



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETECCIÓN DE LOS REORDENAMIENTOS MOLECULARES DE LOS GENES
AML1-ETO, BCR-ABL, PML-RARA BCR1, PML-RARA BCR3, CBFβ-MYH11A Y
CBFβ-MYH11E EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JENIFER RUTH SEGURA RAMOS

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ

AGOSTO

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Segura
Ramos
Jenifer
Ruth
55 18 05 95 87
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308595887

2. Datos del Tutor

M en C
Mónica
Sierra
Martínez

3. Datos del Sinodal 1

Dr
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del Sinodal 2

Dra
Rosario
Rodríguez
Arnaiz

5. Datos del Sinodal 3

Dra
Patricia
Ramos
Morales

6. Datos del Sinodal 4

M en C
Marco Antonio
Carballo
Ontiveros

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. EN C. MÓNICA
SIERRA MARTÍNEZ.**

AGRADECIMIENTOS

A mi papá por guiarme y apoyarme a cada paso que doy.

A Jesús Mancilla por su amor incondicional, sus consejos, su confianza y por motivarme a llegar hasta el final.

A la M.en C. Mónica Sierra por abrirme las puertas de su laboratorio, gracias por todo el apoyo durante la presente investigación y sobretodo gracias por ayudarme a reencontrar el amor a la Biología.

Al M. en C. Juan Carlos Bravata por la paciencia para enseñarme y guiarme las herramientas para realizar este proyecto.

A mis compañeros de Ing. en Biotecnología por formar parte de este paso tan importante.

A Erick Martínez por guiarme con la elaboración del proyecto y sobre todo gracias por todas las veces que me diste aliento para continuar.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi papá Eduardo Segura, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerte todo lo que luchaste y sacrificaste, sólo deseo que entiendas que el logro mío, es el logro tuyo, mi esfuerzo es inspirado en ti.

Gracias a ti, soy todo lo que soy.

Te amo

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	MARCO TEÓRICO	3
	3. Leucemia Mieloide aguda	5
	3.1. Etiología de la LMA.....	5
	3.2. Epidemiología.....	7
	3.3 Cuadro clínico.....	10
	3.4 Clasificación de la LMA.....	10
	3.5 Factores pronósticos de la LMA:	10
	3.6 Métodos de detección de la LMA	13
	3.7 Genes de fusión en la LMA y su función individual.....	27
IV.	ANTECEDENTES	38
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	42
VII.	HIPÓTESIS.....	43
VIII.	OBJETIVO GENERAL.....	43
IX.	OBJETIVOS PARTICULARES	43
X.	MATERIAL Y MÉTODOS	44
	10.1 Población de estudio.....	44
	10.2 Consulta bibliográfica para la selección de <i>primers</i>	45
	10.3 PCR <i>in silico</i>	46
	10.4 Preparación de los <i>primers</i>	47
	10.5. Extracción de RNA por el método de trizol-cloroformo.....	47
	10.6 Cuantificación.....	49
	10.7 Retrotranscripción.....	49
	10.9 Cuantificación de cDNA.....	50
	10.10 PCR de gen endógeno	50
	10.11 PCR de controles positivos	51
	10.12 PCR multiplex	51
	10.13 PCR del gen BCR-ABL	52

10.14 Electroforesis.....	52
XI. RESULTADOS	52
11.1 Recolección de muestras clínicas	52
11.2 Resultados clínicos de los pacientes con LMA	53
11.3 Resultados de la consulta bibliográfica y el PCR <i>in silico</i> de los <i>primers</i>	54
11.4 Resultados de la cuantificación de RNA y cDNA	55
11.5 Resultado de la PCR de gen endógeno.....	56
11.6 PCR de controles positivos	57
11.7 Resultado de la PCR multiplex.....	59
11.8 Resultado de la PCR del gen BCR-ABL	63
11.9 Relación de los resultados del estudio citomorfológico y citogenético.....	65
XII. DISCUSIÓN	69
XIII. CONCLUSIÓN	75
XIV. PERSPECTIVAS	76
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Factores de transcripción expresados durante cada etapa de maduración en la hematopoyesis.....	4
Fig. 2. Relación de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en el género femenino y masculino en México	8
Fig. 3. Gráfica comparativa de la incidencia y mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer en el sexo masculino.....	9
Fig. 4. Citomorfología de los subtipos de LMA en frotis sanguíneo.....	16
Fig. 5. Estudio de inmunofenotipo de un paciente con una LMA asociada a la inv(16)	18
Fig. 6. Cariotipos parciales de las alteraciones citogenéticas más comunes en la leucemia mieloide aguda	22
Fig. 7. Tipos de sondas para FISH; a) sonda centromérica, b) sonda cromosómica, c) sonda de locus específico	24
Fig. 8. Gen ABL, BCR y la fusión BCR-ABL.....	28
Fig. 9. Translocación del gen AML1-ETO y los puntos de rompimiento.	32
Fig. 10. Translocación del gen PML-RARA y los puntos de rompimiento	34
Fig. 11. Cromosoma 16 y la inv(16).....	37
Fig. 12. Herramienta bioinformática BLAST para verificar a los primers.....	47
Fig. 13. Electroforesis del gen ABL muestras 1-10.....	56
Fig. 14. Electroforesis del gen ABL muestras 11-20.....	57
Fig. 15. Electroforesis de los controles positivos.	58
Fig. 16. Electroforesis del múltiplex muestras 1-10 (PML-RARA, AML-ETO y CBFβ-MYH11).....	62
Fig. 17. Electroforesis del múltiplex para muestras 11-20 (PML-RARA, AML-ETO y CBFβ-MYH11	63
Fig. 18. Electroforesis para el gen BCR-ABL t(9;21) en las muestras 1-10.....	64
Fig. 19. Electroforesis para el gen BCR-ABL t(9;21) en las muestras 11-20.....	65

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Muestra el porcentaje de pacientes femeninos versus masculinos con diagnóstico de LMA.	53
Gráfica 2. Distribución por grupos de edad de los 20 pacientes con diagnóstico de LMA.	53
Gráfica 3. Representación de la cantidad de blastos en pacientes con diagnóstico de LMA.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores pronósticos en la LMA.	12
Tabla 2. Tipo, nombre, alteración cromosómica, gen de fusión, inmunofenotipo, incidencia de la enfermedad en la población y pronóstico de cada subtipo de LMA desde la M ₀ a la M ₇	20
Tabla 3. Alteraciones cromosómicas más frecuentes en la LMA.	22
Tabla 4. Comparación de la resolución, tiempo de realización, cantidad de material y costo de los métodos de diagnóstico para la LMA.	26
Tabla 5. Secuencias de los primers.	46
Tabla 6. Condiciones del termociclador para realizar el PCR del gen endógeno.	50
Tabla 7. Condiciones del termociclador para realizar el PCR múltiple.	51
Tabla 8. Tamaño del producto generado por PCR in sílico de los genes de fusión.	54
Tabla 9. Resultados de la cuantificación del RNA y el cDNA en las 20 muestras.	55
Tabla 10. Comparación del estudio citogenético, PCR y diagnóstico final.	67

ABREVIATURAS Y/O GLOSARIO

μL	Microlitro
ABL	receptor de la tirosin cinasa
CBF	Factor de unión al núcleo
CD	Cluster differentiation/ antígenos de superficie
CEBPα	Proteína de unión al potenciador alfa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EMR	Enfermedad mínima residual
FAB	Franco–Anglo–Estadounidense
GTP	Guanosin Tri Fosfato
HDAC	Deacetilasas de histonas
kDa	Kilodaltones
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
mL	Mililitro
M–bcr	Punto de rompimiento mayor
m–bcr	Punto de rompimiento menor
MO	Médula ósea
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PML–NBs	Cuerpos nucleares
QT	Quimioterapia
RC	Remisión completa

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
UFC-BASO	Unidad Formadora de Colonias de Basófilos
UFC-E	Unidad Formadora de Colonias Eritropoyéticas
UFC-EO	Unidad Formadora de Colonias Eosinófilas
UFC-GM	Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas
UFC-MEG	Unidad Formadora de Colonias Megacarioblásticas
UFC-L	Unidades Formadoras de Colonias Linfoides

I. RESUMEN

Introducción: La leucemia mieloide aguda (LMA) es un padecimiento oncohematológico que se clasifica en 8 subtipos (M₀ hasta M₇). La clasificación en 8 subtipos se basa en: a) aspecto de la célula en el estudio morfológico, b) el estado de maduración de la célula que se observa en el inmunofenotipo y c) las alteraciones cromosómicas que presentan en la citogenética. No obstante, debido a la mala calidad de los cromosomas o al índice mitótico bajo, estos rearrreglos cromosómicos pueden pasar desapercibidos, por lo que se desarrollaron técnicas alternativas para su detección como las moleculares. **Objetivo:** En este trabajo se buscó identificar los reordenamientos moleculares de los genes de fusión AML1-ETO, BCR-ABL, PML-RARA BCR1, PML-RARA BCR3, RARA, CBFβ-MYH11 A y CBFβ-MYH11 E en pacientes con LMA por medio de la técnica de PCR de punto final y correlacionar los resultados con el estudio citogenético clásico. **Metodología:** se realizó la extracción de RNAm en 20 muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital Juárez de México con diagnóstico de LMA; posteriormente se retrotranscribió a cDNA y se realizó un PCR múltiplex para detectar los genes de fusión en controles positivos y en las muestras. **Resultados:** se encontró el gen PML-RARA en dos pacientes femeninos y se confirmó con el estudio citogenético que el tipo de LMA que presentaban ambas pacientes era M₃ con pronóstico intermedio. **Conclusiones:** la técnica de PCR de punto final demostró ser sensible y específica para la detección de los genes específicos de los subtipos de LMA M₂, M₃ y M₄; y se corroboró la presencia del gen PML-RARA con el estudio citogenético clásico.

II. INTRODUCCIÓN

La leucemia es una neoplasia derivada del aumento incontrolable de un grupo de células sanguíneas. Se origina en la médula ósea cuando las células madre hematopoyéticas que producen las células sanguíneas mutan o sus genes de autorenovación se alteran y, por lo tanto, presentan una proliferación descontrolada, un bloqueo de diferenciación de los estadios de maduración y resistencia a la muerte celular programada (Appelbaum, 2014).

La leucemia se clasifica primero por el origen celular, ya sea en Mieloide o Linfoide. Adicionalmente, se indica el tipo de severidad: aguda cuando es muy rápida y crónica cuando es lenta. Como resultado de ambas clasificaciones, podemos tener la Leucemia Linfoide Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (NIH, 2014); ésta última es el objeto de estudio de la tesis.

La LMA se divide en ocho subtipos, que van desde la M₀ hasta la M₇. Esta clasificación la determinó la Franco-Anglo-Estadounidense por sus siglas en inglés FAB (1976) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2008 a partir de criterios de tres estudios convencionales: i) Morfológico, ii) De inmunofenotipo y iii) Citogenético. Estos criterios permiten observar la morfología, el estado de madurez y las alteraciones cromosómicas que acompañan a las mutaciones en los genes. Sin embargo, el estudio citogenético sólo permite observar anomalías con resolución de hasta 5Mpb en los cromosomas y el resultado tarda hasta un mes, por consiguiente, en el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR punto final para detectar los genes de fusión de manera específica y rápida, lo que permite otorgar al paciente un pronóstico veraz y un tratamiento individualizado.

III. MARCO TEÓRICO

La hematopoyesis es el proceso de formación de las células sanguíneas, inicia a las dos semanas de gestación, a partir de la formación de una célula pluripotencial derivada del mesodermo dentro del saco vitelino (periodo mesoblástico). Posteriormente, alrededor de la sexta semana de gestación se forman los precursores eritropoyéticos que maduran en el hígado y bazo (periodo hepático) y aumentan la cantidad de eritrocitos circulantes. Por último, alrededor del segundo trimestre, la hematopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea (periodo mieloide), donde continuará durante toda la vida del individuo manteniendo las poblaciones de las células sanguíneas (Rothstein, 1994).

La hematopoyesis es un proceso que inicia con las células madres hematopoyéticas que dan lugar a las unidades formadoras de colonias linfoides (UFC-L), que posteriormente se diferencian en linfocitos B y T, y en las unidades formadoras de colonias mieloides (UFC-GEM) (*Fig. 1*). Las UFC-GEM entonces se diferencian en granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos mediante la expresión de diversos genes que activan la señalización de diferentes respuestas celulares con diversas funciones. Por ejemplo, los genes de proliferación IKAROS (factor transcripcional de dedos de zinc tipo C2H2) y RUNX1 (factor de transcripción relacionado a runt tipo 1), los genes de diferenciación Pu.1 y FOG-1 y los genes de maduración GATA (Domínguez, *et al.*, 2015).

Durante la hematopoyesis se forman dos líneas celulares; la primera que da origen a las células troncales mieloides y la segunda a las células troncales linfoides. Por esta razón, la leucemia se clasifica inicialmente dependiendo del origen celular en mieloide o linfoide y, posteriormente, se añade el tipo de severidad: crónica cuando la enfermedad progresa más lentamente; o aguda cuando, progresa rápidamente. Con base en ello tenemos la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia mieloide crónica (LMC), la leucemia linfocítica aguda (LLA) y la leucemia linfocítica crónica (LLC). A continuación se abordará la LMA, motivo de la presente tesis.

3. Leucemia Mieloide aguda

La LMA es un grupo de leucemias que se originan cuando las células madre mielopoyéticas que dan origen a los basófilos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y monocitos adquieren rearrreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas. Esto causa fallas en la maduración de las células mieloides y un incremento de mieloblastos en la médula ósea y otros tejidos (Pavón *et al.*, 2005; Hurtado, *et al.* 2012).

3.1. Etiología de la LMA

La leucemiogénesis se ha asociado a factores genéticos, químicos, ambientales y biológicos.

3.1.1 Factores genéticos. Las personas que presentan algún tipo de alteración cromosómica que incremente el número total de cromosomas, o bien con alguna

alteración estructural tienen mayor riesgo de desarrollar leucemia. Por ejemplo, los niños con Síndrome de Down (trisomía 21) o Síndrome de Klinefelter (47, XXY) tienen más probabilidades de desarrollar LLA o LMA que el resto de la población. De hecho, la misma alteración cromosómica facilita la formación de traslocaciones, deleciones o inversiones que activan oncogenes (BCR-ABL, AML-ETO, PML-RARA) o afectan la función normal de los genes. En relación con el parentesco, la leucemia no es heredable, es decir, si alguno de los progenitores desarrolla leucemia de adulto no heredará ni aumentará el riesgo de que un hijo presente leucemia. Sin embargo, los hermanos de los niños con leucemia tienen una probabilidad cuatro veces mayor que la población normal de desarrollar leucemia (Sierra-Martínez, 2005; AMC, 2016).

3.1.2 Factores químicos. Las personas que tienen contacto prolongado con pesticidas, humo de biomasa, benceno (disolvente usado en la industria de limpieza y en la producción de algunos medicamentos, plásticos y tintes), uso de medicamentos como ciclofosfamida, clorambucilo, etopósido, tenipósido y quimioterapias (QT) para contrarrestar la LLA durante la infancia o con tabaquismo en la edad adulta, tienen mayor riesgo de padecer leucemia. En el caso de los medicamentos, se ha reportado que los pacientes desarrollan LMA en un plazo de 5 a 10 años a partir del tratamiento (Bibbo, 1997; Pichon-Riviere *et al.*, 2013; AMC, 2016).

3.1.3 Factores ambientales. Algunos factores ambientales como la exposición a radiaciones ionizantes y la exposición a campos electromagnéticos aumentan el riesgo de padecer leucemia (AMC, 2016).

3.1.4 Factores biológicos. Existen algunos agentes patógenos virales que al inyectar su material genético en las células de la médula ósea para replicarse provocan cambios en los genes de las células hematopoyéticas. Por ejemplo, el virus de Epstein–Barr estimula a los antígenos mielomonocíticos para que expresen la proteína C–MYC y como consecuencia se presenta una pobre diferenciación celular con bajos niveles de CD20. En contraste, las células normales expresan CD5+ y mantienen un adecuado sistema de transmisión de señales y como consecuencia una buena acción del Ca^{++} o el intercambio de iones Na^+/H^+ . Sin embargo, estos mecanismos son alterados por las infecciones virales generando señales anormales provenientes de muchos factores de crecimiento y de mitógenos (Hernández–Ramírez, 1999).

3.2. Epidemiología

La LMA tiene una incidencia en la población mexicana de 3200 casos nuevos por cada cien mil personas (*Fig.2*), se presenta principalmente en varones de 59–70 años, con una incidencia 10.7–16.7 mayor a comparación de niños y jóvenes. La prevalencia (definida como el número de personas que sobrevivieron en un año a esta enfermedad) es de 945 en un año y tiene una mortalidad de 2500 por cada cien mil personas, siendo la sexta causa de muerte por cáncer más frecuente en el sexo masculino y la quinta causa más frecuente en incidencia (*Fig. 4*). Se estima que la LMA no ha aumentado su incidencia a diferencia de la LLA que ha mostrado un incremento de 7.5 por millón/año en 1982 a 22.19 por millón en 1991 (Sans–Sabrafen, *et al.*, 2006; Rivera 2010; GLOBOCAN, 2012).

International Agency for Research and Development **Relación de incidencia/mortalidad por género**

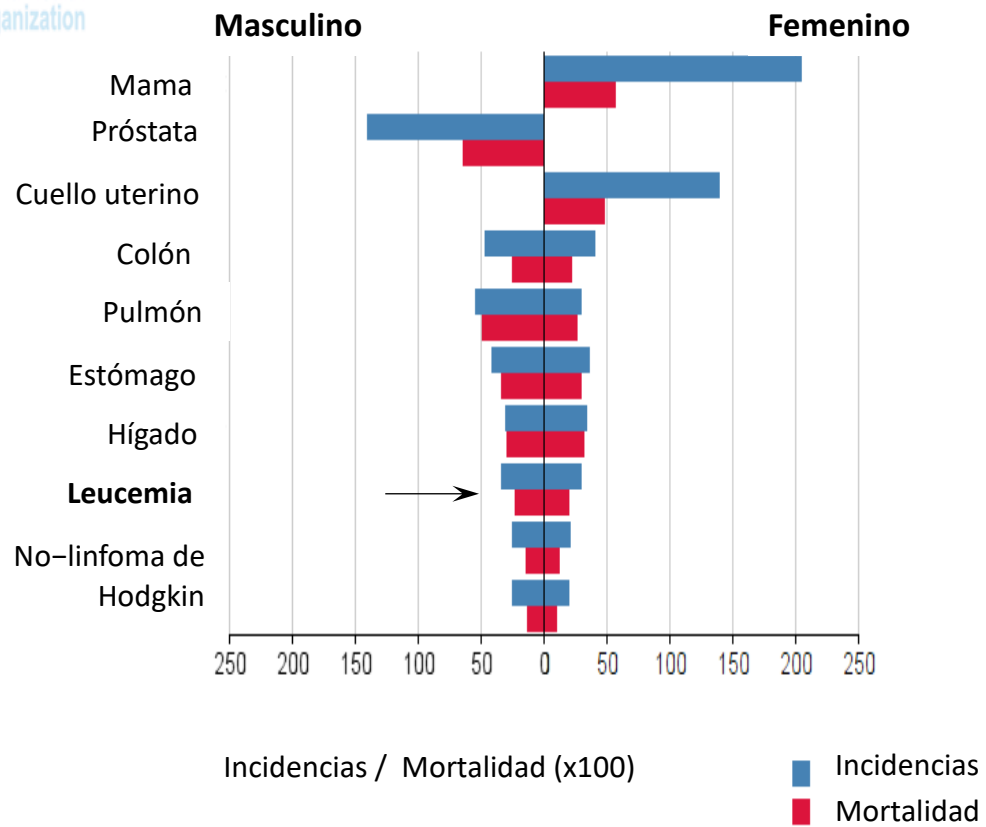


Fig.2. Relación de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en el género femenino y masculino en México (Tomado de GLOBOCAN, 2012).



Comparación de la incidencia/mortalidad en el género masculino

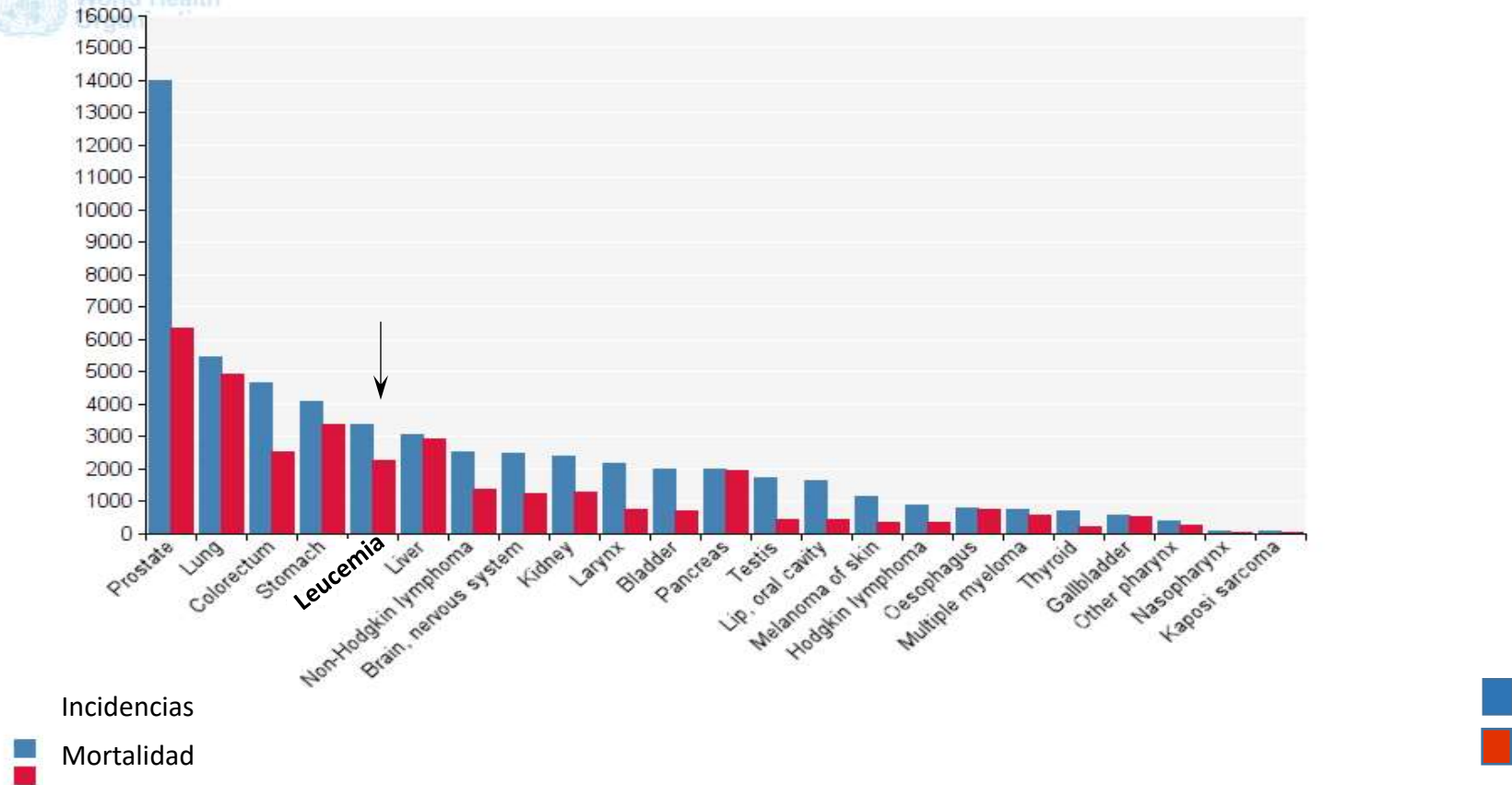


Fig. 3 Gráfica comparativa de la incidencia y mortalidad entre los diferentes tipos de cáncer por cada 100,000 habitantes del sexo masculino en México (Tomado de GLOBOCAN, 2012).

3.3 Cuadro clínico

Los pacientes con LMA presentan un cuadro clínico de: fiebre, fatiga, debilidad, anemia (provocada por la alta producción de células en médula ósea), predisposición a infecciones, hematomas y falla del funcionamiento de otros órganos; así como, pérdida de peso, apetito e inflamación del abdomen (Ruiz–Argüelles, 2009).

3.4 Clasificación de la LMA

La organización FAB y la OMS en el 2008 determinaron una clasificación de ocho subtipos de LMA que va desde la M₀ a la M₇ mediante la integración del diagnóstico clínico y los métodos de detección hematológicos, citomorfológicos, de inmunofenotipo y citogenético (Rodak, 2004; OMS, 2008; Longo, *et al.*, 2013).

3.5 Factores pronósticos de la LMA:

El propósito de identificar los factores de riesgo en la LMA permite dar al paciente un tratamiento individualizado, y variar la intensidad de los tratamientos con la finalidad de aumentar el número de pacientes con recuperación exitosa. Los factores pronóstico se dividen en dos grupos: el primer grupo se relaciona con características clínicas del paciente y el segundo con las características biológicas de la leucemia (**Tabla 1**).

Los principales factores del paciente que influyen en el tratamiento de la LMA son la edad, el conteo de células blásticas y el diagnóstico de una leucemia aguda de *novo*. La edad superior a 60–65 años es un factor de mal pronóstico. En contraste, los pacientes jóvenes tienen más probabilidades de no volver a presentar evidencia de la enfermedad (remisión completa). Además, la edad avanzada se asocia frecuentemente a cariotipos complejos y a mayor resistencia a la QT, lo que da lugar a una recuperación prolongada o muerte (Döhner *et al.*, 2010).

El segundo grupo de factores pronósticos se refiere a las alteraciones cromosómicas detectadas en el estudio citogenético. En particular se asocian a pronóstico desfavorable la presencia de las anomalías de los cromosomas 5 y 7 en pacientes previamente tratados con alquilantes, y las deleciones del brazo largo del cromosoma 11 en pacientes tratados con inhibidores de la topoisomerasa II (Sans-Sabrafen *et al.*, 2006).

Los subtipos morfológicos M₆ y M₇ de LMA se consideran de peor pronóstico probablemente por su asociación con cariotipos anormales. Sin embargo, las LMA de buen pronóstico son las asociadas a la t(8; 21) y a la inv(16) (Nguyen *et al.*, 2002).

Recientemente se determinó que el pronóstico de la LMA se asocia con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el inicio del tratamiento. Es decir, una demora en el inicio de tratamiento (de al menos 5 días) en pacientes con LMA y edad mayor a 60 años se asocia a una baja probabilidad de remisión completa (RC), es por

ello que es importante acelerar los tiempos de los estudios de diagnóstico especializado (Sekeres *et al.*, 2009).

Actualmente la citogenética es el factor biológico más importante para predecir la evolución clínica del paciente, aunque todos los estudios correspondientes son importantes para determinar si el paciente responderá favorablemente o difícilmente se recuperará. Por ejemplo, el estudio de inmunofenotipo permite dar seguimiento a los pacientes mediante la detección de la cantidad de células neoplásicas después del tratamiento; a esto se le llama detección de la enfermedad mínima residual (EMR).

Tabla 1. Factores pronósticos en la LMA.

Favorable	Desfavorable
Factores clínicos: LMA de <i>novo</i> , niños y adultos jóvenes, cifras normales de leucocitos.	Factores clínicos: LMA secundaria, adultos de edad avanzada (>60 años), leucocitosis intensa ($> 50 - 100 \times 10^9 / L$).
Clasificación FAB: LMA promielocítica, LMA con eosinofilia.	Clasificación FAB: LMA indiferenciada, LMA monocítica, LMA eritroide, LMA megacariocítica.
Citogenética: t(8;21 y inv(16)/ t(16;16), incluso con hasta 4 alteraciones adicionales. La t(15;17) tiene un pronóstico intermedio.	Citogenética: alt3q, -5, o 5q-, -7, alt11q23, t(9;22), trisomía 7, alteraciones múltiples, aneuploidías.

Moleculares: AML1-ETO, PML-RARA de carácter intermedio, CBFβ-MYH11

Respuesta al tratamiento: RC tras un ciclo largo de QT, ≤20% de blastos en Médula ósea (MO) tras un ciclo de QT, RC inmunofenotípica tras QT

Moleculares: BCR-ABL

Respuesta al tratamiento: RC con ≥ 2 ciclos de QT, >20% de blastos en MO tras un ciclo de QT, persistencia de EMR por inmunofenotipo tras la inducción y/o consolidación

(Modificado de Sans-Sabrafen *et al.*, 2006 y Grimwade *et al.*, 2010).

La LMA M₃ tiene una frecuencia del 25-30% entre mexicanos, seguida en orden decreciente de frecuencia la LMA M₁, M₂ y M₄, por lo que este trabajo se enfocará en estos rearrreglos cromosómicos y a continuación se explicará la función de los genes individuales y fusionados (Jaime-Pérez y Gómez-Almaguer, 2005).

3.6 Métodos de detección de la LMA

3.6.1 Hematológicos y citomorfológicos

Los estudios hematológicos y citomorfológicos que se realizan en una muestra de sangre periférica o de médula ósea mediante el análisis microscópico de un frotis sanguíneo con ayuda de la tinción de Wright tienen como finalidad determinar la cantidad de células, las características morfológicas, el grado de madurez, el tamaño celular, la forma nuclear, el grado de granularidad y el tipo de gránulo. El diagnóstico de la LMA se confirma cuando

se encuentran más del 20% de blastos circulantes y con base en la morfología se determina el tipo de blasto para clasificar la leucemia en uno de los siete subtipos (M_0 – M_7) (Bennet, 1976; Rodak, 2004; Merino, 2010):

- *Leucemia mieloide aguda mínimamente diferenciada (LMA– M_0)*: los blastos se presentan >90%, con una morfología grande y granulados (*Fig. 4a*). Este subtipo de leucemia tiene un pronóstico desfavorable.
- *Leucemia mieloide aguda sin maduración (LMA– M_1)*: presenta una mínima diferenciación mieloide; los mieloblastos de tipo 1 se presentan en >90% y los promielocitos y monocitos en <10% (*Fig. 4b*).
- *Leucemia mieloblástica aguda con maduración (LMA– M_2)*: presenta una maduración granulocítica mínimamente diferenciada con poco más de 90% de promielocitos y <10% de monocitos (*Fig. 4c*).
- *Leucemia promielocítica aguda (LMA– M_3)*: presenta proliferación de blastos y promieloblastos anormales con gránulos; el núcleo tiene aspecto monocitoide y perfil bilobulado en >30% y <89% (*Fig. 4d*).
- *Leucemia mielomonocítica aguda (LMA– M_4)*: se encuentran presentes blastos tipo I en >30% y del tipo II >20% pero <80%; ambos con morfología grande y con

presencia de núcleos y nucléolos con forma redonda, arriñonada o irregular (*Fig. 4e*).

- *Leucemia monocítica aguda (LMA-M₅)*: tiene >30% de los blastos circulantes en sangre; el 80% de las células monocíticas son monoblastos; el resto son promonocitos y monocitos (*Fig. 4f y 4g*) (Bennet, 1976; Rodak, 2004; Longo 2013).
- *Eritroleucemia aguda (LMA-M₆)*: se caracteriza por hiperplasia de los precursores eritroides; más del 50% son eritroides nucleados, el 30% restante son mieloblastos. La morfología es con gemación nuclear, fragmentación y formas multinucleadas gigantes (*Fig. 4h*).
- Leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M₇), se presentan >30% de megacariocitos en médula ósea y sangre periférica con núcleos de gran tamaño (*Fig. 4i*).

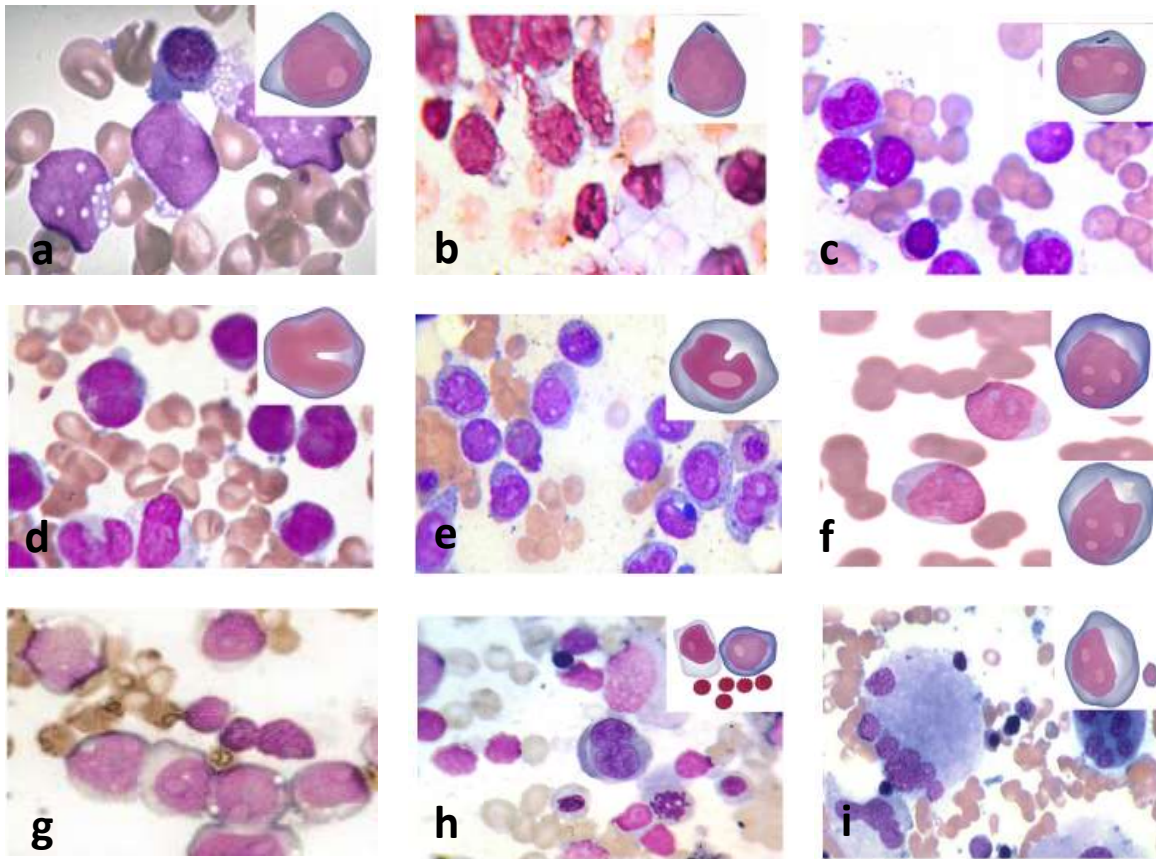


Fig. 5. Citomorfología de los subtipos de LMA en frotis sanguíneo. En color morado se muestran las células blásticas y en rosa o rojo los eritrocitos. **a:** Se muestran los blastos con gran tamaño y agranulados de la LMA-M₀, **b:** Se muestran los mieloblastos de tipo 1 de la LMA-M₁, **c:** Se muestran los mielocitos en fase de promielocito de la LMA-M₂, **d:** Se muestran los promieloblastos con gránulos y núcleo bilobulado de la LMA-M₃, **e:** Se muestran los blastos más grandes y con presencia de núcleos y nucléolos con forma redonda, arriñonada o irregular de la LMA-M₄, **f y g:** Se muestran los blastos de tipo I y II de gran tamaño y con presencia de núcleos redondos, arriñonados e irregulares de la LMA-M₅, **h:** Se muestran los mieloblastos, eritroides inmaduros y nucleados de la LMA-M₆, **i:** Se muestran los megacariocitos con núcleos irregulares y de gran tamaño, característico de la LMA-M₇ (Tomado y Modificado de Ladines-Castro *et al.*, 2016).

3.6.2 Inmunofenotipos

A diferencia del conteo celular en el que se realiza un estudio citomorfológico bajo microscopio y en el que es imposible diferenciar el estado de madurez de las células, el inmunofenotipo es un estudio más rápido y preciso que determina el número de células presentes (*Fig. 6*).

El objetivo del inmunofenotipo es conocer la línea celular implicada en el proceso de proliferación clonal (linfoide o mieloides) con diferentes fluoróforos que permitan detectar su grado de madurez mediante el reconocimiento de los antígenos de superficie (CD). La información producida se agrupa en dos tipos fundamentales: la originada por la dispersión de luz y la que se vincula con la emisión de luz por parte de los fluoróforos presentes en la superficie de las células. En el caso de la LMA, el citómetro de flujo identifica los antígenos de superficie: anti CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41 y Glicorina A; expresados por las células mieloides lo que permite establecer el tipo de LMA (**Tabla 2**) (Casanova *et al.*, 2013).

La expresión de CD13 se realiza de manera normal en células progenitoras de la línea granulopoyética y monocítica, así como en células maduras de ambas series, debido a que es una metaloproteasa de membrana que degrada péptidos reguladores. El CD14 se expresa de manera normal en monocitos y macrófagos, pero débilmente en granulocitos, su función es ser receptor de endotoxinas (Derolf *et al.*, 2008). Otro marcador de superficie es el CD15, que está asociado de manera

normal a la línea monocítica y de manera anormal a la granulocítica, su función es ser una glucoproteína de membrana que liga a las selectinas (Solary *et al.*, 1992). Por su parte, el CD11b tiene la función de ser una molécula de adhesión B2 a la integrina, es un antígeno expresado sobre todo en monocitos, macrófagos y células NK y su presencia se ha asociado con menor tasa de recuperación tras QT de inducción. Finalmente el CD33 se expresa en un 97% de los pacientes con LMA sin relación a un pronóstico. Al contrario de la presencia del CD34 asociado a falta de madurez en las células presentes (Tien *et al.*, 1995; Paietta *et al.*, 1998; Graf *et al.*, 2006).

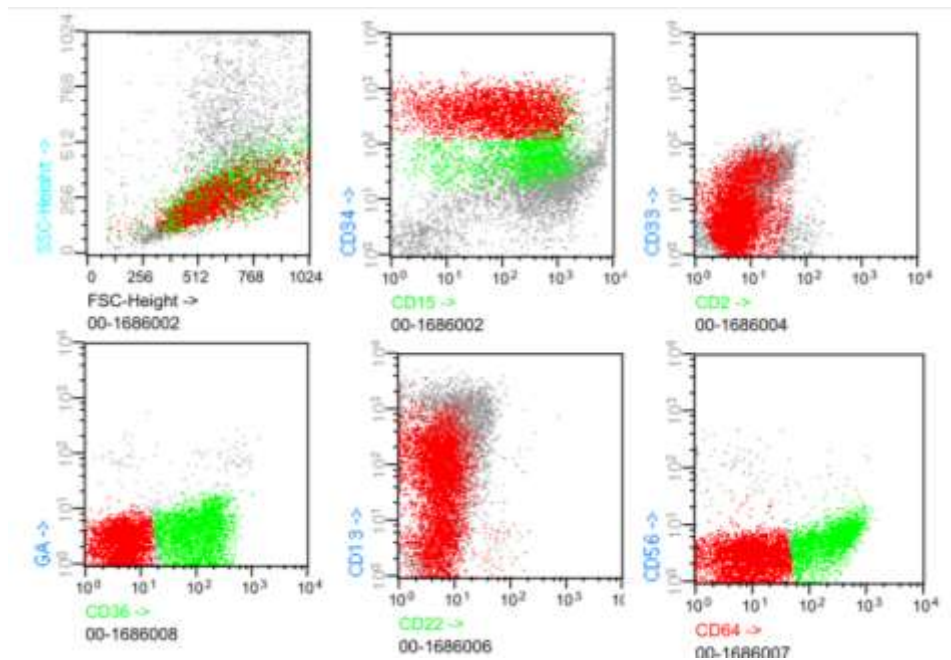


Fig. 6. Estudio de inmunofenotipo de un paciente con una LMA asociada a la inv(16). Se muestra una población leucémica heterogénea. Existe una población más inmadura (población roja) y otra más madura con diferenciación monocítica (población verde) que coexpresa el marcador de inmadurez CD34 (asincronismo madurativo). También se detecta la pérdida de expresión del marcador mielóide CD33 (Tomado de Macedo, *et al.*, 1995).

Tabla 2. Tipo, nombre, alteración cromosómica, gen de fusión, inmunofenotipo, incidencia de la enfermedad en la población y pronóstico de cada subtipo de LMA desde la M₀ a la M₇.

Tipo	Nombre	Alteración cromosómica	Gen de fusión	Inmunofenotipo	Incidencia (%)	Pronóstico
M₀	Leucemia mieloide mínimamente diferenciada	Sin especificación	Sin especificación	CD13, CD33, CD34, CD117	8%	Desfavorable
M₁	Leucemia mieloide aguda sin maduración	t(9;22)(q34;q11,2)	BCR-ABL	CD13, CD33, CD117	15%	Desfavorable
M₂	Leucemia mieloide aguda con maduración	t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO o RUNX1-RUNX1T1	CD13, CD34, CD117	25%	Favorable
M₃	Leucemia promielocítica aguda -hipergranular	t(15;17)(q22)	PML-RARA bcr1	CD13, CD33, CD117	5-10%	Intermedio
M₄	Leucemia mielocítica aguda	inv(16), t(16;16)(p13,2q22)	CBFB-MYH11	CD13, CD33, CD117	10%	Favorable
M₅	Leucemia monocítica aguda	t(9;11)(p22;q23)	MLLT3-MLL	CD11b y CD14	6%	
M₆	Eritroleucemia	translocación 11q23	RBM15-MKL1	Glicolorina A	3-6%	Desfavorable
M₇	Leucemia megacarioblástica aguda	inv(3)(q21q26) t(3;3Xq21;q26)	o RPN1-EVI1	CD41, CD61	<5%	Desfavorable

Tomada y modificada de Rodak, 2004; Sans-Sabrafen *et al.*, 2006; Perea-Durán, 2011

3.6.3 Citogenéticos

Las alteraciones cromosómicas que pueden observarse en la LMA son numéricas y estructurales, de las cuales se han identificado más de 200 traslocaciones, deleciones, inserciones, isocromosomas, trisomías o monosomías recurrentes que se reportan de acuerdo a la nomenclatura International System for human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013). Algunas alteraciones numéricas se asocian únicamente a algún subtipo de LMA (*Fig. 6*) y otras son compartidas, sin embargo la frecuencia del subtipo varía en función de la localización geográfica. Por ejemplo: la translocación(15;17) de la leucemia promielocítica aguda se encuentra con mayor frecuencia en la población latina que en la blanca, mientras que la traslocación(6;9)(q22;q22) se observa con más frecuencia en la población asiática y es menos frecuente en nuestro país (Salamanca-Gómez, 1995; Hernández *et al*, 2010).

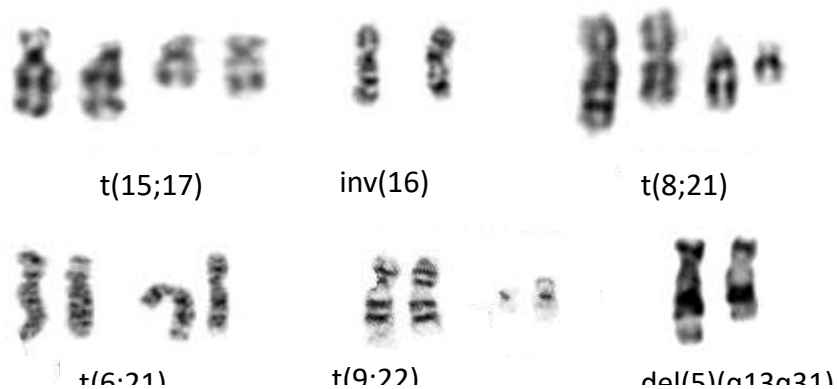


Fig. 7. Cariotipos parciales de las alteraciones citogenéticas más comunes en la leucemia mieloide aguda (Modificado de Hernández *et al*, 2010)

Las anomalías estructurales y otras numéricas se reportan en la **Tabla 3**; existen anomalías estructurales específicas para cada subtipo de LMA (Velázquez-González *et al.*, 2001).

Tabla 3. Alteraciones cromosómicas más frecuentes de analizar en la LMA.

Subtipo de LMA	Alteración citogenética	Frecuencia (%)*
M ₁	-7	17
	+8	13
	del (5q)	10
	-5	9
	t(9;22) (q34;q11)	9
M ₂	t(8;21) (q34;q22)	38
	-7	11

	+8	11
	del (5q)	9
M ₃	t(15;17)	95
M ₄	inv(16)	26
	+8	15
	-7	11
M ₅	del, t(11q)(q23)	30
	+8	26
M ₆	-7	26
	+8	14
	del (5q)	14
	-5	11
	Aberraciones complejas	
M ₇	Pocos casos estudiados	

*Las frecuencias son para la población mexicana (Tomado de Salamanca-Gómez, 1995); t=traslocación; inv= inversiones; del=deleciones; q= brazo largo; p= brazo corto.

3.6.4 Citogenética molecular

Las técnicas de citogenética molecular se basan en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí, lo que permite la detección y localización de secuencias específicas de ADN, por consiguiente, una de las técnicas de hibridación más utilizadas por no requerir cultivo celular es la Hibridación *in situ* fluorescente (FISH); un estudio que permite detectar y localizar por fluourocromía secuencias específicas de DNA o RNA sobre preparaciones cromosómicas y observar un cariotipo fluorescente de zonas específicas con mejor resolución que un cariotipo convencional (*Fig. 7*) (Castillo *et al.*, 2002; Rodríguez-Martínez y Suescún 2013).

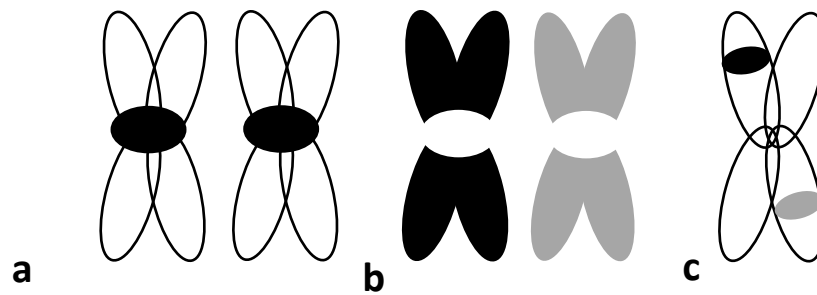


Fig. 8. Tipos de sondas para FISH; a) sonda centromérica, b) sonda cromosómica, c) sonda de *locus* específico (Modificado de CancerQuest, 2016).

En comparación con el análisis citogenético convencional, FISH permite delinear aberraciones cromosómicas específicas numéricas y estructurales en células interfásicas (citogenética interfásica) (Döhner *et al.*, 1995).

Entre las aberraciones más comunes detectadas por FISH se encuentran la monosomía 7 (-7) o trisomía 8 (+8). Estas anomalías son fácilmente detectadas por FISH con sondas centroméricas específicas de los cromosomas 7 y 8 (Döhner *et al.*, 1995).

Sin embargo, existen reordenamientos indetectables porque la hibridación puede presentar el mismo color del cromosoma comprometido, también existen numerosas desventajas prácticas como malas preparaciones citogenéticas, excesiva o insuficiente hibridación, tratamientos inadecuados que pudieran interferir con la interpretación y requerir otros estudios complementarios (Castillo *et al.*, 2002; Rodríguez-Martínez y Suescún 2013).

Dadas las limitaciones de la citogenética molecular para detectar rearrreglos pequeños, genes de fusión y mutaciones de una sola base, entre otras, el uso de las técnicas moleculares es fundamental, como se describe a continuación.

3.6.5 Biología molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy utilizada para la detección de mutaciones no detectables por otros métodos. La PCR permite amplificar selectivamente un fragmento específico de DNA y realizar muchas copias de esta hasta obtener una cantidad específica para su posterior manipulación. Se basa en el flujo de la información genética (DNA–RNA–proteína) y mediante una reacción en cadena que clona un gen específico (Solomon y Martin, 2008).

Para la realización de la PCR, se requiere de oligonucleótidos iniciadores o *primers* que son fragmentos cortos complementarios que se van a unir a los extremos *Reverse* y *Forward* de una secuencia específica de DNA, una enzima (Taq polimerasa) que realiza la síntesis de un segmento de DNA, así como nucleótidos (dNTPs), una solución amortiguadora, Mg⁺⁺ y una pequeña cantidad de DNA del paciente. Toda esa mezcla de elementos se somete a diversos cambios de temperatura temporales para facilitar que se lleve a cabo la síntesis de copias múltiples del fragmento de DNA o gen de interés. Estos cambios de temperatura se programan en el termociclador y se llevan a cabo en las siguientes etapas: desnaturalización inicial, alineamiento complementario de los *primers* con el DNA,

elongación y terminación. Se requieren de al menos 35–40 ciclos para tener la cantidad suficiente de DNA amplificado para análisis posterior (UNAM, 2008; IPN, 2009).

Tras la amplificación, se requiere la lectura del amplificado en un gel de agarosa o poliacrilamida, comparando las bandas amplificadas con marcadores conocidos de peso molecular (UNAM, 2008; IPN, 2009).

Existe otra variante de la PCR llamada multiplex donde se utilizan múltiples pares de primers al mismo tiempo y como resultado pueden observarse múltiples bandas de genes amplificados en el gel de agarosa. Se usa frecuentemente en diagnóstico médico, tiene como ventajas ahorrar tiempo y gastos. Sin embargo requiere una cuidadosa optimización en la concentración de los componentes (UNAM; 2008).

En el caso de la leucemia los ácidos nucleicos son extraídos de una muestra de sangre periférica o de médula ósea y son del paciente y son analizados para buscar las secuencias específicas de DNA de los genes de fusión sin importar que exista una limitada cantidad de leucocitos presentes. Por lo tanto, los métodos moleculares aplicados al diagnóstico de la leucemia ofrecen una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez con requerimientos mínimos de muestra en comparación con las pruebas convencionales (**Tabla 4**) (Navarro *et al.*, 2008).

Tabla 4. Comparación de la resolución, tiempo de realización, cantidad de material y costo de los métodos de diagnóstico para la LMA.

Método de detección	Resolución	Tiempo	Cantidad de material	Costo	Referencia
----------------------------	------------	--------	----------------------	-------	------------

Morfológico	Las células que se observen al microscopio	5 días	Gotas de sangre	Bajo	Lewis <i>et al.</i> , 2007
Inmunofenotipo	Alta (hasta 1×10^5)	5 días	300 μ L	Alto	Leach <i>et al.</i> , 2013
Citogenético	Resolución máxima de anomalías estructurales de 3–5Mpb	30 días	Requiere al menos 25 metafases	Bajo	Heim y Mitelman, 2015
FISH	Alta con sondas específicas	30 días	Requiere al menos 100 interfases	Alto	Heim y Mitelman, 2015
PCR	Alta (hasta 1×10^6)	-24hrs	Mínima, al menos una célula alterada para amplificar	Bajo	Sans-Sabrafen <i>et al.</i> , 2006

3.7 Genes de fusión en la LMA y su función individual

3.7.1 BCR-ABL

La translocación entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22 forma el gen de fusión **BCR-ABL** o también llamado cromosoma Philadelphia, el gen BCR presenta distintos puntos de rompimiento para unirse al gen ABL (*Fig. 8*). El gen de fusión mayor (M-bcr) se encuentra entre los exones b2 y b3 y origina una proteína de 210 kDa, el menor (m-bcr) se localiza entre el exón e1' y exón e2' y produce una proteína de 190 kDa; y el punto de rompimiento inusual micro (μ -bcr) que se ubica en el exón 19 y codifica para una proteína de 230 kDa (Rodak, 2004).

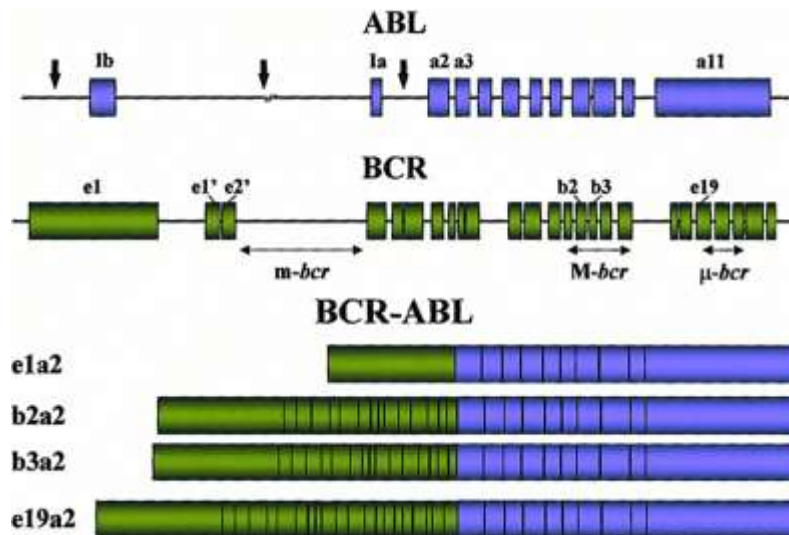


Fig. 9. Gen ABL, BCR y la fusión BCR-ABL. Muestra en la parte superior en color azul al gen ABL y sus puntos de rompimiento, en la parte media en color verde muestra al gen BCR y sus puntos de rompimiento. En la parte inferior se muestra la translocación de ambos genes y las diferentes versiones posibles por los distintos puntos de rompimiento M-bcr, m-bcr y μ -bcr. (Tomado de Sakai *et al.*, 2016).

La mayoría de los pacientes con diagnóstico de LMA expresan el gen BCR-ABL M-bcr, por el contrario de los pacientes con diagnóstico de LLA que expresan más frecuentemente el m-bcr. Finalmente, el μ -bcr se asocia LMC (Arana-Trejo *et al.*, 2002).

La función individual de cada gen se explica a continuación:

El gen **ABL** es un protooncogen que contiene 12 exones y se localiza en el cromosoma 9, su función normal es proporcionar las instrucciones para la codificación de la proteína cinasa ABL1 la cual se inactiva y activa para realizar una función normal involucrada en el crecimiento, proliferación, maduración y movimiento celular. El gen también puede agregar un grupo de fosfato a distintas proteínas para desencadenar la muerte celular

programada (apoptosis) y, por lo tanto, cuando el gen muta tiene el potencial de hacer que las células normales se vuelvan malignas (Wang, 2014).

El **gen BCR** está constituido por 25 exones, se localiza en el cromosoma 22 y proporciona los genes que codifican para una proteína cuya función no se entiende completamente. Los pocos estudios existentes han mostrado que actúa como una proteína activadora de GTPasas las cuales juegan un papel importante en la señalización química dentro de las células. Las GTPasas se activan cuando se enlazan a una molécula llamada GTP y se desactivan cuando están unidas a otra molécula llamada PIB. La proteína BCR inactiva una GTPasa conocida como Rac1 y estimula la reacción que convierte el GTP en GDP. De hecho es a través de esta actividad que la proteína BCR ayuda a regular el movimiento y función de las células (Maru, 1991; Diekmann *et al.*, 1991).

La proteína BCR también puede actuar como una cinasa; cambiando la actividad de otras proteínas al añadir un grupo de átomos de oxígeno y fósforo en posiciones específicas, lo que afecta la señalización dentro de las células, sin embargo su función no está totalmente descrita (Diekmann *et al.*, 1991).

El gen **BCR-ABL** M-bcr causa la LMA M₁ debido a que la proteína BCR-ABL1 conserva los dominios SH3-SH2-SH1 de la enzima tirosina cinasa y como resultado está siempre encendida fosforilando continuamente otras proteínas intracelulares efectoras y activadoras de vías de señalización. Por lo que el crecimiento y la división de las células sanguíneas afectadas no se controla y se sobreproducen (Goldman y Melo, 2003).

3.7.2 AML1-ETO

El gen de fusión AML1-ETO se forma cuando hay una translocación entre el cromosoma 8 y el cromosoma 21 en la región q22 de ambos cromosomas. Se presenta sólo un punto de rompimiento en el gen AML1 entre el exón 5 y 6, así como entre el exón 1b y 2 en el gen ETO (*Fig. 9*) (Kroes y Stevens-Kroef, 2016). La función particular de cada gen se explica a continuación:

El gen **AML1** o **RUNX1** es un protooncogen que se ubica en el cromosoma 21; de manera normal proporciona instrucciones para la codificación de una proteína llamada RUNX1. Esta proteína se une a regiones específicas del DNA y con ayuda de otra proteína llamada CBF β forma un complejo conocido como factor de unión al núcleo CBF, por sus siglas en inglés que se une al DNA para activar los genes que ayudan a controlar el desarrollo de las células troncales hematopoyéticas (Llimpe *et al.*, 2013).

El gen represor **ETO** o **RUNX1T1** se ubica en el cromosoma 8, su función normal es la de codificar para la proteína ETO que reprime la actividad de otro gen; esto lo realiza enlazando a las proteínas que normalmente activan genes y bloquea su actividad. También interactúa con otros represores para mantener los genes desactivados mediante la unión con la desacetilasa de las histonas y otros factores transcripcionales, por lo que, ETO se considera muy importante en la señalización para continuar la madurez de las células madre hematopoyéticas.

El gen de fusión **AML1-ETO** causa la LMA-M₂ debido a que el transcrito quimérico codifica para una proteína de fusión que tiene la capacidad de actuar como un represor de la transcripción. Por un lado contiene los dominios intactos de la proteína ETO que interactúan con el complejo nuclear correpresor con actividad enzimática que elimina los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas (histona desacetilasa, *HDAC*) y por otro lado mantiene el dominio que interactúa con los genes específicos de la hematopoyesis. Como consecuencia, ocasiona la supresión de algunos genes diana promotores de la hematopoyesis por la reducción de la movilidad intranuclear de la proteína de fusión, y un bloqueo de la diferenciación granulocítica a través de la suspensión de otro gen (*CEBPA*) involucrado en controlar la expresión de otros genes en el proceso de maduración de las células hematopoyéticas. En adición a esto la proteína formada del gen *AML1-ETO* produce una alteración en diferentes mecanismos celulares: primero afecta la disminución de la apoptosis y alarga el tiempo de vida de la célula, después aumenta la proliferación de los progenitores hematopoyéticos a través de la regulación de la expresión de la proteína del marco de lectura p 14^{ARF} (Llimpe *et al.*, 2013; Garrote *et al.*, 2014)

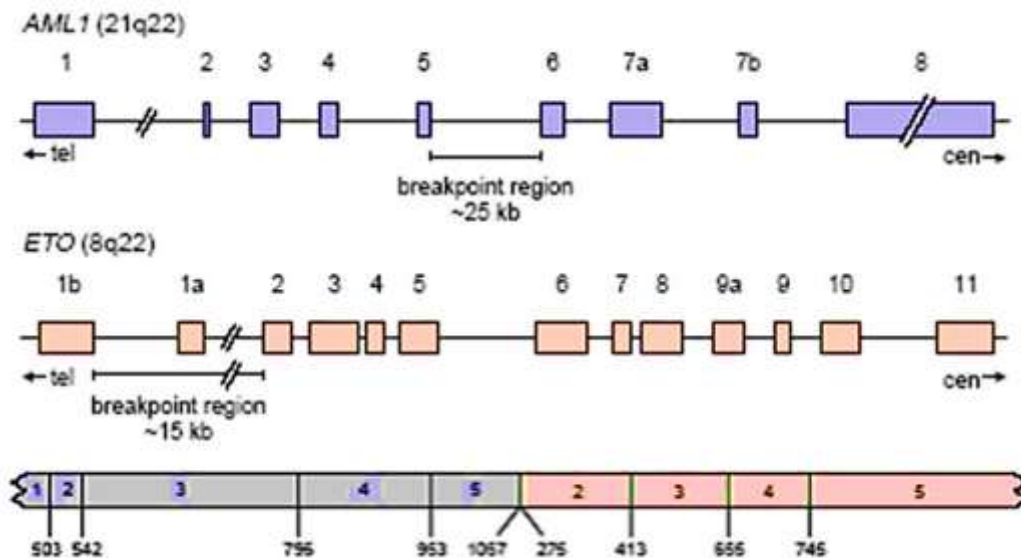


Fig. 10. Translocación del gen AML1–ETO y los puntos de rompimiento. El gen AML1 se ilustra en color morado con el punto de rompimiento entre el 5 y 6, seguido en color rosa el gen ETO con el punto de rompimiento entre el 1b y el 2 (Modificado de Kroes. y Stevens–Kroef, 2016).

3.7.3 PML–RAR α

El gen **PML–RAR α** se forma cuando el el fragmento 24.1q del cromosoma 15 se transloca a la ubicación 21.2q del cromosoma 17 (*Fig. 10*). Esta translocación puede presentar distintos puntos de rompimiento en el gen PML, el primer punto se localiza entre los exones 3 y 4 y recibe el nombre de bcr3; el segundo se localiza entre los exones 5 y 6, y se llama bcr2; mientras que el último punto de rompimiento (bcr1) ocurre entre los exones 6 y 7 (*Fig. 10*). Todos los puntos de rompimiento del gen PML–RARA se asocian directamente a la LMA M₃. La función individual del gen PML y del gen RARA se explica a continuación.

El gen supresor **PML** o gen de la leucemia promielocítica está localizado en el cromosoma 15, su función normal es la de codificar para una proteína que actúa como supresora de tumores.

La proteína PML se encuentra en el núcleo celular en unas estructuras llamadas cuerpos nucleares (PML-NBs) en forma de esferas de 0.1–1.0 μm de diámetro, que poseen un núcleo interno rodeado de una densa capa de electrones. Estos núcleos se encuentran en la mayoría de líneas celulares y tejidos cuya función es la de regular la replicación del DNA, la transcripción o el silenciamiento epigenético (Stuurman *et al.*, 1990; Lallemand-Breitenbach y H. de Thé, 2010). PML es el principal organizador de los PML-NBs y al unirse al modificador relacionado con la ubiquitina (SUMO) bloquean la proliferación e inducen la apoptosis (Bernardi y Pandolfi, 2007). Por lo tanto, cuando la PML está mutada es incapaz de bloquear la división celular descontrolada e inducir la apoptosis, produciendo LMA (Salomoni y Pandolfi, 2002).

Por su parte, el gen supresor **RAR-A** de manera normal proporciona instrucciones para un factor de transcripción llamado receptor del ácido retinoico, alfa ($\text{RAR}\alpha$). El $\text{RAR}\alpha$ es un factor transcripcional que se une a regiones específicas de DNA y atrae a otras proteínas que ayudan a bloquear la transcripción de genes para evitar la producción de proteínas. En condiciones fisiológicas $\text{RAR}\alpha$ es un receptor hormonal que en respuesta a la unión del ácido 9-*cis* retinoico recluta a proteínas represoras como HDAC permitiendo que se active la transcripción de genes involucrados en la diferenciación celular. De esta manera, el gen

RAR α ayuda a controlar la actividad de los genes involucrados en la maduración de la UFC–GM para la formación de promielocitos (Collins, 2002).

Cuando el gen PML se fusiona con el gen RAR α se forma una proteína quimérica que altera la respuesta normal de RAR α al ácido retinoico, de manera que éste no consigue liberar los correpresores que bloquean la diferenciación de las células hematopoyéticas en la fase de promielocito (Pandolfi, 2001). Por otro lado, el gen PML (esencial para inducir la apoptosis de manera normal) se ve afectado al estar translocado por lo que la proteína PML–RAR α no sólo bloquea la diferenciación mieloide sino que acelera la proliferación celular en estado inmaduro (Zelent *et al.*, 2001).

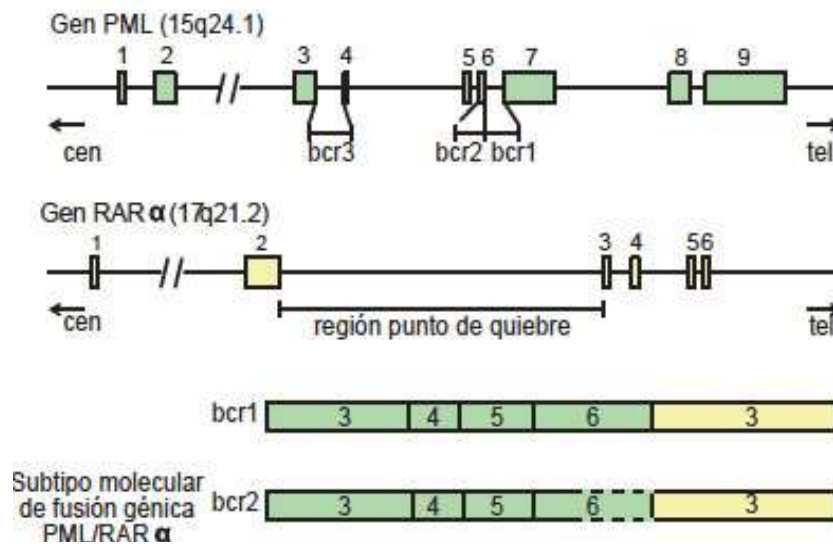


Fig. 11. Translocación del gen PML–RAR α y los puntos de rompimiento. Muestra el gen PML y los tres puntos de rompimiento bcr3, bcr2 y bcr3, en medio se muestra el gen RAR α y el punto de rompimiento. En la parte inferior muestra la representación de los subtipos moleculares bcr1, bcr2, bcr3 de la t(15;17) (Tomado de Castro–Mujica y Sullcahuaman–Allende, 2013).

3.7.4 CFBF–MYH11

Existen dos tipos de reordenamientos en el cromosoma 16, el más frecuente es la inversión del cromosoma 16. Esta inversión ocurre cuando el segmento del gen MYH11 (localizado a la altura del brazo p13) gira 180° y se coloca en el mismo cromosoma a la altura del brazo q22, lo que altera el orden original de los genes el segmento (*Fig. 11*). El reordenamiento menos común se produce cuando hay una translocación entre las dos copias del cromosoma 16 t(16; 16). En esta translocación los trozos de DNA de cada copia del cromosoma se rompen y se intercambian, sin embargo, ambos reordenamientos genéticos resultan en la fusión de dos genes encontrados en el cromosoma 16, **CBFB** y **MYH11**.

La función particular de cada gen se explica a continuación:

El gen **CBFB** codifica para formar una proteína llamada factor de unión al núcleo beta (CBF β), cuya función normal es ayudar a que el DNA se una entre sí y además forma parte del complejo factor de unión que evita el rompimiento de las proteínas RUNX1, RUNX2 y RUNX3. La función del complejo es controlar la actividad de los genes implicados en el desarrollo de las células sanguíneas, regular los genes importantes para el desarrollo de células óseas y la formación del esqueleto, así como controlar los genes implicados en el desarrollo de las células nerviosas (Yoshida *et al.*, 2002).

El gen **MYH11** codifica para una proteína denominada “cadena pesada de la miosina 11 del músculo liso”. Esta proteína forma parte de un complejo que contiene dos pares de

cadenas ligeras y dos cadenas pesadas (tal como la producida a partir del gen MYH11). Las cadenas pesadas tienen dos partes: una región de cabeza y una región de cola. La región de la cabeza interactúa con la actina y con un segmento que se une al ATP para obtener la energía necesaria para la contracción muscular. La región de cola larga de la cadena pesada de miosina interactúa con otras proteínas como la troponina C, tropomiosinas, y las regiones de cola de otras miosinas, lo que permite formar filamentos gruesos que forman las fibras musculares (Durst *et al.*, 2003).

Los genes **CFBF-MYH11** se fusionan cuando el cromosoma 16 sufre una inversión (inv(16)), a pesar de esto; la proteína CBF β aún se une a la proteína RUNX1 para formar el CBF, sin embargo, el CBF bloquea la unión al DNA y modifica su capacidad para controlar la actividad génica. Por otra parte, la porción MYH11 también interactúa con otras proteínas que impiden que el complejo controle la actividad génica de manera normal; por lo que se bloquea la señal génica de la maduración de las células sanguíneas y hay una producción anormal de glóbulos blancos inmaduros llamados explosiones mieloides (Shigesada y van de Sluis, 2004; Gomaya y Mulloy, 2011.)

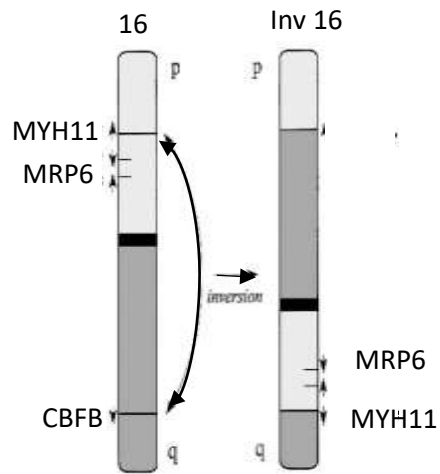


Figura 12. Cromosoma 16 y la inv(16). Muestra en la izquierda el cromosoma 16 con el genes MYH11 en la parte superior y el CBFβ en la parte inferior, al lado derecho se presenta la inversión pericéntrica de una sección del cromosoma y por lo tanto la fusión de los genes CBFβ-MYH11 (Tomado de Van der Kolk *et al.*, 2000).

IV. ANTECEDENTES

En el 2003, Salto-Téllez y colaboradores realizaron una validación de una técnica comercial de diagnóstico molecular para la detección de LMA en muestras que previamente resultaron negativas a la prueba de rutina para la t(9;22) o para la t(15;17). Este estudio ilustra la utilidad del kit de múltiplex RT-PCR para el diagnóstico molecular y la monitorización de las leucemias y refuerza las funciones complementarias de las pruebas moleculares y citogenéticas en el diagnóstico de leucemias. Esto sugiere que es fundamental la detección de genes de fusión por medio del diagnóstico molecular, como la que se plantea en el presente estudio, como un estudio complementario al cariotipo convencional o el FISH para la evaluación de los pacientes con LMA.

En el 2008, Pakakasama y colaboradores desarrollaron un método de detección rápida de los transcritos de fusión más comunes (TEL-AML1, E2A-PBX, MLL-AF4 y BCR-ABL (m-bcr)) de la LLA y de la LMA (AML-ETO, PML-RARA y CBFβ-MYH11) mediante un PCR multiplex, en 83 muestras de médula ósea de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda del Hospital de Medicina Ramathibodi y el Instituto Nacional de Salud Pediátrica de Bangkok, Tailandia. Al correlacionar el estudio citogenético con el diagnóstico molecular en los pacientes con LMA; se observaron dos casos con la traslocación t(1;19) y uno con la t(9;22) en el cariotipo, sin embargo para las muestras de LMA los resultados de citogenética correspondieron con los del PCR. Los autores concluyeron que el método simple por RT-PCR multiplex para la detección de transcritos de fusión en pacientes con leucemia aguda es un método rápido, preciso y eficaz. Aún más, los *primers* que utilizaron

en la detección de los transcritos de fusión de LMA y la metodología de PCR multiplex son la referencia para realizar nuestro estudio de detección molecular.

En el 2016, Guerra-Castillo y colaboradores evaluaron por PCR multiplex las traslocaciones y genes más relevantes en 91 médulas óseas de pacientes pediátricos mexicanos con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Estos genes-traslocaciones fueron: TEL-AML1 en la t(12;21), MLL-AF4 en la t(4;11), E2A-PBX1 en la t(1;19) y el BCR-ABL con punto de rompimiento menor en la t(9;22). Las frecuencias detectadas para cada una de las translocaciones fueron: TEL-AML1 (7.21%), E2A-PBX1 (5.15%). Las translocaciones MLL-AF4 y BCR-ABL menor no fueron detectadas en este estudio. Concluyeron los autores que las frecuencias mostradas en este estudio están en concordancia con los datos mostrados en la literatura. Además, esto muestra que es posible el uso de PCR multiplex para la detección de genes de fusión de traslocaciones en pacientes con leucemia, tal como se pretende realizar en el presente estudio.

Finalmente, en el 2016, Al Mussaed y colaboradores reportaron el caso de un paciente de 77 años con presencia de LMA y LLC. Al paciente se le realizaron los estudios de rutina iniciando con recuento celular sanguíneo donde se observaron dos poblaciones anormales de células: 60% de linfocitos maduros y 20% de células blásticas inmaduras. Posteriormente se corroboró el estado de madurez de las células con estudio de inmunofenotipo en un aspirado de médula ósea y citometría de flujo. También se realizó un estudio de citogenética convencional cuyo resultado fue de un cariotipo normal (46, XY). Después se realizó un estudio molecular mediante FISH y PCR usando un panel para

AML-ETO, PML-RAR α , CFBF-MH11 y MLL. En ambos estudios el resultado fue negativo para los rearrreglos cromosómicos en ambas leucemias, lo que usualmente pasa en 20-40% de los pacientes con LLC. Como última instancia el paciente recibió un tratamiento paliativo sin mejora y falleció a los 10 días por complicaciones metabólicas e infección, determinándose que la LMA fue consecuencia de la LLC. De manera que este caso destaca la importancia de realizar todos los estudios disponibles para el diagnóstico de leucemias, incluidos los de biología molecular para conocer el tipo de leucemia y ofrecer un tratamiento que mejore el pronóstico del paciente.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LMA es un problema de salud pública debido a que se presentan 2500 casos por cada cien mil personas. Además, es la sexta causa más frecuente de muerte por cáncer en el sexo masculino y la segunda causa de muerte por cáncer en órganos hematopoyéticos en México. El diagnóstico de la LMA se realiza por medio de cariotipo el cual en algunos casos permite observar las alteraciones cromosómicas en sangre periférica (blastos) y médula ósea, con una sensibilidad de detección de 1 célula en 10¹² células normales. Adicionalmente, puede tardar hasta un mes en obtenerse un resultado concluyente de cariotipo, el cual está sujeto a sesgos involuntarios por el técnico en el momento en que lo analiza y puede dar lugar a falsos negativos. Sin embargo, existen otras técnicas de biología molecular, como la PCR, que posibilitan la identificación de los genes de fusión involucrados en las translocaciones de los subtipos de LMA con una sensibilidad mayor a la del cariotipo (10⁶ células) (Sans-Sabrafen *et al.*, 2006). No obstante, ambos estudios se complementan para obtener un diagnóstico más preciso y rápido, lo que permite dar un mejor servicio a los pacientes.

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea: identificar los reordenamientos moleculares de los genes de fusión AML1-ETO, BCR-ABL, PML-RARA bcr1, PML-RARA bcr3, RARA, CBFβ-MYH11 A y CBFβ-MYH11 E en pacientes con LMA por PCR punto final y correlacionar con el estudio citogenético clásico.

VI. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas convencionales para el diagnóstico de la leucemia presentan una sensibilidad baja y un el tiempo de entrega que es muy prolongado, lo que no permite ofrecer al paciente un pronóstico puntual y apropiado. Por lo tanto, se requiere de técnicas moleculares de mayor sensibilidad que detecten los genes de fusión con la finalidad de determinar el tipo de leucemia con mayor prontitud y exactitud, y en consecuencia, el paciente recibirá un tratamiento a tiempo para que mejore su condición.

VII. HIPÓTESIS

Si el uso de las técnicas moleculares permite detectar los genes de fusión en conjunto con las técnicas de citogenética clásica y/o molecular, entonces se podrá complementar el pronóstico para la leucemia mieloide aguda.

VIII. OBJETIVO GENERAL

Identificar los reordenamientos moleculares de los genes de fusión AML1-ETO, BCR-ABL, PML-RARA bcr1, PML-RARA bcr3, RARA, CFBF-MYH11 A y CFBF-MYH11 E en pacientes con LMA por medio de la técnica de PCR de punto final y correlacionar con el estudio citogenético clásico.

IX. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Corroborar el tamaño de los genes de fusión a estudiar por medio de PCR *in silico*.
- 2) Verificar la técnica de detección por PCR mediante los controles positivos.
- 3) Determinar la presencia o ausencia de los genes específicos para los subtipos de LMA M₂, M₃ y M₄ por medio del producto de los rearrreglos moleculares.
- 4) Correlacionar el resultado de la PCR con el estudio citogenético clásico.

X. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 Población de estudio

Se obtuvieron 20 muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LMA, que fueron atendidos en el Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México durante el año del 2014 al 2015.

A) Criterios de estudio

Los criterios de selección fueron los siguientes:

i. Criterios de inclusión:

1. Diagnóstico de LMA
2. Sin tratamiento
3. Género indistinto
4. Aceptar participación en el estudio

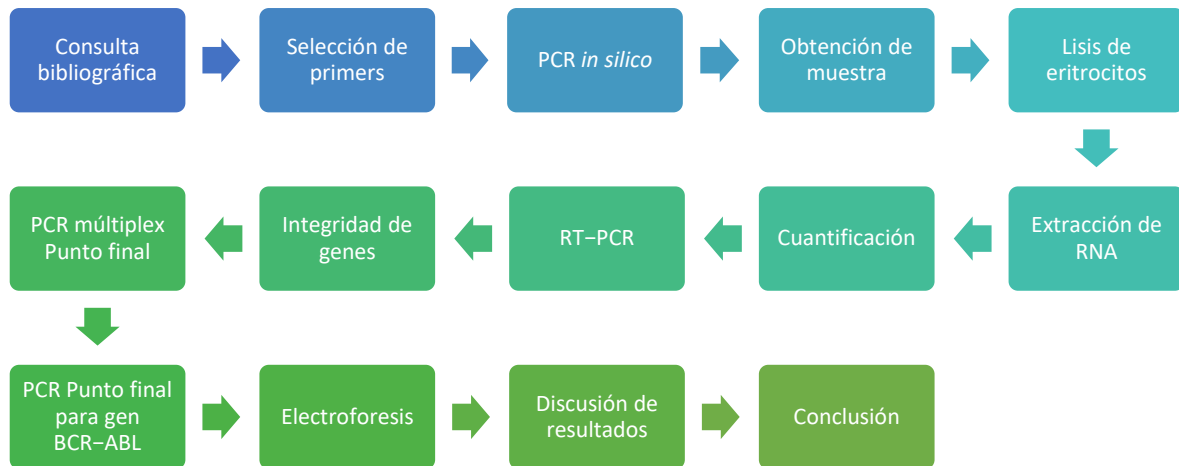
ii. Criterios de no inclusión

1. Diagnóstico distinto a la Leucemia Mieloide Aguda
2. Retiro del consentimiento

iii. Criterio de eliminación

1. Muestra insuficiente

Diagrama de flujo genérico para todos lo genes de fusión evaluados



10.2 Consulta bibliográfica para la selección de *primers*

Se realizó una consulta bibliográfica de distintos artículos donde se realizó el diagnóstico de leucemias mediante la PCR y se seleccionaron las secuencias de *primers* para el diagnóstico de LMA sugeridas por Pakakasama y colaboradores en el 2008. Posteriormente, se transcribieron en la **Tabla 5** y se utilizó la herramienta bioinformática BLAST de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que las secuencias amplifiquen tácitamente al gen específico.

Tabla 5. Secuencias de los primers.

Genes de fusión	Secuencia 5' a 3'
BCR	ACA GAA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG
ABL	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G
AML	CTA CCG CAG CCA TGA AGA ACC
ETO	AGA GGA AGG CCC ATT GCT GAA
PML	CAG TGT ACG CCT TCT CCA TCA
RARA	GCT TGT AGA TGC GGG GTA GA
CBFB	GCA GGC AAG GTA TAT TTG AAG G
MYH11	TCC TCT TCT CCT CAT TCT GCT C

(Tomado de: Pakakasama *et al.*, 2008)

10.3 PCR *in silico*

Mediante la herramienta de BLAST (*Fig. 12*) se realizó un PCR *in silico* para verificar si los *primers* amplifican para el gen quimérico específico que buscamos y determinar qué peso molecular tendrá el producto de la amplificación.

Web BLAST> nucleotide Blast> FASTA sequence para alinear la secuencia.

Fig. 13. Herramienta bioinformática BLAST para verificar a los primers (Tomado de: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

10.4 Preparación de los *primers*

Los *primers* se solicitaron al laboratorio T4 Oligo y una vez recibidos se cuantificaron a 230 y 280 nm mediante el espectrofotómetro. Después, se prepararon y se llevaron a una concentración final de 10 pmol para finalmente almacenarse a -20° , hasta su posterior uso.

10.5. Extracción de RNA por el método de trizol-cloroformo

i. Las muestras se tomaron de una punción venosa y se colocaron en un tubo de tapa morada con etilendiamino-tetra-acetato (EDTA), con el propósito de impedir la

coagulación sanguínea. Posteriormente, la sangre se homogenizó al realizar de 8 a 10 inversiones.

ii. Se trabajó en una campana de flujo laminar con la intención de evitar la contaminación de la muestra. Se enumeraron los tubos de 1.5mL con el número de muestra correspondiente y se procedió a realizar la mezcla de 500µL de la muestra de sangre y 1000µL de buffer de lisis combinándolos por inversión. Enseguida, el tubo de la mezcla se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se quitó el sobrenadante y se vortexeó el pellet. Finalmente se realizó otro ciclo de lavado con buffer de lisis y centrifugación a 13,000 rpm por 10 min con el objetivo de eliminar todos los eritrocitos.

iii. Se retiró el sobrenadante para concentrar a los glóbulos blancos, entonces se agregaron 800µL de Trizol y se resuspendió el pellet. Posteriormente se vortexeó y se adicionaron 200µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó por 10 min a 4°C. Tras este tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min.

iv. Enseguida se agregaron 300µL de isopropanol frío en un tubo de 1.5mL nuevo y al finalizar la centrifugación se observaron dos fases: la parte superior en color blanco conteniendo el RNA y en la parte inferior en color rosa el DNA y las proteínas. Así, la fase de color blanco se transfirió a un tubo de 1.5mL nuevo con isopropanol donde se mezcló por inversión y la parte inferior en color rosa se desechó.

v. La última fase para la extracción consistió en purificar la muestra de RNA. Por lo tanto, se procedió a centrifugar durante 15 min a 12,000rpm, se decantó y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 75%. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 5 min seguido de decantado y secado con gasa estéril del pellet obtenido. Finalmente, el RNA se resuspendió inmediatamente con agua MilliQ en 12–20µL y se guardó a –20°C.

10.6 Cuantificación

Se utilizó el nanofotómetro (IMPLEN) a una longitud de onda de 260/230 nm para obtener la concentración del RNA que se extrajo de las muestras de sangre periférica y poder realizar los cálculos para la conversión a cDNA.

10.7 Retrotranscripción

Mediante el kit One taq RT–PCR (New England BioLabs) se realizó la conversión de RNA a cDNA.

En un tubo para PCR se colocó de 1–6µL de RNA (previamente cuantificado) y 2µL de D (t) VN y se llevó hasta un volumen total de 8 µL con agua libre de nucleasas, la mezcla se colocó en el termociclador Nyx Technik en un ciclo durante 5 min a 70°C.

Se preparó una solución de 10 µL del buffer de reacción reverso–transcriptasa (M–MuLV Reaction Mix) y 2 µL de la enzima reverso transcriptasa (M–MuLV) para cada muestra.

Al terminar el primer ciclo, se adicionaron 12 µL de la solución reverso transcriptasa a cada muestra y se continuó con un segundo ciclo a una temperatura de 37°C durante 45 min.

10.9 Cuantificación de cDNA

Se realizó la cuantificación de las muestras con la finalidad de determinar cuál es la cantidad de cDNA presente y advertir las sustancias o sales que pudieran inhibir la PCR. Posteriormente se realizaron los cálculos de la cantidad de material genético requerido para el PCR del gen endógeno y el PCR multiplex.

10.10 PCR de gen endógeno

Se realizó un PCR del gen endógeno ABL con los siguientes *primers* y las siguientes condiciones (**Tabla 6**):

ABL-R

5' ATGGTACCAGGAGTGTTTCTCC3'

ABL-F

5'GGCCAGTAGCATCTGACTTTG3'

Tabla 6. Condiciones del termociclador para realizar el PCR del gen endógeno.

1^{er} paso	1 ciclo	95°C 5 min
2^o paso	35 ciclos	95°C 30 seg. (desnaturalización) 65°C 30 seg. (alineamiento) 72°C 1 min (extensión)
3^{er} paso	1 ciclo	72°C 5 min.
4^o paso	1ciclo	4°C ∞

10.11 PCR de controles positivos

Se utilizaron controles positivos comerciales (ELitech Molecular Diagnostics Alert PCR) para comprobar que los iniciadores amplificaran para los genes: PML-RARA de la t(15;17) abarcando los puntos de rompimiento bcr1 y bcr3, AML-ETO de la t(8;21), BCR-ABL de la t(9;22) abarcando los puntos rompimiento mayor (M-bcr) y el punto de rompimiento menor (m-bcr), y CFBF-MYH11 de la inv(16) abarcando la variante A y E. Los controles positivos son muestras de sangre periférica, médula ósea o suspensión leucocítica, están estandarizados y certificados por CE Mark y por In Vitro Diagnostic Medical Devices.

10.12 PCR multiplex

Una vez amplificados los controles positivos se utilizaron las mismas condiciones para realizar un PCR múltiplex en las 19 muestras de pacientes con diagnóstico de LMA en el termociclador con las descritas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones del termociclador para realizar el PCR múltiplex.

1^{er} paso	1 ciclo	95°C 5 min
2^o paso	35 ciclos	95°C 5 min (desnaturalización) 65°C 30 seg (alineamiento) 72°C 1 min (extensión)
3^{er} paso	1 ciclo	72°C 5 min.
4^o paso	1ciclo	4°C ∞

10.13 PCR del gen BCR-ABL

Se realizó una PCR para detectar el gen de fusión BCR-ABL de manera independiente al multiplex para evitar conferir un falso positivo; esto producto a un parecido en el tamaño del gen BCR-ABL (381pb) y el gen PML-RARA (385pb).

10.14 Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 2% y se tiñó con 4µl de bromuro de etidio para observar el producto del PCR de: el gen endógeno, los controles positivos, multiplex y el gen BCR-ABL con TAE al 1X y por último se corrió a 90 Volts en la cámara electrofética y se observó mediante fluorescencia en la cámara ultravioleta.

XI. RESULTADOS

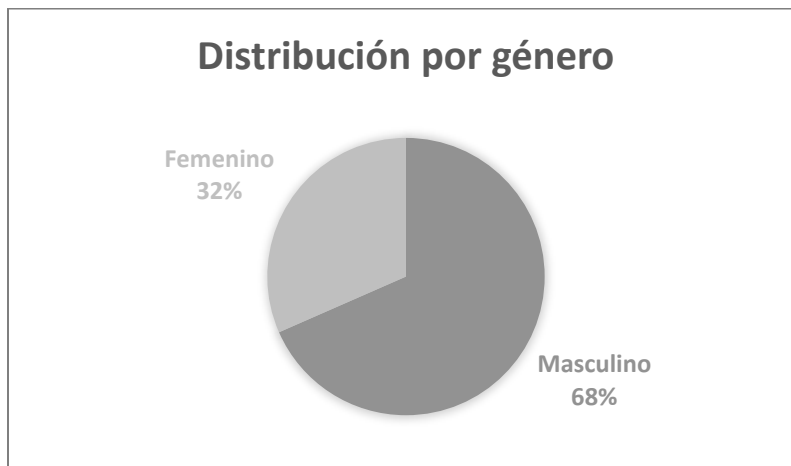
11.1 Recolección de muestras clínicas

Se recolectaron un total de 20 muestras con diagnóstico de LMA del Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México 17/20 (85%) pacientes ingresaron por diagnóstico *de novo* y 3/20 (15%) ingresaron por recaída después de haber obtenido la RC.

Sólo 19 muestras tuvieron la cantidad suficiente de material genético para realizar la extracción del RNA y, posteriormente, la PCR multiplex con el fin de realizar la detección de los genes de fusión.

11.2 Resultados clínicos de los pacientes con LMA

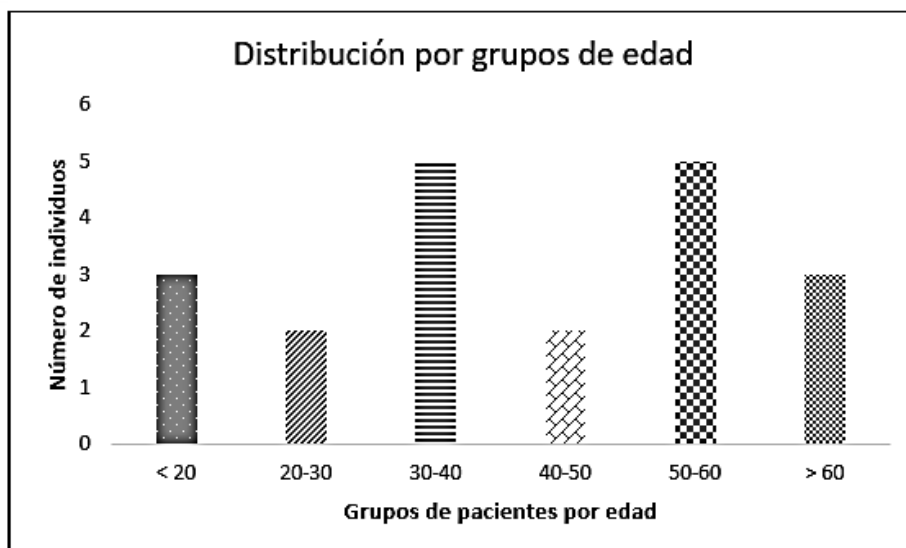
El número de pacientes del género masculino con diagnóstico de LMA fue del 68%, mientras que, los pacientes femeninos representaron el 32% (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Muestra el porcentaje de pacientes femeninos *versus* masculinos con diagnóstico de LMA.

Los pacientes con diagnóstico de LMA tuvieron un rango de 16 a 87 años, con una edad media de 40 años y una moda de 32 años.

Se utilizó la media para formar dos grupos de edad: los mayores de 40 años y los menores de 40 años; con un resultado de 10 pacientes cada uno. Posteriormente, se formaron grupos de edad cada 10 años (**Gráfica 2**; presentando el mayor número de pacientes en



los grupos de edad 30–40 años y 50–60 años.

11.3 Resultados de la consulta bibliográfica y el PCR *in silico* de los primers

Se realizó la consulta con la herramienta bioinformática BLAST, ubicada en la página <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, donde se obtuvo el tamaño del producto de la amplificación de cada gen de fusión (**Tabla 8**) y se confirmó que amplificaran los genes de fusión de interés presentes en los distintos subtipos de LMA.

Tabla 8. Tamaño del producto generado por PCR <i>in silico</i> de los genes de fusión.		
Gen de fusión	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto en pares de bases
BCR-ABL	ACA GAA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG	385
	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G	
AML1-ETO	CTA CCG CAG CCA TGA AGA ACC	395
	AGA GGA AGG CCC ATT GCT GAA	
PML-RARα	CAG TGT ACG CCT TCT CCA TCA	381
	GCT TGT AGA TGC GGG GTA GA	
CBFB-MYH11	GCA GGC AAG GTA TAT TTG AAG G	418
	TCC TCT TCT CCT CAT TCT GCT C	

11.4 Resultados de la cuantificación de RNA y cDNA

Se extrajo RNA de 19 muestras de sangre periférica, ya que una de ellas no contuvo la cantidad necesaria y se cuantificó para precisar la cantidad de material genético que se aplicó al realizar la conversión a cDNA. Una vez que se realizó la conversión a cDNA, ésta se cuantificó y ambos resultados se registraron en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación del RNA y el cDNA en las 20 muestras.

Número de muestra	Cantidad de RNA ng/ μ L	Cantidad de cDNA ng/ μ L
1	42.7	638
2	1794	553
3	806	624
4	4083	697
5	268	636
6	350	633
7	2880	432
8	1416	604
9	835	646
10	2087	653
11	1480	532
12	1317	624
13	1682	631
14	388	415
15	173	478
16	Sin muestra suficiente	

17	899	451
18	212	575
19	722	396
20	649	600

11.5 Resultado de la PCR de gen endógeno

Se realizó la amplificación del gen ABL obteniendo la presencia del gen en todas las muestras. En la *Figura. 13* se muestra la amplificación del gen en las muestras 1-10 y en

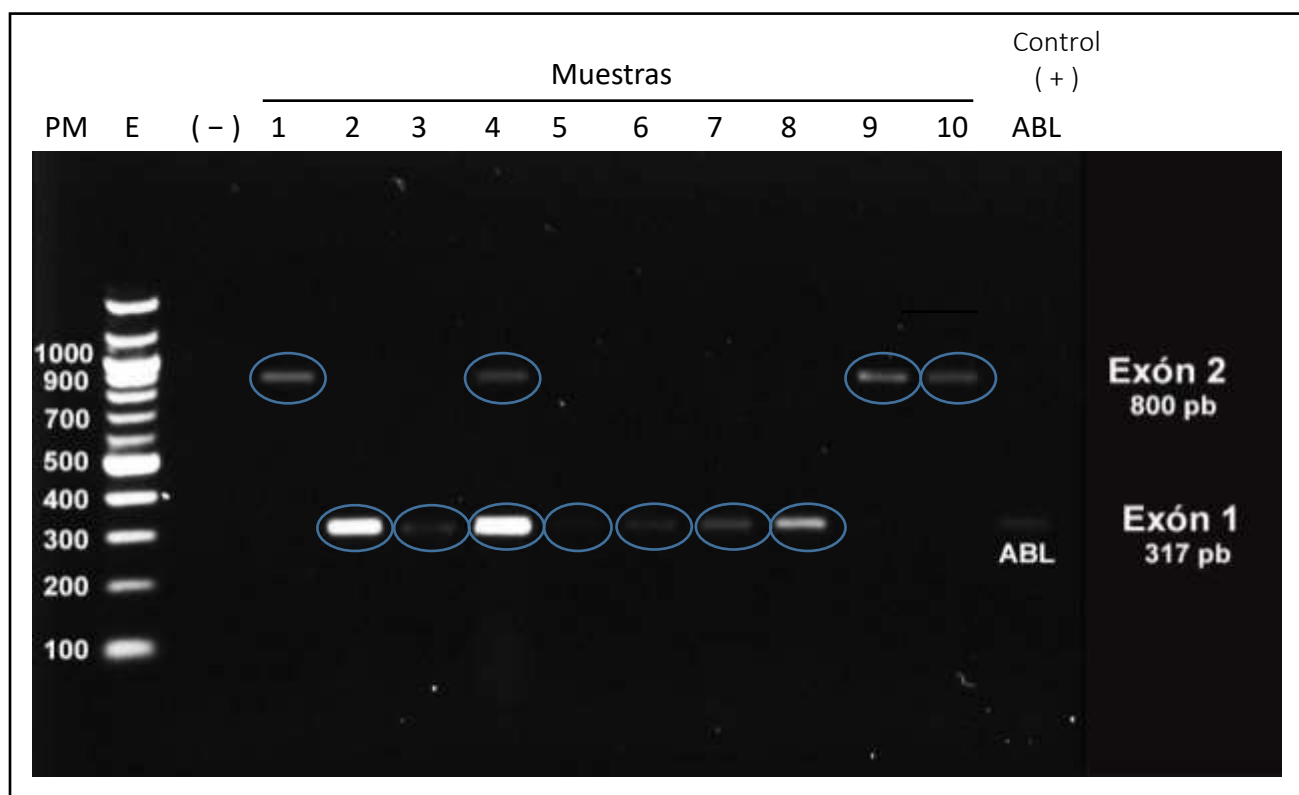


Fig. 14. Electroforesis del gen ABL muestras 1-10. Pm: peso molecular, Carril 1: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 2: control negativo; Carriles 3-12: muestras 1-10; Carril 13: control positivo del gen ABL.

la *Figura. 14* de la muestras 11–20 en el gel de agarosa al 2%.

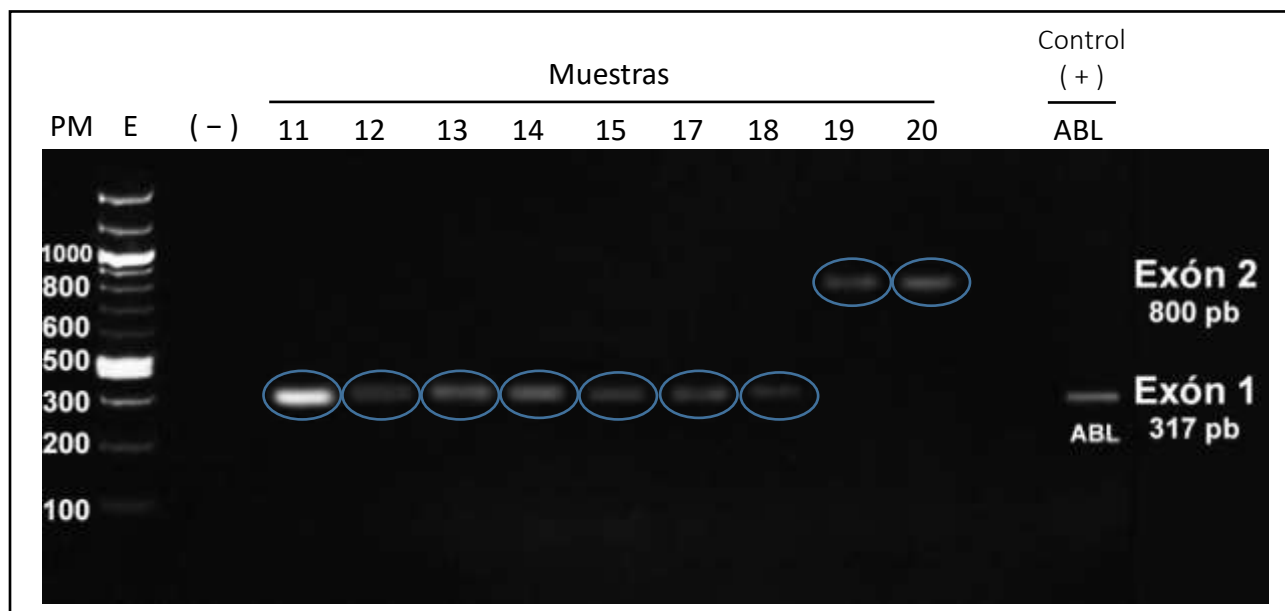


Fig. 15. Electroforesis del gen ABL muestras 11–20. Pm: peso molecular. Carril 14: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 15: control negativo; Carriles 16–24: muestras 11–20; Carril 26: control positivo gen ABL.

11.6 PCR de controles positivos

Se realizó una PCR de los controles positivos para corroborar que los *primers* amplificaron los genes de fusión de la LMA. Se observó la amplificación positiva del gen de fusión PML–RARA para el punto de rompimiento bcr1 de la t(15;17) con peso molecular de 381pb. También se observó la presencia del gen AML1–ETO de la t(8;21) con peso molecular de 395pb, así como el gen de fusión CFBF–MYH11 variante A de la inv(16) con un peso molecular de 418pb (*Fig. 15*). Por el contrario, no amplificó el control positivo de

la inv(16) gen de fusión CFBF-MYH11 variante E, ni el control positivo para PML-RARA con el punto de rompimiento bcr3.

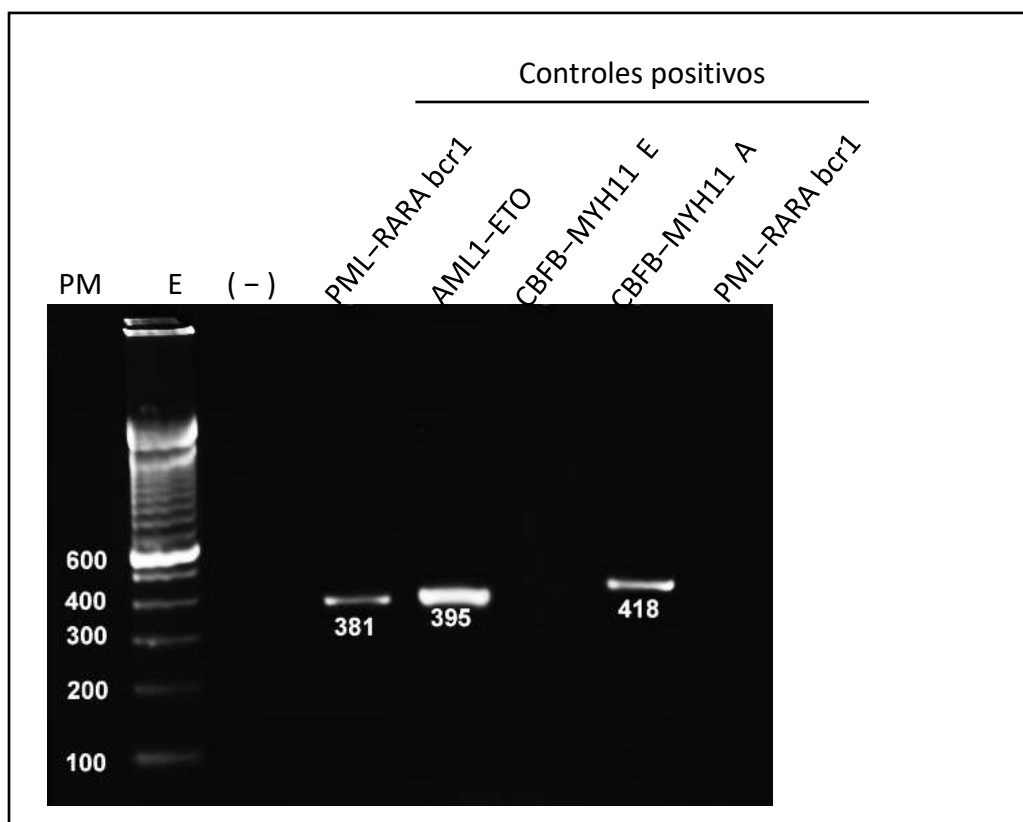


Fig. 16. Electroforesis de los controles positivos. Pm: peso molecular. Carril 1: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 2: control negativo; Carril 3: control positivo para la t(15;17) PML-RARA variante bcr1 con peso molecular de 381pb; Carril 4: control positivo para la t(8;21) AML1-ETO con peso molecular de 395pb; Carril 5: control positivo de la inv(16) gen de fusión CFBF-MYH11 variante E; Carril 6: control positivo de la inv(16) gen de fusión CFBF-MYH11 variante A con peso molecular de 418pb; Carril 7: control positivo para la t(15;17) PML-RARA variante bcr3.

11.7 Resultado de la PCR multiplex

Se realizó un PCR multiplex para detectar los genes de fusión PML-RARA, AML-ETO y CFBF-MYH11 en las (19) muestras. Se muestra la ausencia de los tres genes de

fusión en las muestras 1–10 (*Fig. 16*), 12, 13, 15–20 (*Fig. 17*). En la muestra 11 y 14 se muestra la presencia del gen PML–RARA con peso molecular de 381 (carril 20 y

23 de la Fig.17).

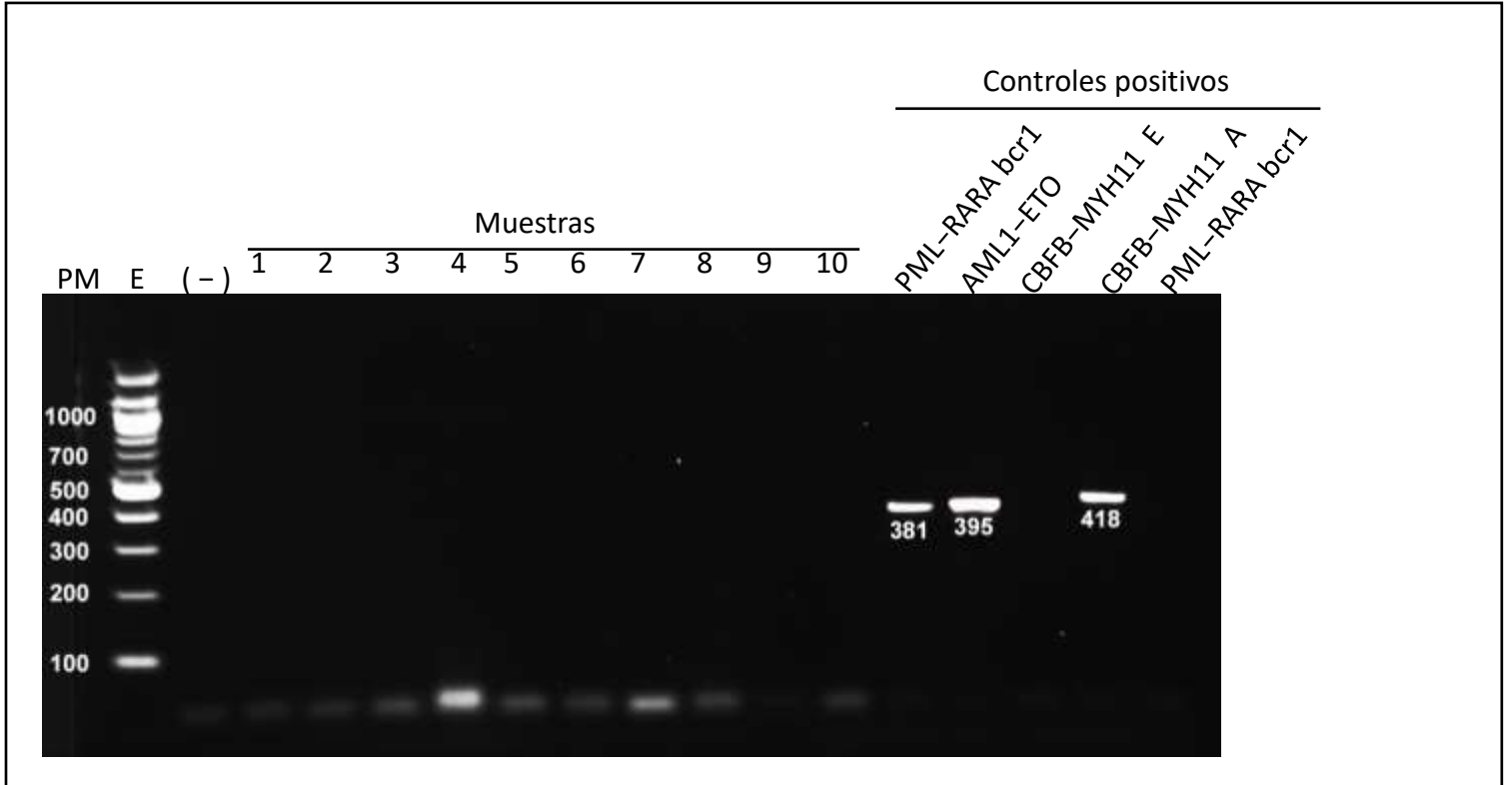


Fig. 17. Electroforesis del múltiplex muestras 1-10 (PML-RARA, AML-ETO y CBFβ-MYH11). Pm: peso molecular. Carril 1: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases de 100 pb; Carril 2: control negativo; Carril 3-12: muestras 1-10; Carril 13: control positivo para PML-RARA; Carril 14: control positivo para AML-ETO; Carril 15: control positivo para CBFβ-MYH11 variante E; Carril 16: control positivo para CBFβ-MYH11 variante A; Carril 17: control positivo control para PML-RARA variante bcr3.

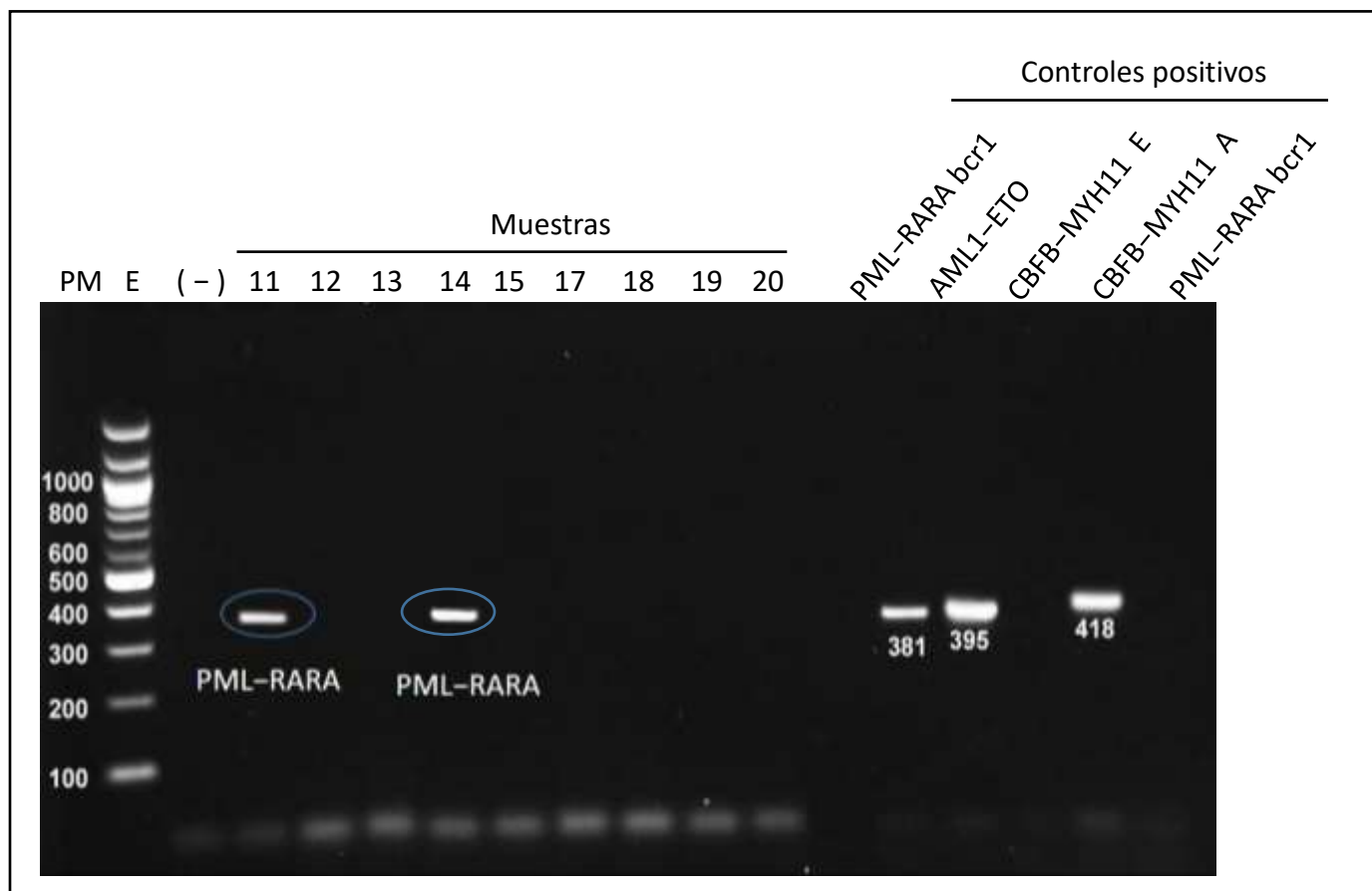


Fig. 18. Electroforesis del múltiplex para muestras 11–20 (PML–RARA, AML–ETO y CBFβ–MYH11). Pm: peso molecular; Carril 18: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 19: control negativo; Carriles 20–28: muestras 11–20; Carril 30: control positivo para PML–RARA; Carril 31: control positivo para AML–ETO; Carril 32: control positivo para CBFβ–MYH11 variante E; Carril 33: control positivo para CBFβ–MYH11 variante A; Carril 34: control positivo control positivo PML–RARA variante bcr3.

11.8 Resultado de la PCR del gen BCR–ABL

Se realizó la PCR para el gen BCR–ABL y no se observó su presencia en ninguna muestra

(Fig. 18 y Fig. 19).

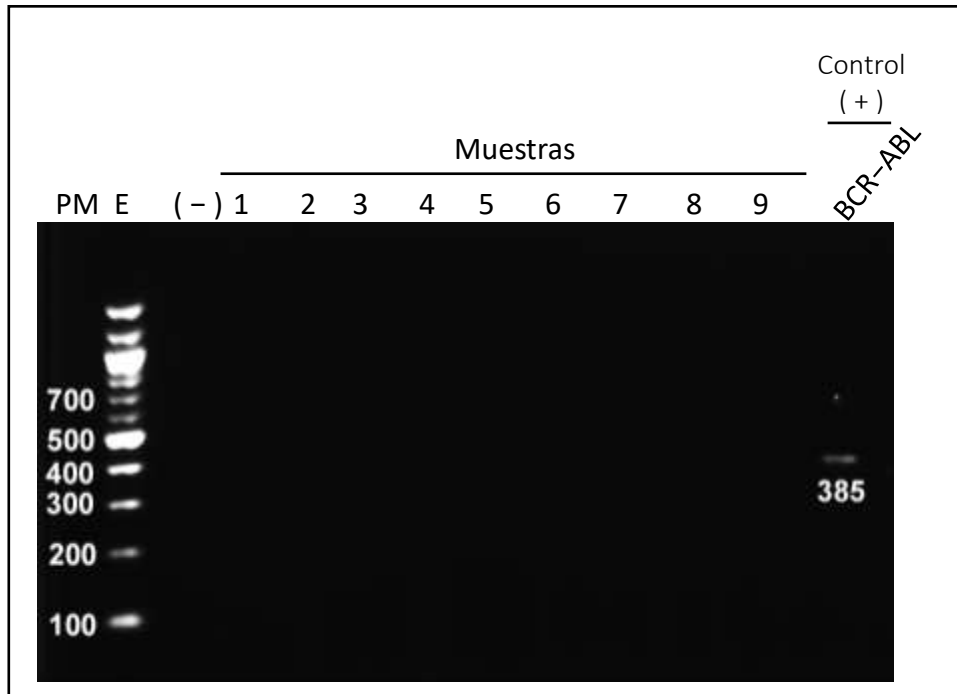


Fig. 19. Electroforesis para el gen BCR-ABL t(9;21) en las muestras 1-10. Pm: peso molecular. Carril 1: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 2: control negativo; Carriles 3-12: muestras 1-10; Carril 13: control positivo para BCR-ABL.

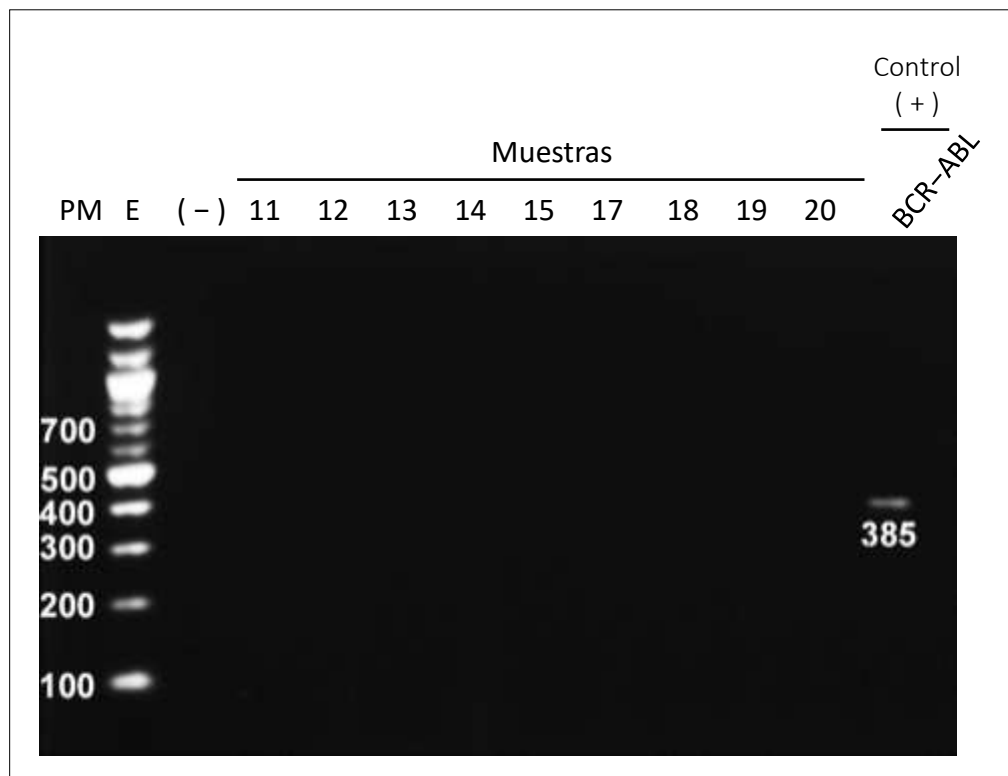
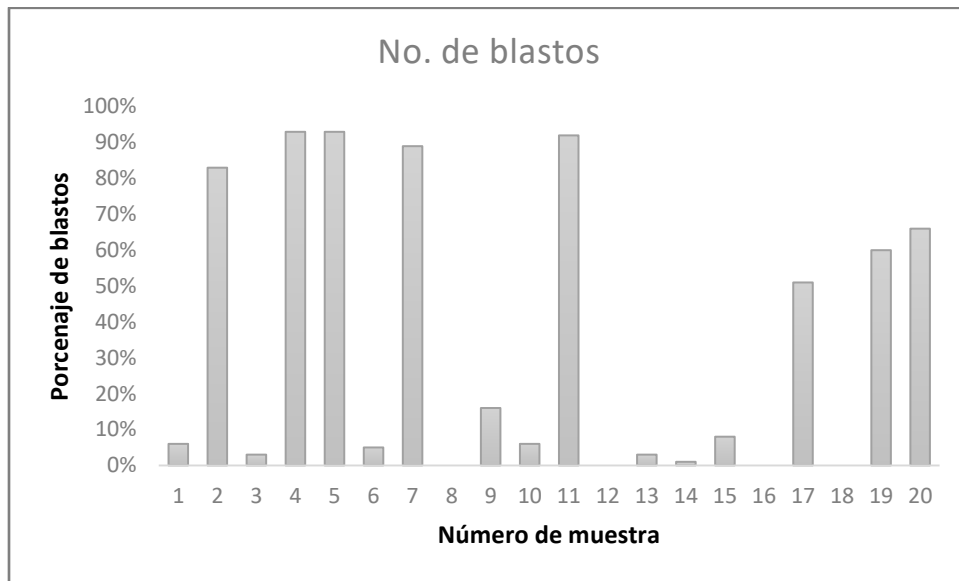


Fig. 20. Electroforesis para el gen BCR-ABL t(9;21) en las muestras 11-20. Pm: peso molecular. Carril 14: Escalera de peso molecular (E) en rangos de 100 pares de bases; Carril 15: control negativo; Carriles 16-24: muestras 11-20; Carril 25: control positivo del gen BCR-ABL.

11.9 Relación de los resultados del estudio citomorfológico y citogenético

Se correlacionó la cuenta de blastos por paciente con rangos del 1% al 93% de blastos circulantes, la paciente 11 que resultó positiva en la PCR se correlaciona con un alto conteo de blastos circulantes (92%) como se muestra en la **Gráfica 3**, en contraste con la paciente 14 que también es positiva al gen PML-RARA y tuvo un conteo bajo (1%).



Gráfica 3. Representación de la cantidad de blastos en pacientes con diagnóstico de LMA.

Se comparó el diagnóstico final con el resultado del PCR de los genes de fusión y el cariotipo (**Tabla 10**) y se corroboró el diagnóstico inicial de las pacientes 11 y 14.

Algunos de los pacientes no tuvieron una diagnóstico concluyente y se registró como Sin Diagnóstico (S/D).

Tabla 10. Comparación del estudio citogenético, PCR y diagnóstico final.

No. De muestra	Estudio citogenético	PCR	Diagnóstico final
1	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₅
2	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₃
3	S/D	Negativo	S/D
4	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₁
5	Cariotipo normal	Negativo	LMA
6	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₃
7	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₂
8	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₂
9	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₃
10	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₄
11	46,XX,t(15;17)(q24;q21)	Positivo a PML-RARA	LMA M ₃
12	Cariotipo normal	Negativo a BCR-ABL	LMA M ₂
13	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₃
14	46,XX,t(15;17)(q22;q11-q12), t(15;17)(q23;q21), t(11;17)(q13;q21), t(5;17)(8q35;q21)	Positivo a PML-RARA	LMA M ₃
15	S/D	Negativo	S/D
16	S/D	Negativo	S/D
17	Cariotipo normal	Negativo	LMA M ₄
18	Cariotipo normal	Negativo	S/D
19	Cariotipo normal	Negativo	LMA-M ₄
20	Cariotipo normal	Negativo	S/D

*(S/D): sin Diagnóstico

El diagnóstico final se obtuvo mediante la consulta del archivo donde, en algunos casos, el médico concluyó el tipo de leucemia por medio de los síntomas y los resultados del conjunto de estudios de diagnóstico.

Finalmente, al comparar el resultado de la PCR con el estudio citogenético se encontró que la muestra 11 y la muestra 14 presentan un cariotipo complejo y ambas coinciden con la presencia de la t(15;17), confirmando el diagnóstico de LMA M₃ con la presencia del gen de fusión PML-RARA mediante la PCR.

XII. DISCUSIÓN

Los aspectos más relevantes de los 20 pacientes con diagnóstico de LMA son el género y la edad; con relación al género los resultados aquí reportados coinciden con los datos epidemiológicos de GLOBOCAN (2012) donde se explica que la leucemia afecta principalmente a varones. Una posible explicación a que la leucemia y en general cualquier tipo de cáncer se presente principalmente en el hombre es la que argumenta Dunford y colaboradores (2016), quienes describen la existencia de un grupo de genes llamados EXITS cuya función es la de ser supresores de tumores. Estos genes se localizan en el cromosoma X y dado que las mujeres tienen un par de cromosomas X, aún cuando este gen mute o se pierda siempre se tendrá la otra copia por lo general sana. Por lo tanto, es posible que por esta razón las mujeres sean menos propensas a desarrollar este tipo de neoplasias que los hombres, en quienes una mutación simple puede inactivar la única copia del gen EXITS.

Otro aspecto importante con relación al género, son los resultados obtenidos mediante biología molecular en nuestro estudio en el que ambas muestras positivas para el gen de fusión PML-RARA (muestra 11 y 14) se encontraron en el género femenino. No obstante, el número de muestras NO es representativo para determinar que en la población mexicana la leucemia se detecte principalmente en mujeres o que la mutación PML-RARA sea exclusiva del género femenino.

Con relación a la longevidad, las muestras tuvieron un rango amplio de edad; entre los 16 y 87 años, para poder analizar la diferencia se realizó una clasificación por grupos de edad, tomando la media como punto de partida. Primero, se dividieron los casos en dos grupos: i) los mayores de 40 años fueron 10 pacientes y ii) los menores de 40 años fueron otros 10 pacientes. Posteriormente cada grupo se subdividió en dos subgrupos, en los cuales se observó un mayor número de pacientes en el rango de mayores de 50 años en comparación con todos los otros subgrupos. En segundo lugar se observó el subgrupo de los menores de 30 años y, finalmente, con una misma proporción se observaron el grupo de los mayores de 70 años y el grupo de los menores de 20 años. Como conclusión de los resultados de los rangos de edad, podemos determinar que a diferencia de los resultados de GLOBOCAN (2012) las muestras tienen mayor presencia en el grupo de los 40–50 años, seguida de los mayores de 50 años. Sin embargo, como se mencionó antes, la cantidad de muestras para el presente de estudio no es suficiente para sugerir un comportamiento distinto con relación a la edad de la población mexicana.

Los hallazgos más importantes son los resultados obtenidos en las pruebas moleculares. Inicialmente, la extracción del RNA resultó exitosa en todas las muestras con excepción de la número 16, la cual no tuvo suficiente material genético y, por lo tanto, se descartó su evaluación. La razón del nulo contenido genético podría atribuirse al momento en que se realizó la lisis de los eritrocitos, o a algún otro tipo de error durante el procesamiento de las muestras como la pérdida involuntaria de leucocitos, ya que el paciente 16 tenía cifras elevadas de leucocitos.

Con relación a la PCR del gen endógeno, se decidió utilizar el gen ABL 1 (proto-onco gen llamado no-receptor de la tirosin cinasa o Abelson Murine Leukaem) para comprobar la correcta extracción de RNA, debido a que está involucrado en distintos procesos de crecimiento, maduración y movimiento celular (Wang, 2014). El tamaño de este gen es de 173,795 pares de bases, se encuentra en todas las personas y se expresa durante toda la vida (Gene Cards, 2016). Por ello, se eligió para comprobar la integridad del DNA; en nuestros resultados este gen se expresó en dos pesos moleculares: 317 pb en las muestras 2,4,5,6,7,8,12,13,14,15,17 y 18; y de 800pb en las muestras 1,9,10,19 y 20. Sin embargo, sólo el paciente 3 presentó la amplificación del gen en ambos pesos moleculares (*Fig. 13*). La explicación a lo anterior es que, como lo plantea Goldman (2003): “el gen ABL tiene dos exones y nuestros *primers* pueden amplificar en ambas secciones, en consecuencia, se podría observar la presencia del gen en dos pesos moleculares distintos”.

Por otro lado, Paladino y colaboradores (2015) explican que cuando se encuentran dos amplificadas del gen ABL al mismo tiempo, como es el caso del paciente 3, hay un posible mecanismo leucemogénico porque se ocasiona una duplicación en uno de los exones y cambia la conformación alostérica de la proteína, lo cual altera la capacidad de los dominios regulatorios SH3-SH2 e impide que se autoinhiba la cinasa. En consecuencia, se tiene una cinasa constitutivamente activa y una proteína *ABL* de mayor tamaño que incluye la duplicación de los aminoácidos del exón 2. Sin embargo, este comportamiento fue encontrado en un paciente con recaída a diferencia de nuestro caso que es de un diagnóstico *de novo* con cariotipo normal y PCR negativo para los genes de fusión

BCR-ABL, PML-RARA, AML1-ETO y CFBF-MYH11. No obstante, es fundamental un monitoreo muy puntual del paciente 3, que en caso de recaer podría corroborarse el mismo comportamiento como en el caso del paciente reportado por Paladino y colaboradores (2015), y podría así emplearse como un marcador predictivo.

En el PCR multiplex se detectaron dos muestras positivas para t(15;17)/PML-RARA. Al correlacionar el resultado con el diagnóstico final se confirmó que el subtipo de LMA que presentan ambas pacientes es el M₃. Esta translocación, es la segunda más frecuente en la población mexicana ya que se detecta en el 95% de los pacientes que presentan LMA-M₃ (Salamanca-Gómez, 1995; Sierra-Martínez, 2005).

En el PCR que se realizó para detectar la t(9;22)/BCR-ABL, ninguna muestra resultó positiva, lo que puede deberse a que la translocación no estaba presente o que el gen de fusión BCR/ABL tiene un punto de rompimiento distinto al M-bcr, dado que los *primers* sólo amplifican para éste, sesgándose así el resultado de la muestra por no amplificar otros puntos de rompimiento. Al comparar la frecuencia de este gen de fusión entre poblaciones, en México y Guatemala ambos puntos de rompimiento son frecuentes con un 40% - 60%. Por otro lado, en la población de Ecuador la frecuencia del punto de rompimiento mayor es del 5% y del 95% para el punto de rompimiento menor (Morales *et al.* 2012). Por lo tanto, consideramos que sería importante implementar un PCR multiplex que abarque más puntos de rompimiento para gen el BCR-ABL, ya que, al ser un gen de mal pronóstico, se disminuiría el riesgo de un falso negativo.

Al intentar realizar la correlación de los resultados obtenidos con otros métodos diagnósticos, nos encontramos con que de algunos pacientes faltaba información en el expediente o que no se les habían realizado estudios complementarios. Sin embargo, para las muestras positivas a la t(15;17) se encontró que una de las pacientes tenía el 96% de blastos circulantes y la otra el 1%. Esta notable diferencia puede deberse a que la paciente con el 1% de blastos, ya se había diagnosticado con LMA y había asistido a revisión por Petequias en los pies cuando se le realizaron las pruebas, por lo que, posiblemente había recibido tratamiento previamente. En cambio, la otra paciente llegó al Servicio de Urgencias en Hematología y no tenía diagnóstico previo de LMA. No obstante, el pronóstico de ambas pacientes es intermedio con altas probabilidades de reaccionar adecuadamente al tratamiento por la edad en la que se presentó la LMA de acuerdo a la **Tabla 1**.

Es importante mencionar que al inicio del estudio el 40% de nuestros pacientes no tenía un diagnóstico inicial del subtipo de leucemia; el 25% de los pacientes tenía LMA-M₃, el 15% tenía LMA-M₄, el 10% tenía subtipo M₂, el 5% tenía LMA-M₅ y otro 5% tenía LMA-M₁. Por lo tanto, la identificación de los genes de fusión de interés permitió clasificar a dos pacientes (10%) con t(15;17) positiva y confirmar así el diagnóstico de LMA-M₃. Mientras, las muestras que resultaron negativas en la PCR multiplex no están descartadas de patología hematológica y fueron tratadas con un tratamiento distinto a la QT.

Debido a que el diagnóstico final que se presenta en la **Tabla 10** es de importancia para iniciar un tratamiento que mejore la calidad de vida del paciente, el médico hematólogo decide con base a todos los síntomas y al conjunto de estudios realizados qué el subtipo de Leucemia se presenta en cada caso. En el presente estudio se encontró que el 75% de los pacientes no presentaron rearrreglos cromosómicos detectables por el cariotipo y por biología molecular pero si tienen un diagnóstico final de LMA debido a que el médico lo determinó principalmente por el conteo de blastos o inmunofenotipo.

Estadísticamente se ha demostrado que el 99.5 % de los pacientes con LMA tienen mutaciones en el DNA que causan en primera instancia el cáncer sanguíneo. Por lo tanto, para detectar las mutaciones es necesario realizar una secuenciación completa del genoma del paciente (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Por otra parte, existen otras hipótesis donde la leucemia es causada por los rearrreglos cromosómicos pero son indetectables debido a que la célula dañada ha tenido mecanismos de reparación en el momento de realizar el diagnóstico.

XIII. CONCLUSIÓN

- Se confirmó mediante la herramienta bioinformática BLAST el tamaño de los genes de fusión reportados y de uso para el presente trabajo.
- Se validó la PCR multiplex mediante los controles positivos.
- La técnica de PCR multiplex resultó efectiva para determinar la presencia o ausencia de los genes de fusión específicos para los subtipos de LMA M₂, M₃ y M₄.
- Existe correlación del PCR múltiplex para el gen de fusión PML-RARA con el estudio citogenético clásico.

XIV. PERSPECTIVAS

La técnica de PCR multiplex implementada en el presente estudio permitió clasificar el subtipo de LMA de algunos pacientes sin diagnóstico inicial del subtipo específico, por lo que se recomienda su implementación como un estudio de rutina complementario a la citogenética convencional. Además, el PCR multiplex presenta ventajas en el tiempo de entrega y es una prueba con mayor sensibilidad, lo que confiere beneficios al paciente porque puede recibir un tratamiento individualizado y expedito para cada subtipo de LMA.

También, se considera importante revisar el comportamiento de las proteínas del gen ABL para determinar la razón exacta de la amplificación de ambos exones al mismo tiempo y corroborar si este hallazgo puede ser un marcador pronóstico de recaída.

Finalmente, se propone implementar la PCR multiplex a los puntos de rompimiento M-bcr, m-bcr y μ -bcr para el gen BCR-ABL para disminuir o descartar falsos negativos. Esto permitiría otorgar un diagnóstico y pronóstico certero.

XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al Mussaed, E., Osman, H., y G. Elyamany. 2016. Simultaneous existence of acute myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia: a case report. *BMC Cancer*. 16, 739. <http://doi.org/10.1186/s12885-016-2780-5>
- AMC (American Cancer Society). 2016. Cancer Facts and Figures. Atlanta, Ga: *American Cancer Society*; 2016.
- Arana-Trejo, R.M., Ruíz-Sánchez, E., Ignacio-Ibarra G., Báez de la Fuente, E., Garces, O., Gómez-Morales, E., Castro-Granados, M., Ovilla-Martínez, R., Rubio-Borja, M. E., Solís-Anaya, L., Herrera, P., Delgado-Llamas, J. y S. Kofman. 2002. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *International Journal of Laboratory Haematology*. 24(3):145-50.
- Appelbaum, F. R., 2014. Acute leukemia in adults. En: Niederhuber, .JE., Armitage, J.O., Doroshow, J.H., Kastan, M.B., Tepper, J.E., eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2014: chap 98.
- Bennet, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, R., Sultan, C. 1976. Proposals for the Classification of the acute leukemias. Fench-American-British (FAB). *British Journal of Haematology* 33:451-458.
- Bernardi, R. y P.P. Pandolfi. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*. 8:1006-1016
- Bibbo, M. 1997. *Comprehensive Cytopathology*. 2nd edition. Sauders Company. USA. 1122pp
- Casanovas, R.O., Slimane, F.K., Garand, R., Faure, G.C., Campos, L., Deneys, V. 2003. Immunological classification of acute myeloblastic leukemias: relevance to patient outcome. *Leukemia* 2003;17:515-27.
- Castillo, T. S., Fuentes, S. A., Paulos, M., y A. Pardo. 2002. Múltiple FISH y múltiple BAND: técnicas de citogenética molecular en cinco casos. *Revista médica de Chile*, 130(5),

511–518.

- Castro–Mujica, M. del C. y Sulcahuaman–Allende, Y. 2013. Subtipos moleculares de PML/RAR α en pacientes con leucemia promielocítica aguda. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 30(1) 37–40.
- CancerQuest. 2016. Hibridación Fluorescente in Situ (HFIS o FISH). Winship cancer Institute. <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/deteccion-y-diagnos/s/hibridacion-fluorescentesitu>. Consultado el 04/25/2017
- Collins, S. J. 2002. The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis. *Leukemia*. 16(10):1896–905.
- Derolf, A.R., Björklund, E., Mazur, J., Björkholm, M., Porwit, A. 2008. Expression patterns of CD33 and CD15 predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma*. 49: 1279–1291
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. y A. Hall. 1991. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*. 30; 351(6325):400–2.
- Domínguez, P. M., Romero–Ramírez, H. y J. C., Rodríguez. 2015. Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. *Revista de Medicina de la Universidad Veracruzana*. 31–37p.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Fischer, K., Schröder, M., Bentz, M., Lichter, P. 1995. Diagnosis and monitoring of chromosome aberrations in hematological malignancies by fluorescence in situ hybridization. *Stem Cells*. 13 Suppl 3; 76–82.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo–Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults. *Blood*. 115: 453–474.
- Dundford, A., Weinstock, D., Savova, V., Schumacher, S., Cleary, J., Yoda, A., Sullivan, T., Hess, J. Gimelbrant, A., Beroukhim, R., Lawrence, M., Getz, G. y A. Lane. 2016.

- Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nature Genetics*.
- Durst, K.L., Lutterbach, B., Kummalu, T., Friedman, A.D. y S.W. Hiebert. 2003. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol*. 23(2):607-19
- FAB (French-American-British) Cooperative Group. 1976. Proposals for the classification of acute leukaemias. *British Journal of Haematology*, 33: 491-498
- Garrote S., H., Amor V., A., Díaz A., C., Suárez G., Y., y M. Gómez. 2014. Gen de fusión AML1-ETO: particularidades en la leucemia mieloide aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(2), 98-107
- Goyama S. y J.C., Mulloy. 2011. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects. *International Journal Hematology*. 94(2):126-33.
- Gene Cards. Human Gene Database. 2016. Weizmann Institute of Science. www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABL1. Consultado el 26 de diciembre 2016.
- GLOBOCAN. 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
- Graf, M., Reif, S., Kröll, T., Hecht, K., Nuessler, V., Schmetzer, H. 2006. Expression of MAC-1 (CD11b) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with an unfavorable prognosis. *American Journal of Hematology*: 81: 227-235.
- Goldman, J.M., Melo, J.V. 2003. Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*. (15):1451-64
- Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J. y A.K. Burnett. 2010. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*;

116:354–365.

- Guerra–Castillo, F. X., Ramos–Cervantes, M. T., Rosel–Pech, C., Jiménez–Hernández, E. y V. C. Bekker–Méndez. 2016. Detección de las traslocaciones relevantes por PCR en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista de Medicina del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 3:S302–8
- Heim, S., Mitelman F. 2015. Cancer cytogenetics; chromosomal and molecular genetics aberrations of tumor cells. 4ª edición. John Wiley & Sons.
- Hernández, J. M., Granada, I. y F. Solé., en representación del Grupo Cooperativo Español de Citogenética Hematológica. 2010. De la citogenética convencional al análisis por micromatrices. Cincuenta años del cromosoma Filadelfia. *Medicina Clínica*. 137(5):221–229
- Hernández–Ramírez, P. 1999. Leucemia linfocítica crónica: Aspectos clínicos y biológicos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 15(1), 7–20.
- Hurtado, R., Solano B., y P. Vargas. 2012. Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 55(2): 11–25.
- IPN (Instituto Politécnico Nacional). 2009. Manual de Laboratorio de biotecnología Molecular. Unidad profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. 52pp.
- ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature). 2013. Eds: Shaffer, L., McGowan–Jordan y M. Schmid. Basel: Karger. 140pp
- Jaime–Pérez, J. C., Gómez–Almaguer, D. 2005. Hematología: La sangre y sus enfermedades. 2ª edición. McGraw Hill. México. 330pp
- Kroes, W. y M. Stevens–Kroef. 2006. t(8;21)(q22;q22) RUNX1/RUNX1T1. *Atlas of Genetic Oncology of Haematology*. Online version: <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0821ID1019.html>
- Lallemand–Breitenbach, V., y H. de Thé. 2010. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5).
- Ladines–Castro, W., Barragán–Ibañez G., Luna–Pérez, M.A., Santoyo–Sánchez, A., Collazo–Jaloma, J., Mendoza–García, E. y C.O. Ramos–Peñañiel. 2016. Morfología de

- las leucemias. *Revista Medica del Hospital General de México*. 79(2):107–13.
- Leach, M., Drummond, M., Doig, A. 2013. *Practical flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. John Wiley & Sons. 256pp.
- Lewis M., Bain, B., Bates, I. 2007. *Hematología práctica*. Elsevier. 632 pp.
- Llimpe, Y., Monteza, R., Ticlahuanca, J., Rubio, P., Ortíz, C., y A., Abelardo. 2013. Leucemia mieloide aguda subtipo M2 con variante de la translocación t(8;21) y expresión AML1/ETO. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 30(1): 145–146.
- Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jamerson, J.L. y J. Loscalzo. 2013. *Harrison Manual de Medicina*. 18a edición. McGraw Hill Interamericana. 1549 pp.
- Macedo, A., Orfao, A., González M., Vidriales, M. B., López–Borges, M.C. y San Miguel, J. F. 1995. Immunological detection of blast cell subpopulation in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia*. 9: 993–998.
- Maru Y. 1991. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*. 67(3):459–68.
- Merino, A. 2010. Clasificación de las leucemias mieloides agudas. *Revista de laboratorio clínico*. 3(3):139–147.
- Morales, O., Carranza, C. y Saravia P. 2012. Determinación de la frecuencia de los transcritos de fusión BCR–ABL (e1a2, b2a2 y b3a2) por RT–PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA–B). *Revista científica del Instituto de investigaciones químicas y biológicas de la Universidad de San Carlos, Guatemala y el Instituto de investigación y educación para enfermedades genéticas y metabólicas (INVEGEM)*. 22(1): 7–18.
- Navarro, J., Sandoval, R., Armendáriz, J. 2008. *Biología Molecular en Medicina. Mensaje Bioquímico*. Bustos, J. I., Castañeda, P. C, Oria, H. J., Rendón, H. E, Reyes, V. H y A. Romero (eds.). Vol. XXXII. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad

- Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO.
- NIH (National Institute of Health NIH). 2014. What you should know about Leukemia. Departamento de Salud y servicios humanos de EUA, EUA. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/necesita-saber-leucemia-PDF>
- Nguyen, S., Leblanc, T., Fenaux, P., Witz, F., Blaise, D., Pigneux, A., Thomas, X., Rigal-Huguet, F., Lioure, B., Auvrignon, A., Fièrre, D., Reiffers, J., Castaigne, S., Leverger, G., Harousseau, J.L., Socié, G., Dombret, H. 2002. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 99: 3517–3523.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2008. Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press.
- Paietta, E., Andersen, J., Yunis, J., Rowe, J.M., Cassileth, P.A., Tallman, M.S., Bennett, J.M., Wiernik, P.H. 1998. Acute myeloid leukaemia expressing the leucocyte integrin CD11b—a new leukaemic syndrome with poor prognosis: result of an ECOG database analysis. *Journal of Haematology*; 100:265–272.
- Pakakasama, S., Kajanachumpol, S., Kanjanapongkul, S., Sirachainan, N., Meekaewkunchorn, A. y V. Ningsanond. 2008. Simple múltiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 30(4):286–291.
- Paladino, M.I., Alonso, M.B., Alonso, C.N., Rubio, P.L., Alonso, L.M., Verón, D.A. y C. Riccheri. 2015. Duplicación del exón 2 del gen ABL1 en un paciente con leucemia mieloide crónica Filadelfia negativo. *Hematología*. 19(3): 221–226
- Pandolfi, P.P. 2001. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Human Molecular Genetics*. 10(7):769–75.
- Pavón, V. Hernández P., Martínez G., Agramonte O., Jaime J. y J. Bravo. 2005. Leucemia mieloide crónica. Actualización en Citogenética y Biología Molecular. *Revista Cubana de Hematología*.

- Perea–Durán, G. 2011. Factores pronósticos en Leucemia Mieloide Aguda: Utilidad de los estudios inmunofenotípicos y moleculares. Tesis doctoral del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona 244pp–
- Pichon–Riviere, A., Reynales–Shigematsu, L. M., Bardach, A., Caporale, J., Augustovski, F., Alcaraz, A., Caccavo, F., Sáenz de Miera–Juárez B., Muños–Hernández, J. A., Gallegos–Rivero, V. y Román E., Hernández–San. 2013. Carga de Enfermedad Atribuible al Tabaquismo en México. Documento Técnico IECS N° 10. Instituto de Efectividad.
- Rivera, L. R. 2010. Rutas críticas en la evaluación y tratamiento de niños con cáncer. Instituto Nacional de Pediatría. ETM. 230 pp
- Rodak, F. 2004. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. 2ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 884pp
- Rodríguez–Martínez, R. y O. G. Suescún. 2013. Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte*. ISSN 0120–5552.
- Rothstein, G. 1994. En Hematología clínica Wintrobe Vol. 1. Cap. 2. En: Lee, R., Bithell, T., Foerster, J., Athens, J., Lukens, J. Ed. Inter–médica. Cap. 2 Hematología clínica. Ed. Inter–médica. 617 pp
- Ruiz–Argüelles, J. G. 2009. Fundamentos de hematología. 4ª ed. Editorial Panamericana 143–157 pp
- Sakai T, Konuma Y, Shimoyama S, Kohda K. Development of AML without karyotype abnormalities including the Ph chromosome in a CML patient on second–generation TKI therapy. *Rinsho Ketsueki*. 2016;57(11):2329–2333.
- Salamanca–Gómez, F. 1995. Alteraciones cromosómicas en el cáncer humano. *Revista de Salud Pública de México*. 37(2): 162–170.
- Sans–Sabrafen, J., BessesC. y J. Vices. 2006. Hematología clínica. 5ª edición. ELSEVIER. 850pp
- Salomoni, P. y Pandolfi. P.P. 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell*.

108(2):165–70.

Salto–Tellez, M., Shelat, S. G., Benoit, B., Rennert, H., Carroll, M., Leonard, D. G. B y A. Bagg. 2003. Múltiplex RT–PCR for the Detection of Leukemia–Associated Translocations: Validation and Application to Routine Molecular Diagnostic Practice. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 5(4), 231–236.

Sekeres, M.A., Elson, P., Kalaycio, M.E., Advani, A.S., Copelan, E.A., Faderl, S., Kantarjian, H.M., Estey, E. 2009. Time from diagnosis, to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 113: 28–36.

Shigesada, K. y B. van de Sluis. 2004. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CFBF/PEBP2B–MHY11. *Oncogene*. 24;23(24):4297–307.

Sierra–Martínez, M., 2005. Detección de alteraciones numéricas y de la fusión génica *BCR/ABL* en pacientes adultos con leucemia aguda linfoblástica. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. 84pp.

Solary, E., Casasnovas, R.O., Campos, L., Bene, M.C., Faure, G., Maingon, P., Falkenrodt, A., Lenormand, B., Genetet, N. 1992. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: Correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/DR– phenotypes with shorter survival. *Leukemia*. 6: 393–399.

Solomon. B.M., L. y Martin, D. 2008. *Biología*. 8ª edición. McGraw–Hill Interamericana. España. 1235pp.

Stuurman N., Meijne, A.M.L., van der Pol, A.J., de Jong, L., van Driel, R., van Renswoude, J. 1990. The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 265:5460–5465

The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 368:2059–2074

- Tien, H.F., Wang, C.H., Lin, M.T., Lee, M.Y., Liu, M.C., Chuang, S.M., Chen, Y.C., Shen, M.C., Lin, K.H., Lin, D.T. 1995. Correlation of cytogenetic results with immunophenotype, genotype, clinical features and mutations in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 84: 60–68.
- UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). 2008. Métodos fisicoquímicos en biotecnología PCR. Instituto de Biotecnología 40pp.
- Van der Kolk, D. M., Vellenga, E., van der Veen, A. Y., Noordhoek, L., Timmer–Bosscha, H., Ossenkoppele, G. J., Raymakers, R. A., Muller, M., van der Berg, E. y E. G. de Vries. 2000. Detection of the multidrug resistance protein MRP1 gene in acute myeloid leukemia the impact on MRP1 gene in acute myeloid leukemia: the impact on MRP activity. *Blood*. 95(11), 3514–3519.
- Velázquez–González, A., Cruz, A., Cerezo, R. M. y Ortega V. 2001. Alteraciones citogenéticas en leucemia aguda mieloblástica. Significado clínico. *Gaceta Médica de México*. 137(1), 37–42.
- Wang, J.Y. 2014. The capable ABL: what is its biological function? *Molecular Cell Biology*. 34(7):1188–97.
- Yoshida C.A., Furuichi, T., Fujita, T., Fukuyama, R., Kanatani, N., Kobayashi, S., Satake, M., Takada, K. y T. Komori. 2002. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat. Genet*. 32(4):633–8.
- Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S., Licht, J.D. 2001. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 29;20(49):7186–203.