un procedimiento de gran interés con objeto de adecuar los requerimientos terapéuticos y además en algunos casos puede tener una clara trascendencia pronóstica.^{1,19}

En la leucemia mieloide aguda (LMA), el logro de la remisión hematológica completa (RC) es un requisito previo para su curación. La definición convencional de remisión completa (RC), se basa en el reconocimiento morfológico de $\leq 5\%$ de blastos leucémicos en la medula ósea; sin embargo, no proporciona suficiente información sobre la calidad de la respuesta. A pesar de tasas de RC de 50-80% (según la edad), la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) presenta recaída dentro de 3-5 años desde el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Los pacientes con leucemia al diagnóstico pueden tener alrededor de 10^{12} células malignas.¹¹ Así, durante la inducción a la remisión se produce una reducción de 3 a 4 logaritmos de la masa tumoral, pero en el paciente permanecen alrededor de 10^8 a 10^9 células leucémicas. Esta cantidad de células es indetectable por los métodos convencionales (morfología con microscopio óptico) en la mayoría de los pacientes. Por lo que es necesario emplear procedimientos más sensibles para cuantificar la masa tumoral residual y evaluar la respuesta al tratamiento. Esto conduce un manejo clínico más fino y previene (hasta con 3 meses de anticipación) una recaída clínica que complicaría el control de la enfermedad por resurgir la clona leucémica con mayor resistencia al tratamiento.⁸

Durante la última década, se ha demostrado que la detección de células malignas que se encontraban por debajo del 0.01%, correlacionaron significativamente con la evolución clínica y mayor supervivencia libre de enfermedad.^{12,8}

El establecer una clasificación a través de técnicas de biología molecular en las leucemias al diagnóstico y posteriormente cuantificar la enfermedad mínima residual, generará la información necesaria para definir el riesgo del paciente y se contará con la metodología para evaluar periódicamente el efecto del tratamiento mediante la determinación del nivel de enfermedad mínima residual y hacer las modificaciones pertinentes. Si se encuentran niveles altos de enfermedad mínima residual (EMR) (>0.01%) podrán intensificar el tratamiento, pero si presenta niveles bajos de enfermedad mínima residual (EMR) (<0.01%) mantendrán el esquema de tratamiento o lo modificarán sin comprometer su efectividad. Es decir, se pretende incrementar la supervivencia, pero ahora, libre de enfermedad, libre de las complicaciones relacionadas con el tratamiento de la leucemia y por consiguiente, el paciente mejorará su calidad de vida.

5. HIPOTESIS

El diagnóstico oportuno de enfermedad mínima residual (EMR) mejora la eficacia del tratamiento de leucemia mieloide aguda (LMA) y evita recaídas.

6. OBJETIVOS

a) General

“Evaluar la frecuencia de enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.

b) Específicos

- Determinar la expresión de genes de fusión en pacientes con LMA
- Analizar la enfermedad mínima residual (EMR) en la evolución de los pacientes.

7. MATERIALES Y METODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Prospectivo y observacional.

2. UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) con edad entre 0-90 años que ingresaron a los Servicios de Oncología o Hematología del Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos” Hospital Civil “Miguel Silva” y hospital Regional No.1 del IMSS.

3. DEFINICIÓN DE LAS UNIDADES DE OBSERVACIÓN

Se incluyeron todos los pacientes con leucemia mieloide aguda, que ingresaron a los servicios de Oncología o Hematología de los hospitales antes mencionados durante un año.

4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.
- Pacientes que alcanzaron la remisión después del esquema de inducción.

Criterios de no inclusión

- Muestras con viabilidad celular menor al 90%.
- Muestras de pacientes con hemolisis, cantidad insuficiente o presencia de coagulo.

Criterios de Exclusión

- Pacientes que ya no desearon participar en el protocolo.
- Pacientes que se ausentaron durante el seguimiento.
- Pacientes a los que se les suspendió el esquema de tratamiento, abandonaron el tratamiento de quimioterapia o presentaron complicaciones.

- Pacientes que no expresaron gen de fusión de interés.

8. PROCEDIMIENTOS

Los médicos hematólogos y oncólogos pediatras encargados de las clínicas en donde se traten pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA), analizaron clínicamente a los pacientes que ingresaron al hospital y en colaboración con los investigadores participantes en el proyecto, evaluaron y seleccionaron a los pacientes. Asimismo, los médicos y yo misma pregunté a los pacientes si deseaban participar libremente en el protocolo, bajo su consideración firmaron la hoja de consentimiento (Anexo II) el paciente o su familiar.

a) Clasificación de pacientes.

La leucemia mieloide aguda se clasifica en 8 variedades de M0 a M7.

b) Diagnóstico de la Leucemia Mieloide Aguda.

Se realizó determinando: a) la valoración morfológica empleando frotis de sangre y médula ósea.

c) Valoración Morfológica.

El diagnóstico morfológico se realizó con base a los criterios establecidos por el grupo Franco-Americano-Británico (FAB). Los frotis de médula ósea y sangre periférica se tiñeron con colorante de Wright y se realizó la cuenta diferencial en 200 células al microscopio óptico.

d) Cuenta de células y evaluación de la viabilidad

Se diluyeron 5 μ L de células purificadas con 195 μ L del colorante azul de tripano 0.04% (dilución 1:40) y se realizó en cámara de Neubauer con microscopio de luz. 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 representó 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 >90% (viables) para seguir con el proceso de extracción de RNA.

e) Extracción del RNA total.

De los glóbulos blancos purificados, se transfirió el volumen correspondiente a 10 millones de células a un tubo Eppendorf nuevo, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C. 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 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 1 min, se dejó en reposo durante 5 min, se centrifugó a 12500 rpm durante 15 min a 4°C.

Se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, se adicionaron 500 µL 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 7500 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar por completo para posteriormente resuspender el precipitado (contiene el RNA) con 20 µL de agua libre de RNasa (RNase-free water QUIAGEN®). Se separó una alícuota para su cuantificación y análisis de integridad y el resto se congeló a -70°C hasta su uso

f) Cuantificación y determinación de la pureza del RNA

El RNA 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 deben estar entre 1.7 a 2.0.

g) Verificación de la integridad del RNA

Se mezcló aproximadamente 1µg de RNA con el colorante CYAN/Orange y agua inyectable en proporción (2;1;6) y se colocaron en los pozos del gel de agarosa al 1.0%. Se dejaron correr a 84V durante 45 min. Luego, se tiñó el gel con bromuro de Etidio al 0.01% durante 15 min y se visualizó en cámara de UV. 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 RNA de buena integridad.

h) Síntesis de cDNA.

Se purifican los leucocitos de médula ósea o sangre periférica y se aísla el RNA empleando el reactivo de Tripure Isolation Reagent® (Roche). Se mezclaron 2 µg de RNA total con 1 µL de hexámeros al azar (0.4 µg/µL) y se llevaron a un volumen final de 10 µL en un tubo con agua inyectable (A) y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. Se preparó una mezcla madre en otro tubo (B) con buffer coral load 10X 2.1µL (15mM MgCl₂), MgCl₂ 4.1µL (25 mM), Inhibidor RNAsas 1.1µL, dNTPS 2.1µL (10mM), Enzima RT 1.1 µL. Se mezclaron los tubos A y B, dando un total de 20 µL, 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. (Tabla I)

i) Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó la PCR con los oligos específicos para los rearrreglos *RUNX1/RUNX1T1*, *PML/RARA*, *CBFB/MYH11* aplicando las condiciones de amplificación y temperaturas de fusión específicas para cada rearrreglo. Que son las siguientes: Se preparó una mezcla con los reactivos 2 µL amortiguador 10X Coral Cyan/orange (15mM MgCl₂), 0.4 µL dNTPs (10mM), 0.8 µL MgCl₂ (25 mM) 1µL de cada oligonucleótido (10 µM), 0.1 µL Taq polimerasa (5 U/µL), 2 µL cDNA y H₂O cuanto baste para 20 µL. (Tabla II) Posteriormente se sometió a las siguientes condiciones de reacción en el termociclador: un ciclo de desnaturalización inicial (95°C durante 3 min), seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 seg), alineación (65°C durante 60 seg) y

extensión (72°C durante 60 seg). El producto de PCR se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 97 volts y se tiñó con Bromuro de Etidio al 0.01%. La presencia de una banda de peso molecular esperado según el rearrreglo molecular, indicó resultado positivo. (Tabla II)

PCR anidada

se preparó una mezcla con los reactivos: 2 µL amortiguador 10X Coral (15mM MgCl₂), 0.4 µL dNTPs (10mM), 0.8 µL MgCl₂ (25 mM) 1µL de cada oligonucleótido (10 µM), 0.1 µL Taq polimerasa (5 U/µL), 1 µL producto PCR y H₂O cuanto baste para 20 µL. Posteriormente se sometió a las siguientes condiciones de reacción en el termociclador: un ciclo de desnaturalización inicial (95°C durante 3 min), seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C durante 30 seg), alineación (65°C durante 60 seg) y extensión (72°C durante 60 seg). El producto se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 97 volts y se tiñó con Bromuro de Etidio al 0.01%. La presencia de una banda de peso molecular esperado según el rearrreglo molecular, indicó resultado positivo.

Tabla I. Reactivos para la síntesis de cDNA

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen
Hexámeros al azar	50 µM	2.5 µM	1 µL
Buffer	10 X	1 X	2 µL
MgCl ₂	25 Mm	5 Mm	4 µL
Inhibidor de RNAsas	20 U/µL	1 U/µL	1 µL
DNTPs	2.5 Mm	1 Mm	8 µL
RNA	Variable	2 µg	Variable
Enzima MuLV Reverse	50 U/µL	2.5 U/µL	1 µL
H ₂ O			cbp 20 µL

j) Cuantificación de la enfermedad mínima residual (EMR).

Se determinó al término de inducción a la remisión, al término de la consolidación y/o mantenimiento. Se realizó en las células obtenidas de 10 mL de médula ósea heparinizada y/o sangre periférica mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Donde con los amplificadores obtenidos se determinó la expresión del gen de fusión para posterior semicuantificación.

k) Semicuantificación

Los pacientes que presentaron alguno de los rearrreglos moleculares al diagnóstico, o seguimiento se continuaron evaluando mediante esta técnica.

Primeramente para determinar la sensibilidad y cantidad de ciclos de la fase logarítmica de la PCR, se realizó una curva con las líneas celulares K562 y Jurkat en la que se mezclaron dando un total de 3 millones de células: Tubo 1: 3 millones de K562 y 0 de Jurkat, Tubo 2: 300 mil K562 y 2.7 millones de Jurkat, Tubo 3: 30 mil K562 y 2 millones 970 mil de Jurkat, Tubo 4: 3 mil K562 y 2 millones 997 mil de Jurkat, Tubo 5: 0 de K562 y 3 millones de Jurkat. Luego se realizó el proceso de extracción de RNA, PCR Y PCR anidada mencionadas en los párrafos anteriores. Así se estableció las condiciones óptimas para nuestras muestras problema y gen control *ABL* siendo estos 25 ciclos y 30 respectivamente. Para la realización de la semicuantificación se utilizó el programa [software Quantity one. \(BIORAD\) versión 3.6.9](#) donde se analizó la expresión del gen control *ABL* de cada uno de los pacientes de las muestras obtenidas y se analizó paralelamente la expresión del gen de fusión para cada caso en particular mediante el análisis de bandas. La aplicación del software Band Analysis (Quantity one) identifica en forma automática las bandas de cada carril de corrimiento, luego determina la intensidad de la banda en valores arbitrarios.

Tabla II. Reactivos para la PCR de los genes de fusión.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen
PCR Buffer	10X (15 mM de MgCl ₂)	1X	2 µL
MgCl ₂	25Mm	1.6 mM	0.8 µL
Oligonucleótido Directo	10 µM	0.5 µM	1 µL
Oligonucleótido Reverso	10 µM	0.5 µM	1 µL
DNTPs	10 Mm	0.2 mM	0.4 µL
Taq DNA polimerasa	5U/µL	0.025U/µL	0.1 µL
cDNA		Variable	2 µL
H ₂ O		-	Cbp 20 µL

En un tubo se ensayaron los oligonucleótidos PML-A1 con RARA-B y en otro los oligonucleótidos PML-A2 con RARA-B para la búsqueda del gen de fusión PML-RARA. Para el gen de fusión CFBF-MYH11 se emplearon los oligonucleótidos CFBF-A con MYH11-B1 y CFBF-A con MYH11-B2. Para el gen de fusión RUNX1/RUNX1T1 se emplearon los oligonucleótidos AML1-A y ETO-B en reacciones separadas.

Tabla III. Oligonucleótidos para el análisis de los genes de fusión *PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1* y *CBFB/MYH11*.

NOMBRE DEL OLIGO	POSICION 5' (TAMAÑO)	SECUENCIA (5'-3')
AML1-A	884(21)	CTACCGCAGCCATGAAGAACC
ETO-B	495(21)	AGAGGAAGGCCATTGCTGAA
AML1-C	920(22)	ATGACCTCAGGTTTGTGGTTCG
ETO-D	396(22)	TGAACTGGTTCTTGGAGCTCCT
PML-A1	1438(21)	CAGTGACGCCTTCTCCATCA
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
CBFB-A	253(22)	GCAGGCAAGGTATATTGAAGG
MYH11-B1	1316(20)	TGAAGCAACTCTGGGTGTC
MYH11-B2	2116(22)	TCCTCTTCTCCTATTCTCGTC
CBFB-C	345(20)	GGGCTGTCTGGAGTTTGATG

MYH11-D1	1225(20)	TCCCTGTGACGCTCTCAACT
MYH11-D2	2061(18)	CTTGAGCGCCTGCATGTT

Tabla IV. Tamaño del producto de PCR en pares de bases y combinación de oligonucleótidos.

GEN DE FUSION	ISOFORMA	A- B	C- D	A1-B	A2--B	C1-D	C2-D	A-B1	A-B2	C-D1	C-D2
<i>AML1/ETO</i>	--	395	260	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>PML/RARA</i>	BCR1	--	--	381	(1329) ^a	214	(688)	--	--	--	--
	BCR2	--	--	345	(819)	178	(652 ^a)	--	--	--	--
	BCR3	--	--	--	376	--	289	--	--	--	--
<i>CBFB/MYH11</i>	A	--	--	--	--	--	--	--	418	--	271
	B	--	--	--	--	--	--	--	630	--	483
	C	--	--	--	--	--	--	--	811	--	664
	D	--	--	--	--	--	--	338	(1138)	155	(991)
	E	--	--	--	--	--	--	595	(1345)	362	(1198)
	F	--	--	--	--	--	--	--	322	--	175
	G	--	--	--	--	--	--	242	(1042)	59	(895)
	H	--	--	--	--	--	--	344	(1149)	161	(997)
	I	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	J	--	--	--	--	--	--	--	1033	--	886

a: tamaño de productos en bcr2 debido a la región de punto de ruptura.

l) Testigos.

Controles Negativos:

Se emplearon 10 ml de SP de sujetos sanos.

Controles positivos:

Se emplearon 10 ml de MO y/o SP de pacientes conocidos con anomalías cromosómicas.

m). Análisis Estadístico

La correlación de las variables se realizó mediante chi-cuadrada y de medidas repetidas.

m) Consideraciones éticas

El médico encargado les explicó en que consiste el proyecto y lo que se requirió para el estudio de la enfermedad mínima residual (EMR), para lo cual firmaron la carta de consentimiento (anexo I,IV y V) en la que están de acuerdo en participar en el proyecto. Al paciente se le explicó claramente que las muestras requeridas son las que normalmente se toman para el diagnóstico de la enfermedad y para realizar su vigilancia clínica, sin embargo, se explicó que para las muestras se aplica un procedimiento invasivo y que puede provocar moretón, dolor y/o hinchamiento en la zona de la punción, se comentó que no se requerirán muestras adicionales a las captadas en los momentos determinados y que estas no conllevan ningún riesgo al paciente. Los aspirados de médula ósea lo realizaron los médicos de base adscritos al servicio, con las medidas necesarias para prevenir cualquier complicación. Se cumplieron los aspectos de anonimato, respeto y apego a todos los principios bioéticos vigentes implementados por los comités de bioética, así como a la declaración de Helsinki.

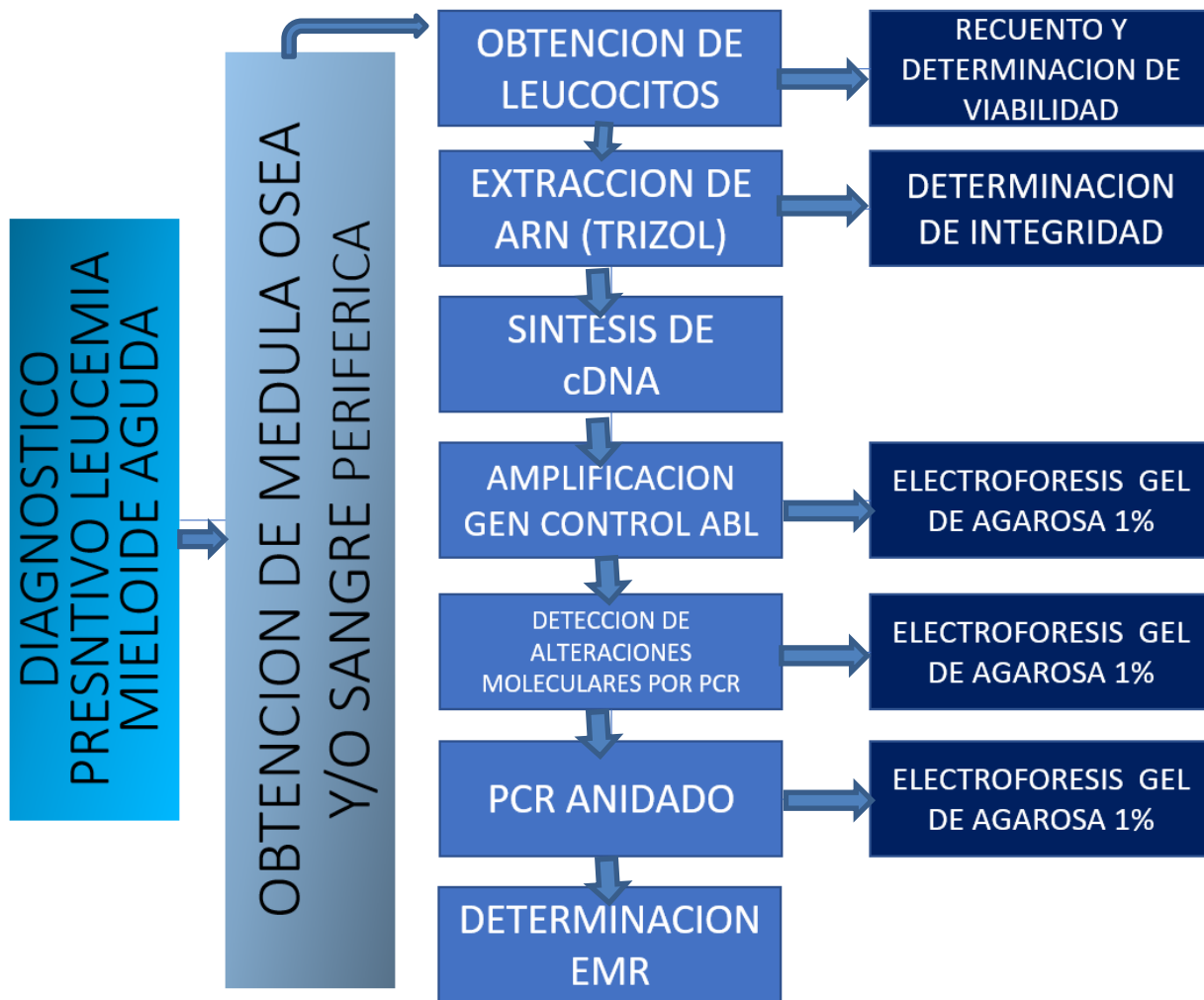


Fig.7: Esquema general del trabajo.

9. RESULTADOS

Pacientes con LMA

Inicialmente se incluyeron 16 pacientes con diagnóstico probable de leucemia mieloblástica aguda, distribuidos en 3 casos (18.75%) con LMA-M2 al diagnóstico, 9 casos (56.25%) de LMA-M3 y 4 (25.0%) de LMA-M4, durante el período mayo 2016 a abril de 2017. A 6 casos se les dio seguimiento molecular durante el tratamiento (37.5%). (Tabla V).

TABLA V: Información general de los pacientes incluidos en el estudio.

TIPO DE LEUCEMIA	CODIGO PACIENTE	SEXO ^f	TIPO DE MUESTRA	INSTITUCION DE PROCEDENCIA	MONITOREO
LMA-M3	VCLR	M	SP, MO	IMSS ^a	SI
LMA-M3	PBDS	M	SP ^d	IMSS	SI
LMA-M3	PSS	F	SP	CIVIL ^b	SI
LMA-M3	ZEDA	M	MO ^e	CIVIL	NO
LMA-M3	BAS	M	SP	IMSS	SI
LMA-M3	OCC	M	SP	IMSS	NO
LMA-M3	CVJ	M	SP	CIVIL	NO
LMA-M3	VAS	F	SP	CIVIL	NO
LMA-M3	CLR	M	SP	CIVL	NO
LMA-M2	ARMM	F	SP	INFANTIL ^c	SI
LMA-M2	MCB	F	SP	CIVIL	NO
LMA-M2	ALA	M	SP	CIVIL	NO
LMA-M4	BCALE	F	MO	IMSS	NO
LMA-M4	SOML	F	SP	CIVL	SI
LMA-M4	CLJM	M	SP	CIVIL	NO
LMA-M4	VAS	F	SP	CIVIL	NO

a: Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social, b: Hospital General de Morelia "Dr. Miguel Silva" de la Secretaría de Salud, c: Hospital Infantil de Morelia "Eva Sámano de López Mateos" de la Secretaría de Salud, d: Sangre periférica, e: Medula ósea, f: sexo M masculino, F femenino.

Distribución por edad

Al agruparse los pacientes de acuerdo a grupos etarios de importancia pronostica se encontró que el grupo de menores de 18 años fue de 2 personas (12.5%) y el grupo mayor de 18 años fue de 14 personas (87.5%). Teniendo una media de 28.87 años.

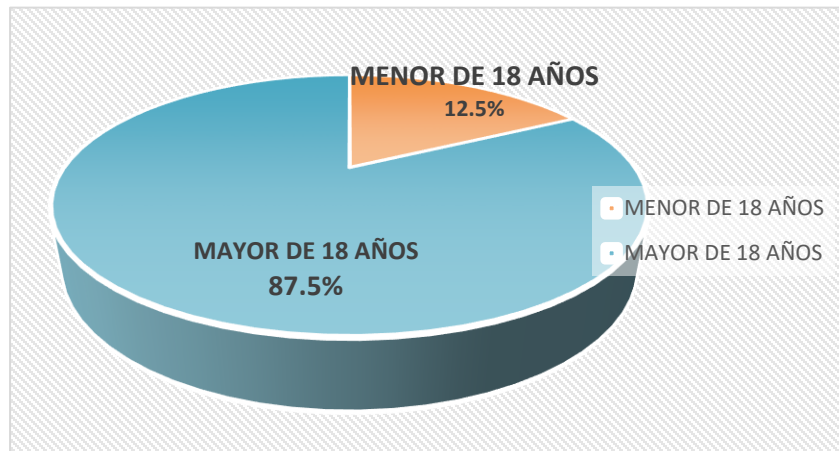


Fig. 8: Distribución por edad.

Distribución por sexo

De los 16 pacientes 9 de ellos correspondieron a pacientes del sexo masculino (56.25%) y 7 de ellas a pacientes del sexo femenino (43.75%).

-

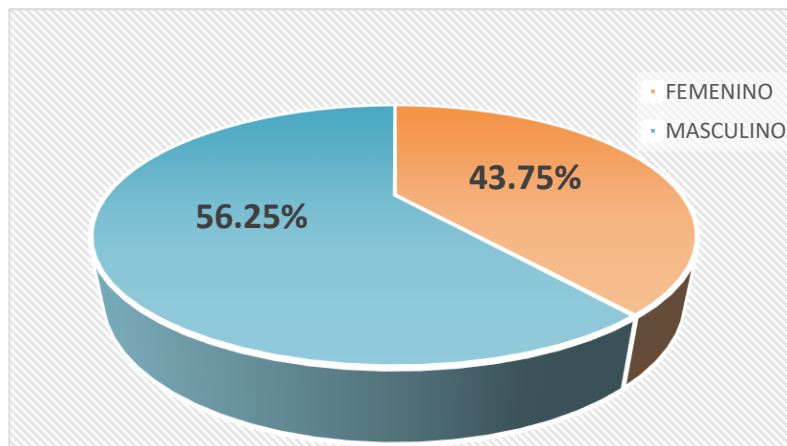


Fig. 9: Distribución por sexo.

Cuenta de células

El 56.3% de los pacientes presentó cifras absolutas de leucocitos menores a los parámetros normales que es de 5,000 a 10,000/ μ L. (Tabla VI) Con una media de $35.04 \times 10^3/\mu$ L. En la cuenta mayor a 50,000/ μ L en nuestro estudio encontramos el 15%. Con una media de $181.80 \times 10^3/\mu$ L. El 56.25% de los pacientes presentaron anemia al observar cifras menores a los parámetros normales para la hemoglobina que es de 12-16 gr/dL para las mujeres y de 14-18 gr/dL. El 62.5% de los pacientes presentaron cifras menores a los parámetros normales para las plaquetas que es de 250,000 a 400,000/ μ L con una media de $183.46 \times 10^3/\mu$ L. Al comparar el promedio de leucocitos al diagnóstico vs consolidación se observó, una disminución en la consolidación (Fig.10)

Tabla VI: Parámetros hematológicos de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda.

CODIGO PACIENTE	WBC	HB	PLT
PBDS/01	11.4	9.9	371,000
PSS/02	3.3	7.7	7,000
VAS/03	14.0	*	*
BCA/04	168	*	*
BAS/05	2.5	14.9	215,000
VCLR/06	2.1	*	*
PSS/07	4.1	7.9	562,000
PBDS/08	9.6	9.8	275,000
ARMM/09	15.6	8.8	98,000
SOML/10	33.2	8.7	43,000
VCLR/11	2.5	15.8	5,500
PBDS/13	11.5	12.4	371,000
OCC/14	4.0	10.5	254,000
CVJ/15	23.0	5.5	27,000
VAS/16	3.5	12.5	340,000
ARMM/18	1.6	10.8	66,000
ALA/19	98.4	6.9	15,000
SOML/20	8.9	13.1	166,000
CLR/21	4.7	9.1	120,000
CLJM/22	279	*	*

*Parámetro no determinado.

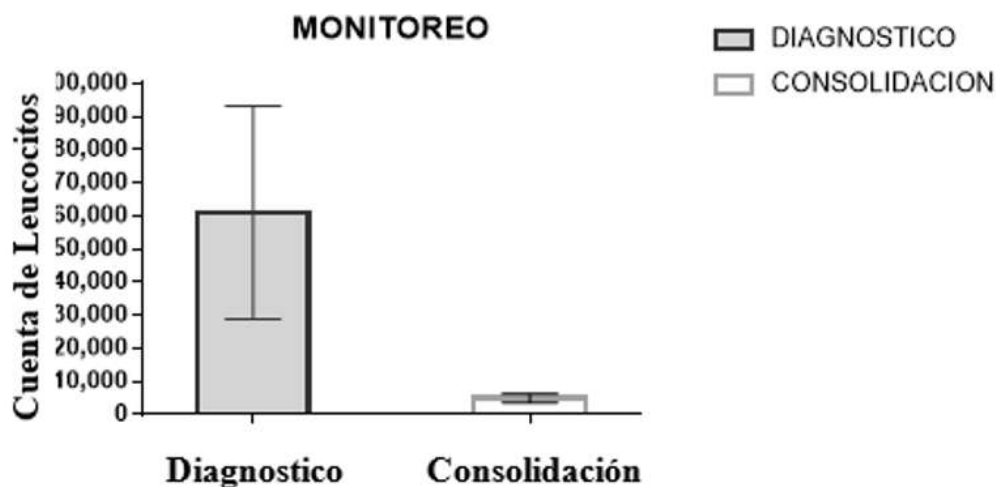


Fig. 10. Cuenta de glóbulos blancos en los pacientes con LMA. Antes (diagnostico) y después (consolidación) del tratamiento, de las muestras empleadas para determinar la enfermedad mínima residual.

Integridad del RNA

De las 23 muestras que se procesaron, solo una fue de mala integridad, una regular y el resto de buena integridad. (Fig. 11) La de mala integridad, se descartó.

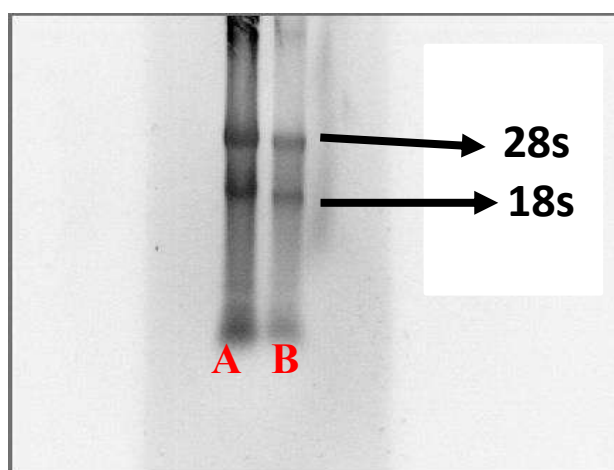


Fig. 11 Integridad del RNA. En la imagen se muestran las bandas 28S y 18S del RNA ribosomal de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. El carril A corresponde al paciente PBDS y el carril B al paciente VCLR. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 84 volts y se tiñeron con bromuro de Etidio al 0.01% durante 10 minutos; posteriormente se visualizaron en cámara de UV.

Gen control *ABL* normal

De las 23 muestras analizadas todas fueron positivas al gen *ABL*, lo que representó el 100% de casos con los que se pudo continuar para la búsqueda de los genes de fusión dependiendo del subtipo de leucemia que presentaron cada uno de los pacientes. (Fig. 12)

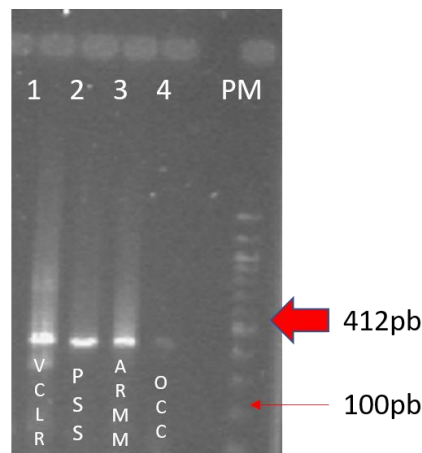


Fig. 12 Expresión del gen control *ABL*. Carril 1: paciente VCLR, Carril 2: paciente PSS, Carril 3: paciente ARMM, Carril 4: paciente OCC. La banda de 412 pb indica la expresión del gen *ABL*. PM: Marcador de peso molecular en múltiplos de 100 pb. Las muestras se corrieron como en las condiciones descritas en la figura 11.

Gen de fusión *PML-RARA*

A los 4 pacientes con LMA-M3 al diagnóstico que se les determinó el gen *PML-RARA*, fueron positivos, es decir representó el 100% de los casos. Las isoformas se distribuyeron de la siguiente manera bcr1 2 pacientes (50%) y bcr3 2 pacientes (50%). Posteriormente se realizó monitoreo en 3 casos (2 pacientes y 1 de seguimiento) en termino de inducción a la remisión para la expresión de gen de fusión *PML-RARA* siendo positivos, representando nuevamente 100% de los casos. Las isoformas fueron bcr1 2 casos (66.6%) y bcr3 1 caso (33.3%). Se monitoreo 3 casos más (2 de seguimiento y 1 en consolidación) en esquema de termino de consolidación para la expresión de gen de fusión *PML-RARA* siendo positivos 2 (66.6%) con isoforma bcr1(100%) ya que el caso de consolidación fue negativo. De los 4 casos siguientes (2

de seguimiento y 2 de mantenimiento) en esquema de termino de mantenimiento para la expresión de gen de fusión *PML-RARA*, 2 fueron positivos (50%) tratándose de isoformas bcr1 (50%) y bcr3(50%) ya que los otros 2 casos se negativizaron. (Tabla VII) Dándonos un total de 14 muestras analizadas para LMA-M3 en diferentes lapsos de tiempo. Cabe mencionar que todos estos casos de LMA-M3 expresaron el gen *ABL* normal, y que estos fueron quienes se incluyeron al estudio, Dichas isoformas se confirmaron por la presencia de un producto de 381 pb y 376 pb en la PCR (Fig.13), otra de 214 pb y 284 pb en la PCR anidada para bcr1 y bcr3, respectivamente.

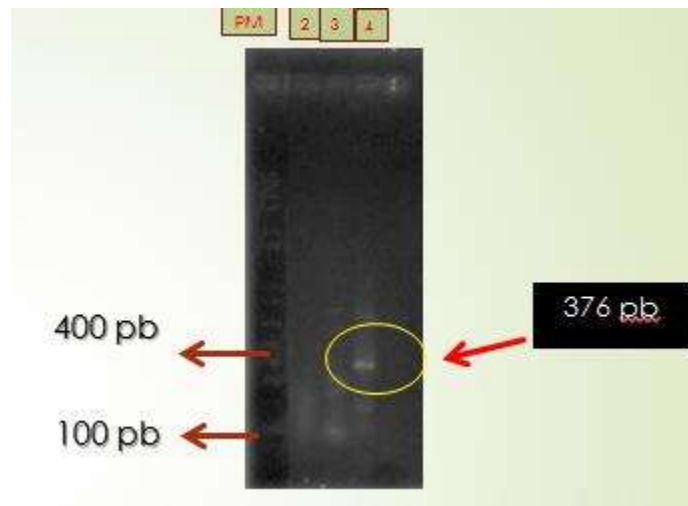


Fig. 13 Expresión del gen de fusión *PML/RARA* En paciente con LMA-M3. Carril 2 y carril 3 muestras control negativo. carril 4: paciente con LMA-M3 PSS. La banda de 376 pb indica la expresión de la isoforma bcr3 del gen de fusión *PML/RARA*. PM: Marcador de peso molecular en múltiplos de 100pb. Las muestras se corrieron como en las condiciones descritas en la figura 11.

TABLA VII: Seguimiento molecular de los pacientes mediante la expresión del gen de fusión.

PACIENTE	DIAGNOSTICO	ISOFORMA DEL GEN DE FUSION	DE NOVO	INDUCCIÓN A LA REMISIÓN	CONSOLIDACIÓN	MANTENIMIENTO	ESTADO ACTUAL
VCLR	LMA-M3	BCR1	ND ^a	POS	POS	POS	VIVO
PBDS	LMA-M3	BCR1	ND	POS	POS	NEG	VIVO
PSS	LMA-M3	BCR3	POS ^b	POS	ND	ND	VIVO
ZEDA	LMA-M3	BCR1	POS	ND	ND	ND	FINADO
BAS	LMA-M3	AUSENTE	ND	ND	ND	NEG	VIVO
OCC	LMA-M3	BCR3	ND	ND	ND	POS	VIVO
CVJ	LMA-M3	BCR3	POS	ND	ND	ND	VIVO
VAS	LMA-M3	AUSENTE	ND	ND	NEG	ND	VIVO
CLJM	LMA-M3	BCR1	POS	ND	ND	ND	FINADO
ARMM	LMA-M2	AML1-ETO	POS	POS	ND	ND	FINADO
MCB	LMA-M2	AUSENTE	NEG	ND	ND	ND	FINADO
ALA	LMA-M2	AML1-ETO	POS	ND	ND	ND	VIVO
BCALE	LMA-M4	AUSENTE	NEG	ND	ND	ND	FINADO
SOML	LMA-M4	ISOFORMA "A"	ND	POS	NEG	ND	VIVO
CLR	LMA-M4	AUSENTE	ND	NEG	ND	ND	VIVO
VAS	LMA-M4	AUSENTE	NEG	ND	ND	ND	VIVO

a: ND No se realizó la determinación del gen de fusión. B: Positivo indica que expresó el gen de fusión, Negativo indica que no expresó el gen de fusión.

Gen de fusión *CBFB-MYH11*

De los 4 casos con LMA-M4, sólo un caso (25%) expresó el gen de fusión *CBFB-MYH11*, el cual correspondió a la isoforma A (Tabla VII, Figura 14). El caso que expresó el gen de fusión se encontraba en inducción a la remisión cuando se tomó su primera muestra. Al darle seguimiento, se obtuvo una segunda muestra durante su consolidación y el resultado fue negativo al gen de fusión.

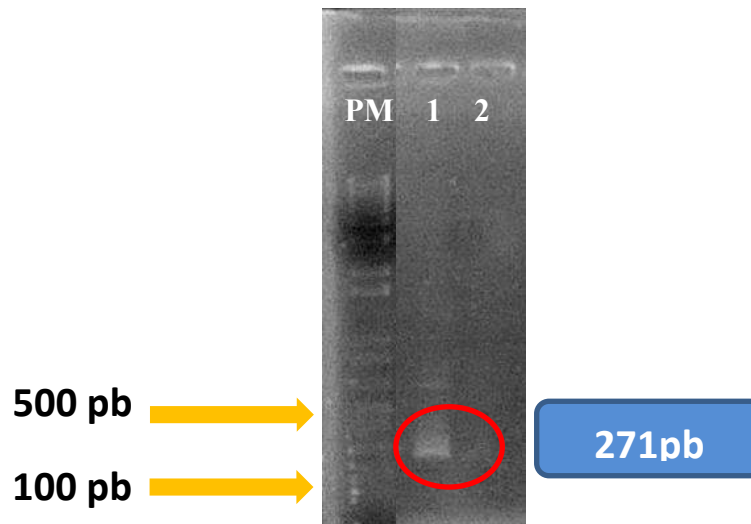


Fig. 14 Expresión del gen de fusión *CBFB/MYH11* en paciente con LMA-M4. Donde se muestra el tamaño de pares de bases a 25 ciclos para el paciente SOML (Carril 1). La banda de 271 pb indica la expresión de isoforma A del gen de fusión *CBFB-MYH11*. Carril 2 muestra negativa. PM: Marcador de peso molecular en múltiplos de 100pb. Las muestras se corrieron como en las condiciones descritas en la figura 11.

Gen de fusión *AML1-ETO* también denominado *RUNX1-RUNX1T1*

Para los 3 casos evaluados de LMA-M2 al diagnóstico, para el gen de fusión *RUNX1-RUNX1T1* solo 2 casos fueron positivos al gen de fusión el cual representó el 66.6%. Posteriormente se pudo dar seguimiento al termino de inducción a la remisión el cual continuó expresando el gen de fusión. (Tabla VII, Figura 15).

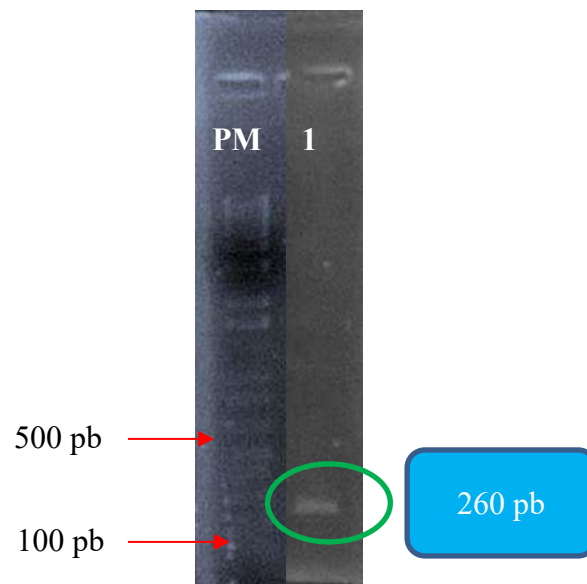


Fig. 15. Expresión del gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1* en paciente con LMA-M2 donde se muestra el tamaño de pares de bases a 25 ciclos para el gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1* para el paciente ARMM (Carril 1) PM: Marcador de peso molecular en múltiplos de 100pb. Las muestras se corrieron como en las condiciones descritas en la figura 11.

SEMICUANTIFICACIÓN DE LOS GENES DE FUSIÓN

La semicuantificación se realizó con el programa [software Quantity one \(BIORAD\)](#) versión 4.6.9 donde se analizó la expresión del gen control *ABL* de cada uno de los pacientes y la expresión del gen de fusión mediante cuantificación de la intensidad de las bandas. Se realizó de la siguiente manera: Se selecciono la banda del gen *ABL* o la del gen de fusión, y se marcó, con la herramienta “strech image” se colocó en el centro de las líneas (Fig. 16). Posteriormente, se generó un ajuste y se eliminó el fondo para que la medición fuera únicamente de la banda seleccionada de acuerdo con la sensibilidad deseada, se seleccionó detectar bandas y se eliminaron las bandas inespecíficas, luego se seleccionó el estándar, en nuestro caso se eligió el marcador de peso molecular de 1kb y al final se solicitó generar análisis. La expresión del gen de fusión se calculó tomando en cuenta la intensidad del valor obtenido en la expresión del gen *ABL*, considerándolo como el 100% y la intensidad de expresión del gen de fusión como la parte proporcional.

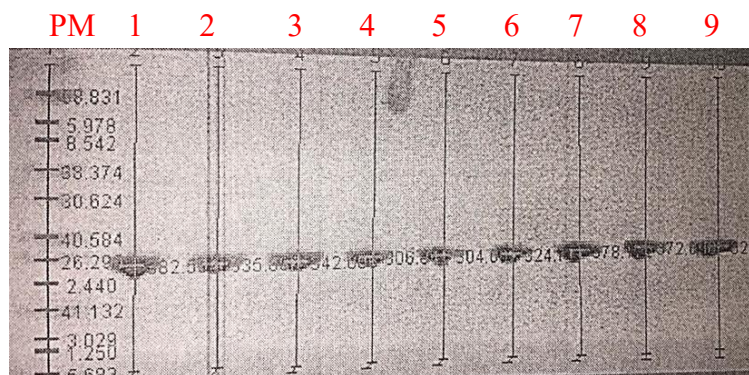


Fig. 16. Mediciones mediante software Quantity one (BIORAD). Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular 1kb utilizado como estándar con los valores determinados para cada banda. Carriles 1-9 expresión del gen *ABL* a 25 ciclos en gel de poliacrilamida con los valores determinados para cada banda.

TABLA VIII: Semicuantificación del gen de fusión *PML/RARA*.

PACIENTE	GEN CONTROL ABL 1ER MED	GEN CONTROL ABL 2DA MED	GEN CONTROL ABL 3RA MED	1ER MEDICION GEN PML/RARA	2DA MEDICION GEN PML/RARA	3ERA MEDICION GEN PML/RARA	PROMEDIO EXPRESION #1	PROMEDIO EXPRESION #2	PROMEDIO EXPRESION #3
PBDS	382.56	335.88	342.01	42.0	303.01	794.01	10.97%	90.2%	232.16%
PSS	306.84	304.01	ND*	202.0	290.0	N/D	65.83%	95.39%	N/D
VCLR	324.71	378.17	324.33	447.0	746.0	306.01	137.66%	197.26%	87.74%

Mediciones de los 3 pacientes con seguimiento de acuerdo a la expresión que presentaron los genes de fusión para *PML/RARA* y los genes control ABL en geles de poliacrilamida, así como el promedio en cada uno de ellos. *ND: No determinado.

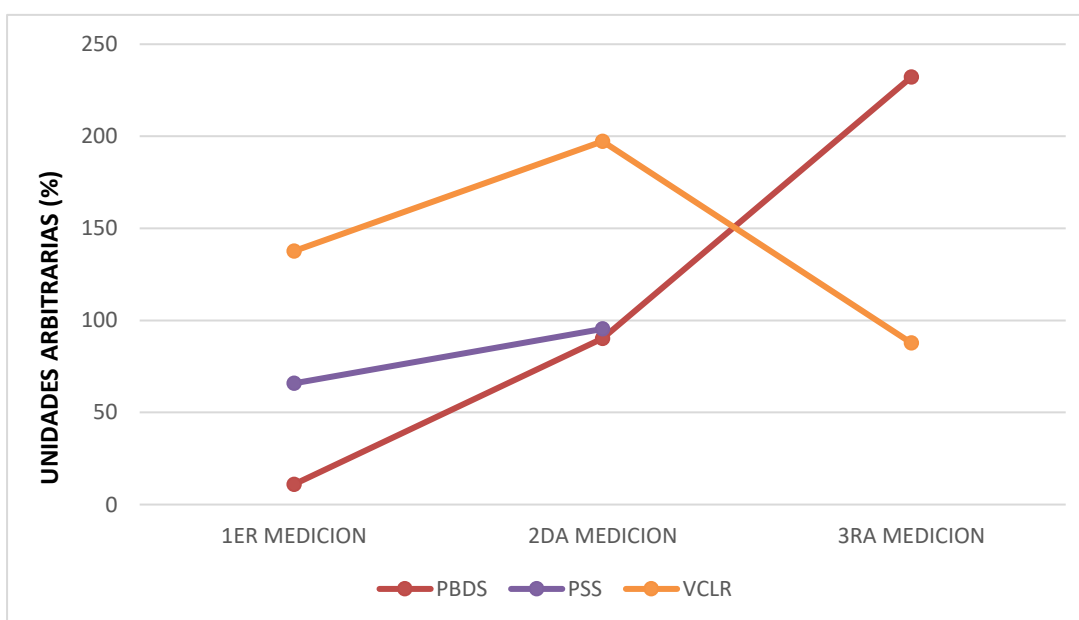


Fig. 17 Nivel de expresión *PML/RARA* en el seguimiento molecular. De acuerdo con análisis realizado y esquema de tratamiento. Paciente PBDS (1er medición termino inducción remisión, 2da medición termino consolidación y 3era medición mantenimiento) Paciente PSS (1er medición al diagnóstico, 2da medición termino inducción remisión) Paciente VCLR (1er medición termino inducción a la remisión, 2da medición termino consolidación y 3er medición mantenimiento).

Descripción Pacientes de seguimiento con Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)

El paciente **PBDS** expresó la isoforma bcr1. Su primera muestra presento un descenso en la carga del gen de fusión de un 89.03% presentando únicamente 10.97% para *PML/RARA*. Sin embargo, en el segundo monitoreo 30 días después presento un aumento por una recaída presentada de hasta un 79.23% de lo que se encontraba originalmente, ya que expreso un 90.2%. Para el tercer y último monitoreo 60 días después de la administración de quimioterapia de consolidación el paciente presento otro aumento de 141.96%. (tabla VIII)

En el paciente **PBDS** se generó una recaída por una infección por aspergilosis, neumonía y micosis cutánea por lo que se encontraba inmunosuprimido para la administración quimioterapéutica necesaria, por lo que permaneció 15 días en terapia intensiva, al análisis de su muestra correspondiente se observó claramente la tendencia en aumento a la expresión del gen de fusión *PML/RARA*, pasados estos 15 días se administró quimioterapia y se dejó aproximadamente 60 días para el siguiente monitoreo el cual nos demostró que este nunca se negativizó y que el paciente presentó un aumento en la expresión, lo que se puede deducir como un fallo en el esquema administrado para este caso.

El paciente **PSS** expresó isoforma bcr3. Al diagnostico presentó una expresión del gen de fusión *PML/RARA* de 65.83%, sin embargo, a los 70 días posteriores del tratamiento de inducción a la remisión presento un aumento de 24.37% ya que expreso un 95.39%. (Tabla VIII)

En el paciente **PSS** solo se lograron 2 monitoreos, esto por la ausencia del fármaco en el hospital en cuestión y por las dificultades personales para continuar con el tratamiento, por lo que la segunda medición presentó un aumento en la expresión del gen *PML/RARA* aunque fue en una proporción pequeña, con esta tendencia se podría

deducir que si existiera una tercera medición probablemente la expresión también se encontraría en aumento como el caso anterior.

El paciente **VCLR** expresó isoforma bcr1. Se encontraba en remisión sin embargo se observó una expresión del gen de fusión *PML/RARA* de 37.66% mayor a la que se esperaba encontrándose ya en este ciclo quimio terapéutico. Se le realizó una segunda medición control 35 días después del tratamiento de consolidación y demostró un aumento nuevamente de 59.6% por lo que fue candidato para trasplante hematopoyético, se analizó nuevamente después de este procedimiento presentando un descenso en la expresión de hasta un 109.52% del gen de fusión *PML/RARA*. (Tabla VIII)

Cabe mencionar que el paciente **VCLR** no contaba con estudios moleculares previos, por lo que su mejoría era basada o establecida mediante biometría hemática completa. Por lo que dado a los resultados obtenidos en nuestro estudio su médico tratante lo propuso como candidato para trasplante de precursores hematopoyéticos, 3 meses después de analizó tanto medula ósea como sangre periférica y se observó una disminución en el gen de fusión *PML/RARA* muy representativa y favorable para la evolución del paciente.

TABLA IX: Semicuantificación del gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1*

PACIENTE	GEN CONTROL ABL 1RA MED	GEN CONTROL ABL 2DA MED	1ER MEDICION GEN RUNX1/RUNX1T1	2DA MEDICION GEN RUNX1/RUNX1T1	PROMEDIO EXPRESION #1	PROMEDIO EXPRESION #2
ARMM	323.01	345.01	459.81	445.85	142.35%	129.23%
ALA	448.01	ND*	371.72	ND	82.97%	ND

Mediciones de acuerdo a la expresión que presentaron los genes de fusión para *RUNX1/RUNX1T1* y los genes control *ABL* en geles de poliacrilamida, así como el promedio respectivo a cada uno de ellos. *ND: No determinado.

Descripción Pacientes de seguimiento con Leucemia Mieloblástica Aguda (M2)

El paciente **ARMM** al diagnóstico presentó un aumento en la expresión de 42.35% en el gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1*. Posteriormente en la segunda medición a los 60 días posteriores presentó un descenso de 13.12% en la expresión del gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1*. (Tabla IX)

El paciente **ARMM** solo se lograron 2 monitoreos, al diagnóstico presento hepatomegalia y posterior al primer esquema de quimioterapia, aunque la expresión de disminuyo de *RUNX1/RUNX1T1* desarrollo otra patología para la cual necesitó radioterapia. Sin embargo, aun con estos esquemas falleció después de 7 meses debido a las inmunosupresiones.

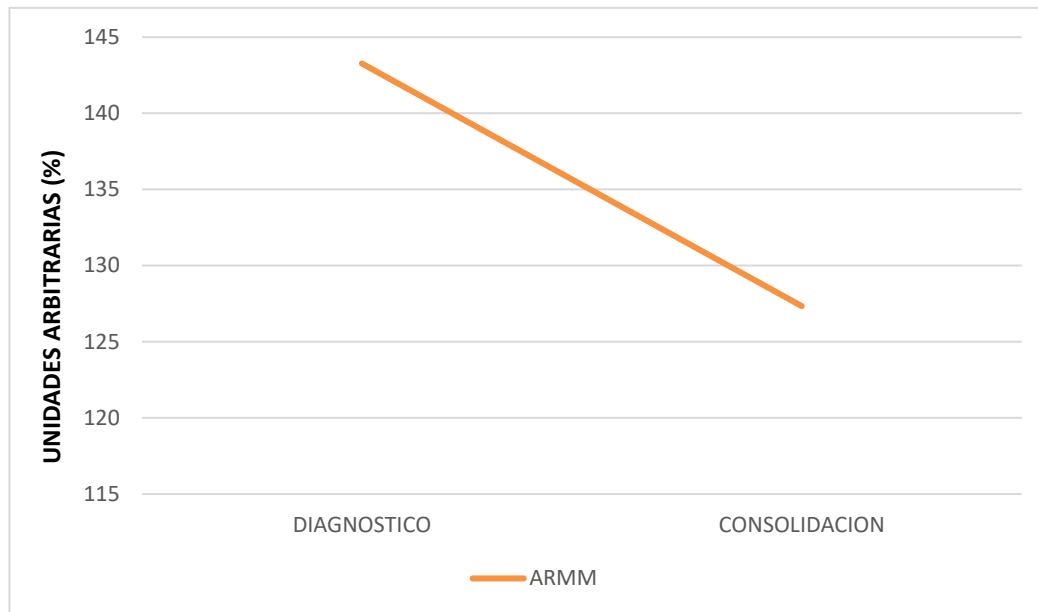


Fig. 18 Expresión *RUNX1/RUNX1T1* de acuerdo con análisis realizado y esquema de tratamiento. Paciente ARMM (1er medición al diagnóstico, 2da medición término consolidación).

10. DISCUSIÓN

A pesar de los grandes avances en la caracterización genético-molecular de la leucemia mieloide aguda, existen todavía muchas preguntas que esperan respuesta. Las anomalías cromosómicas, t(8;21), t(15;17) y inv(16) son reconocidas como marcadores específicos en leucemias mieloides agudas (LMA) presentando un factor pronóstico favorable. La habilidad para detectar esos rearrreglos en pacientes no solo es importante para el diagnóstico, sino que es crucial para la estratificación del tratamiento y el manejo clínico de estos pacientes.

La amplificación de la transcripción de los genes por RT-PCR es una de las alternativas viables con sensibilidad y especificidad de alto impacto esto en comparación con los análisis convencionales de los cromosomas.

El conocimiento sobre la distribución genética de los subtipos de LMA en México, es incipiente. Existe información sobre un aumento en la prevalencia en t(15;17) mas no t(8;21), inv(16) o alguna de sus variantes.²⁴

Pudimos determinar de todos los casos con diagnóstico *de novo* a los cuales se les atribuyó una Leucemia Mieloide Aguda tipo M3 todos los casos fueron positivos para el rearrreglo *PML/RARA* es decir el 100% de estos lo expreso. (Tabla V) lo cual nos deja un paradigma en cuáles serán los valores estimados en la población mexicana de la expresión de este gen antes de los tratamientos quimioterapéuticos ya que no existen registros actualizados, ni reportes que establezcan estas estadísticas. Solamente los establecidos por Mejía-aranguré y col: donde reportaron un aumento del 30% en LPA y lo asociaron directamente a factores ambientales y socioeconómicos de la población estudiada.

En el presente estudio, encontramos que el gen de fusión *CBFB-MYH11* representó el 25% de los casos de LMA-M4 obtenidos de estas instituciones. Y de un 6.6% de la población completa en este estudio. Este tipo de leucemia se encuentra entre los principales subtipos citogenéticos de LMA siendo reportado hasta en un 30-40% en casos con anomalías citogenéticas de LMA-M4²⁵ y de un 5-10% en la población general. Lo cual nos permite deducir que los porcentajes obtenidos pueden ser por la

cantidad tan pequeña que se obtuvo de este tipo de muestras ya que se expresó un porcentaje menor al esperado. La proporción del gen de fusión *PML/RARA* en nuestro estudio fue de un 76.9%, en concordancia a lo reportado por Brockman y col, que reportaron tasas que oscilaron entre 70-90%. Ya que la alteración es permanente en varios casos que presentaron resistencia en este gen de fusión aun con el tratamiento quimioterapéutico. En cuanto a la proporción del gen de fusión *RUNX1/RUNX1T1* en nuestro estudio fue de un 13.3% esto se justifica debido a que solo pudimos obtener 4 muestras presuntivas con este tipo de rearrreglo.

En cuanto a los parámetros hematológicos se utilizó una prueba de chi cuadrada para

11. CONCLUSIONES

Debido a la variabilidad genética de la población mexicana, la falta de registros, ausencia en la mayoría de los casos de estudios moleculares, de seguimientos adecuados a los pacientes y dado que la alteración es permanente en varios casos que presentaron resistencia a alguno de los genes de fusión analizados en este estudio, aun con la administración de tratamiento adicional. Recomendamos generar el análisis por un lapso de tiempo mayor, esto nos llevaría a un incremento en la captación de pacientes para obtener resultados comparativos y concretos, no sin antes destacar la importancia que se obtuvo al realizar estos análisis en pacientes con este tipo de patología ya que se realizaron cambios en los esquemas quimioterapéuticos por parte de los médicos, obteniendo en algunos casos respuesta favorable, aunque fueran en una proporción pequeña.

12. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Ravindranath Y. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 2003; **15**:23-35
- 2.-Tirado y Mohar, Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. Instituto Nacional de Cancerología 2007: 109-120
- 3.- Larson RA, Williams SF, Le Beau MM, Bitter MA, Vardiman JW, Rowley JD. Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils and inv(16) or t(16;16) has a favorable prognosis. *Blood*. 2004; **68**: 1242-1249.
- 4.- Martinelli G, Ottaviani E, Testoni N. Molecular remission in PCR-positive acute myeloid leukemia patients with inv(16): role of bone marrow transplantation procedures. *Bone Marrow Transplant*. 1999; **24**: 694-697.
- 5.- Liu Y, Grimwade D. Minimal residual evaluation in myeloid leukaemia. *The Lancet* 2002; **360**:160-162
- 6.- 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.
- 7.- Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Constan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract & Res Clin Haematol* 2003; **16**:599-612.
- 8.- Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; **38**: 139-152.

- 9.- Venditti A, Buccisano F, Del Poeta G et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; **96**: 3948-3952
- 10.- Campana D. and Coustan S. E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999; **38**: 139-152.
- 11.- Gabert J. Beillard E., Velden V. 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.
- 12.- Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; **17**:1013-1034.
- 13.- Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud O. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *J Biomed Biotechnol* 2011; **16**:1020-1023
- 14.- Rubnitz JE, Crist WM. Molecular genetics of childhood cancer: Implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics* 1997; **100**:101-108.
- 15.- Harrison CJ. The management of patients with leukemia: The role of cytogenetics in the molecular area. *Br J Haematol* 2000; **108**:19-30.
- 16.- Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. 2012; **119**(2):332–341.

- 17.- Perea G, Lasa A, Aventin A, Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)] 2006: **20(1)**:87–94.
- 18.- Seegmiller, A., M. Jagasia. CFBF-MYH11 inv(16)(p13.1q22) Inversion in Acute Myeloid Leukemia. My Cancer Genome. 2015.
- 19.- Rubnitz JE, Crist WM. Molecular genetics of childhood cancer: Implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics* 1997; **100**:101-108.
20. Dávila-Rodríguez, M. I., Márquez-Solís, R., Cortés- Gutiérrez, E. I., Pérez-Cortés, P., Cerda-Flores, & Novelo-Huerta, H. I. Indicadores nutricionales en niños con leucemia linfoblástica Aguda. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010: **48(6)**, 639–644.
21. BioLegend Cell Markers. (2013). BioLegend. Retrieved March 2, 2014, from https://www.biolegend.com/cell_markers
22. Dorantes-Acosta, E., Medina-Sansón, A., Dávila-Rodríguez, M. I., & López-Martínez, B..Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2013:**12(3)**, 136–142.
23. Forestier, E., Heim, S., Blennow, E., Borgström, G., Holmgren, G., Heinonen, K., the NOPHO Leukaemia Cytogenetic Study Group (NLCSG). Cytogenetic abnormalities in childhood acute myeloid leukaemia: a Nordic series comprising all children enrolled in the NOPHO-93-AML trial between 1993 and 2001. *British Journal of Haematology*, 2003:**121(4)**, 566–577.

24. Zhang JG, Lin F, Chase A. Comparison of genomic DNA and cDNA for detection of residual disease after treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; **87**: 2588-2593.
25. Langebrake C, Creutzig U, Dworzak M. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM study group. 2006: **24**(2):3686–3692
26. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud O. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *J Biomed Biotechnol*. 2011.
27. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 ;**114**(5):937-51.
28. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, et al, for the European Organization for Research and Treatment of Cancer–Childhood Leukemia Cooperative Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; **339**: 591–98.
29. Van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998; **352**: 1731–3.

13. ANEXO I.

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
HOSPITAL _____ MORELIA, MICH.
Servicios de Medicina Interna – Hematología - Oncología
U.M.S.N.H – 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 se alcanza la remisión completa.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación **“DETECCION DE LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA MEDIANTE GENES DE FUSION”**

Registrado ante el comité local de investigación con el número: _____ El objetivo de este trabajo es determinar la alteración molecular en pacientes con leucemia mieloide aguda así como la enfermedad mínima residual y asociarlos al progreso de la enfermedad. En este proyecto se utiliza material genético que no será utilizado para otro tipo de estudio, solo para el establecido en esta investigación. Se me ha explicado que se utilizarán aproximadamente 10 mL o su equivalente de médula ósea y/o sangre periférica los cuales serán tomados por punción de la cresta iliaca o venopuncion, esta se me realizará en el área de la toma de muestras para con ellas 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 ya que este es un procedimiento invasivo. 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 Castellano

Nombre y firma del participante

Nombre del Padre o tutor

Nombre y firma de testigo

ANEXO II

Formato de recolección de datos del paciente



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



DATOS DE ENVIO DE MUESTRA

Nombre completo	Fecha de toma de muestra
	No. de registro (Hospital)
Edad	
Sexo	Tipo de muestra
Diagnóstico probable	
A) De <i>novo</i>	Hospital
B) En tratamiento, días post-diagnóstico	
En caso de B), definir estadio de tratamiento (días, semanas o meses)	
a) Inducción a la remisión	
b) Consolidación	
c) Mantenimiento	
d) Vigilancia	
Observaciones	

BH
Hb
Hto
VCM
HCM
Leuc.
Neutr.
Linf.
Basof.
Eos.
Mono.
Blastos

Médula ósea	
Morfología	%
Eritro	
Prom	
Mielo	
Metam	
Bandas	
Seg	
Eos	
Bas	
Linf	
Mono	
Plasm	
Blastos	
Megas	
Celular	
Infil	
Clasif. FAB	

Enfermedad mínima residual:

ANEXO III.

Actividades a realizar por cada uno de los participantes del proyecto:

PATRICIA ALEJANDRA CEJA SILVA: Químico farmacobiólogo. Estudiante de la maestría. Participará en la revisión de expedientes de cada paciente involucrado en el proyecto, llenado de hoja de datos, obtención de muestras biológicas, participará en la realización los análisis citológicos y moleculares, así como en el análisis de resultados, la discusión y redacción de tesis. El presente proyecto constituye su tesis para la obtención del grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

D. EN C. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS: Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor e Investigador de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y responsable de la gestión y financiamiento del protocolo de investigación. Llevará acabo la supervisión y coordinación del protocolo, así como de su redacción; supervisará y coordinará los análisis citológicos y moleculares, el análisis de los resultados, la redacción de la tesis y la publicación de los resultados. Será el responsable ante la UMSNH de que se cumplan los lineamientos de investigación y bioética.

M. EN C. ELOY PEREZ RIVERA: Médico especialista en Oncología Pediátrica. Participará en la supervisión y reclutamiento de pacientes, así como en la confirmación del diagnóstico clínico. Llevará acabo la supervisión de la redacción del proyecto de investigación, la coordinación del mismo, el análisis de los resultados y la supervisión de la redacción de tesis. Será el responsable ante el Hospital Infantil de que se cumplan los lineamientos de investigación.

ANEXO IV

Documento de consentimiento informado para procedimientos
e intervenciones quirúrgicas



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



Por el presente documento declaro haber sido informado (a) respecto de todos los alcances de o los procedimientos que se efectuarán, de acuerdo con el diagnóstico de la enfermedad que padezco.

PACIENTE: _____
DIAGNÓSTICO: _____ y que en esa
condición requiere que se efectúen alguno de los siguientes procedimientos:
1.-Procedimientos Diagnósticos: _____
2.-Procedimientos Terapéuticos: _____
3.-Procedimientos Quirúrgicos: _____
4.-Intervención Quirúrgica: _____

Asimismo, he sido informado(a) acerca de los potenciales riesgos, efectos colaterales, complicaciones y ventajas de estos procedimientos médicos, que tienen por objetivos la prevención, el tratamiento de la enfermedad o rehabilitación, como también las consecuencias de rechazar o interrumpir las indicaciones recibidas. Por lo tanto, doy mi Consentimiento Informado para que el profesional de salud realice los procedimientos e intervenciones quirúrgicas indicadas.

Acepto también la administración del Anestésico indicado en caso de ser necesario para la realización de los procedimientos y/o intervenciones quirúrgicas.

Si en el transcurso o a consecuencia de las mismas se presentan situaciones imprevistas que requieran exámenes o procedimientos diferentes o adicionales, acepto y autorizo a los profesionales para realizarlos.

Nombre, Parentesco y Firma del Tutor

Con esta fecha, yo revoco mi consentimiento prestado anteriormente, asumiendo la responsabilidad de esta decisión, y en pleno conocimiento de las consecuencias de que esto se pueda derivar.

Fecha y Firma

El profesional que suscribe, declara haber informado al paciente (o su tutor) el diagnóstico, los procedimientos necesarios, el tratamiento indicado y sus eventuales riesgos.

Nombre y Firma

ANEXO V

Documento de asentimiento informado para Niños menores de 0 a 18 años



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



TÍTULO: “DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA A PARTIR DE GENES DE FUSIÓN”.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Patricia Alejandra Ceja Silva.

TELÉFONO: 4433723457

CORREO ELECTRÓNICO: alejandrceja_silva@outlook.com

SITIO: Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”

Mi nombre es Patricia Alejandra Ceja Silva y trabajo en el laboratorio de Citopatología Celular en la División de Estudios de Posgrado de la Maestría en Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Estoy realizando una investigación para saber más acerca de tu enfermedad que se llama Leucemia Mieloide Aguda y para ello quiero pedirte que me ayudes. Si tus padres y tú están de acuerdo con que participes en esta investigación, tendrás que hacer lo siguiente:



No sé si participar te ayudará con tu enfermedad, espero que sí pero la verdad es que no se en este momento.

De todas maneras, puede que ayude a otros chicos con Leucemia Mieloide Aguda (tu enfermedad), en el futuro.

Es posible que tengas alguna molestia por participar: por ejemplo que te cause poquito dolor, que aparezca algún moretón o hinchazón. También es posible que con un piquete no sea suficiente y que necesitemos un poco más esto se realizaría al día siguiente con mucho cuidado para que no vuelva a pasar.

Prometo cuidarte mucho durante el estudio y hacer todo lo posible para que no tengas ningún problema.

Si vas a participar en la investigación, tus padres o tutor también tienen que aceptarlo.

Pero si no deseas tomar parte en la investigación no tienes por qué hacerlo, aun cuando tus padres lo hayan aceptado. Puedes discutir cualquier aspecto de este documento con tus padres o amigos o cualquier otro con el que te sientas cómodo. Puedes decidir participar o no después de haberlo discutido. No tienes que decidirlo inmediatamente.

Puede que haya algunas palabras que no entiendas o cosas que quieras que te las explique mejor porque estás interesado o preocupado por ellas. Por favor, puedes pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré tiempo para explicártelo.

Nombre, Paciente

Testigo o tutor