

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



TÍTULO.

PREVALENCIA DE LOS ONCOGENES BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4, E2A-PBX1 PRESENTES EN LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA) EN NIÑOS DE BAJA CALIFORNIA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:
JUDITH ARACELY LERMA SEVILLA**

**DIRECTOR DE TESIS:
Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

Junio 2016

Tijuana, Baja California, a 1 de Junio del 2016.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada “**Prevalencia de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4, E2A-PBX1 presentes en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños de Baja CALIFORNIA**”, elaborada por Judith Aracely Lerma Sevilla, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



MSP. José Román Chávez Méndez
Director de Tesis

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, 1 de Junio del 2016.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada **“Prevalencia de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4, E2A-PBX1 presentes en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños de Baja CALIFORNIA”**, elaborada por Judith Aracely Lerma Sevilla, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Horacio E. Almanza Reyes
Co-Director

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, 1 de Junio del 2016.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada **“Prevalencia de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4, E2A-PBX1 presentes en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños de Baja CALIFORNIA”**, elaborada por Judith Aracely Lerma Sevilla, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Carlos José M. Vera Hernández.
Sinodal

C.c.p. Archivo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



TÍTULO.

PREVALENCIA DE LOS ONCOGENES BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4, E2A-PBX1 PRESENTES EN LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA) EN NIÑOS DE BAJA CALIFORNIA

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:
JUDITH ARACELY LERMA SEVILLA**

**DIRECTOR DE TESIS:
Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

Junio, 2016

I. DEDICATORIA

Dedico esta tesis a todos esos grandes profesores que tuvieron la paciencia no solo de enseñar las lecciones sino también de inspirar y alentar mis sueños. En especial a mis primeros grandes maestros que me moldearon en lo que soy, a mis queridos padres.

II. AGRADECIMIENTOS

Durante este proyecto existieron muchas personas que estuvieron directa o indirectamente apoyándome, pero ante todo quisiera agradecer a los pacientes y sus familias que aportaron en este proyecto, sin su fortaleza no habríamos realizado esta investigación.

A la fundación Castro-Limón que sin conocerme me permitieron tomar este proyecto tan fascinante, vieron en mí el entusiasmo de ayudar y mis deseos aprender, gracias por esta increíble oportunidad.

Me gustaría de igual manera agradecer a mi padre, José de Jesús Lerma García, que me enseñó a amar los libros y alimento mi deseo de saber. Gracias por alentarme a seguir mis sueños, brindarme su infinito amor y por sus consejos llenos de sabiduría y cariño.

A mi madre, Dora Isabel Sevilla Manjarrez, gracias a su curiosidad y energía siempre me ha mantenido alerta y con ganas de conocer el mundo que me rodeo. Gracias por apoyarme en todo momento de mi carrera y por ser mi fortaleza en los momentos difíciles, por tener siempre palabras de alientos y cariño cuando el mundo a mí alrededor se derrumbaba.

A mi querida hermana y amiga, Cinthia, por escuchar atentamente mis problemas y dificultades, por acompañarme en los caminos de la vida, por estar siempre dispuesta a ayudarme a enfrentar cualquier adversidad, por llenar de risa mi vida, por ser mi cómplice.

A mi amado esposo, Arturo Ávila, por su comprensión y apoyo en esas noches de desvelo, hay cosas que parecieron insignificantes en su momento pero ahora que veo mi proyecto terminado su ayuda me permitió continuar y terminar. Gracias por creer en mí.

Agradezco el apoyo del mi director de tesis el Mtro. José Román Chávez, por compartirme su conocimiento y guiarme e ilústreme en el laboratorio, sin su ayuda no hubiera podido obtener estos resultados.

Al Dr. Horacio Almanza, que vio en mí potencial, gracias a su energía y entusiasmo me ha ayudado a concluir este proyecto.

A mis compañeros de maestría Carolina, Carlos, Eva, Miguel, Francisco por su compañerismo y amistad en este largo trayecto. A Lupita, Chava y Jimmy sin saberlo me forjaron e inspiraron.

A mis colegas y amigos Iván Velásquez y Rene Basso por auxiliarme y darme buenos consejos.

Sobre todo quiero agradecer a Dios por darme vida y salud, guiándome en este camino.

III. ABREVIATURAS

B.C.	Baja California.
BH	Biometría Hemática.
CSF	Líquido cerebroespinal
EBV	Epstein-Barr
FAB	Franco-americano-británico.
HOX	Homeobox
HTLV-1	Virus 1 de la leucemia/linfoma de células T
I.M.	Intra muscular.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
K/uL	Miles sobre microlitro.
LA	Leucemia Aguda
LC	Leucemia Crónica
LCR	Líquido Cefalorraquídeo.
LLA	Leucemia Linfoblástica aguda.
LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda.
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MRD	Enfermedad mínima residual.
mRNA	RNA mensajero.
NH₄Cl	Cloruro de amonio.
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud.
pb	Pares de bases.
RNA	Ácido ribonucleico.
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa retro transcriptasa.
SNC	Sistema Nervioso Central.
TCMH	Trasplante de células madre hematopoyéticas
UV	Ultra violeta.
V.O.	Vía oral.
VCM	Volumen corpuscular medio.

IV. RESUMEN

La caracterización molecular de las translocaciones y alteraciones en los puntos de fusión se encuentran entre los factores pronósticos de mayor relevancia en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). En diversos estados de la república mexicana, en especial en Baja California, el acceso a estas técnicas se encuentra limitado. Las alteraciones genéticas más frecuentes en LLA son E2A-PBX1, MLL-AF4, BCR-ABL(p190), BCR-ABL(p210) y TEL-AML1. La detección molecular de estas translocaciones por RT-PCR ofrece gran sensibilidad y especificidad, en caso importante en los puntos de fusión como BCR-ABL (cromosoma Filadelfia). En este proyecto se analizó la prevalencia de cuatro diferentes oncogenes (BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4 y E2A-PBX1) presentes en LLA en una población pediátrica entre las edades de 0 a 14 años, con el fin de implementar un diagnóstico molecular que nos permita establecer tratamiento oportuno en la población del estado de Baja California. Este estudio fue enfocado a mejorar el diagnóstico genético de la LLA, ya que en el Estado es la neoplasia maligna más común en la población infantil y la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en los niños menores de 15 años. Entre Septiembre del 2011 y Junio del 2014 se incluyeron a 85 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA en el protocolo de investigación, con un promedio de edad de 6 años. Se realizó un análisis molecular de 5 translocaciones por RT-PCR en todos los niños, extrayendo el RNA de linfocitos obtenidos de sangre periférica y fue retrotranscripto, posteriormente se realizaron las PCR y revelado en geles de agarosa al 1%, usando como control positivo las líneas celulares K-562, MV-4-11, Rs4(11), KASUMI-1 y ReH, correspondientes a cada translocación, utilizando los primers y las condiciones descritas en el protocolo BIOMED-1. Se obtuvieron los siguientes resultados: E2A-PBX1: 1 (1.17%), MLL-AF4: 0(%), BCR-ABL (p190): 1 (1.17%), BCR-ABL(p210): 4 (4.7%) y TEL-AML1: 0(%). El estudio molecular confirmó la caracterización genética en 6 casos. El diagnóstico molecular por RT-PCR permite la detección de translocaciones en LLA y contribuye a mejorar la caracterización de las leucemias. La incorporación y estandarización de estas técnicas moleculares en hospitales públicos son fundamentales para optimizar el

diagnóstico y lograr tratamientos específicos e individualizados según el grupo de riesgo del paciente y así disminuir la morbilidad y mortalidad relacionadas a esta enfermedad. Este proyecto se realizó gracias a la colaboración de la Fundación Castro-Limón, A.C. y el Centro Oncológico Pediátrico de Baja California C.A. y la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, con el fin de identificar las características moleculares que permitan detectar, controlar o predecir un buen pronóstico en pacientes diagnosticados con LLA, disminuyendo la tasa de mortalidad y mejorando su calidad de vida en los pacientes pediátricos.

V. ÍNDICE	
I. DEDICATORIA	7
II. AGRADECIMIENTOS	8
III. ABREVIATURAS	10
IV. RESUMEN	11
V. ÍNDICE	14
VI. INDICE DE TABLAS.	17
VII. INDICE DE FIGURAS	17
VIII.INDICE DE GRÁFICAS.	17
CAPÍTULO I	19
1.1. Introducción	19
CAPÍTULO II	22
2.1 Antecedentes	22
2.1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda	22
2.1.1.1. El descubrimiento de la Leucemia	22
2.1.1.2. El descubrimiento de las translocaciones en la Leucemias	23
2.1.1.3. El descubrimiento del cromosoma Filadelfia	24
2.1.2. Etiología de la LLA	25
2.1.3. Factores pronósticos de la LLA.....	28
2.1.4. Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda	29
2.1.5. Epidemiología de la LLA	31
2.1.5.1. Epidemiología global de la LLA	31
2.1.5.2. Epidemiología de la LLA en el continente Americano	32
2.1.5.3. Epidemiología de la LLA en México	32
2.1.5.4. Epidemiología de la LLA en Baja California.....	33
2.1.6. Mecanismos de generación de translocaciones en la LLA.....	34
2.1.7. Importancia de determinar la clase (translocación) de LLA	36
2.1.8. Metodologías para la detección de LLA	40
2.1.9. Tratamiento contra la LLA.....	41
2.1.9.1. Quimioterapia.....	42
2.1.9.2. Tratamiento tras la remisión	44
2.1.9.3. Trasplante de medula ósea	45

2.1.9.3.1. Clasificación y régimen de los trasplantes de células madre hematopoyéticas.....	46
2.1.9.4. Profilaxis del sistema nervioso central.....	46
2.1.9.5. Radioterapia.....	47
2.1.10. Toxicidad de la terapia contra la LLA.....	48
2.1.10.1. Farmacogenética	49
2.1.10.2. Terapia intratecal	49
2.1.12. Cultivo Celular	50
2.2. Justificación y uso de los resultados	52
2.3. Pregunta de investigación	53
2.3. Objetivos de investigación	53
2.3.1. Objetivo general.....	53
2.3.2. Objetivos específicos.....	53
CAPÍTULO III.	54
3.1. Población	54
3.1.2. Variables	55
3.2. Metodología	56
3.2.1. Obtención de la muestra	56
3.2.2. Transporte de la muestra	57
3.2.3. Obtención de linfocitos	57
3.2.4. Cultivo celular.....	58
3.2.5. Obtención de RNA	60
3.2.6. Obtención de cDNA por la técnica de Transcripción reversa.....	60
3.2.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	62
3.2.8. Electroforesis.....	64
3.2.9. Análisis estadístico.....	65
CAPÍTULO IV	66
4. Resultados	66
4.1. Edad.....	66
4.2. Genero.....	67
4.3. Información clínica.....	68
4.3.1. Serie roja.	69

4.3.2. Serie blanca.....	71
4.3.3. Plaquetas.....	72
4.4. Institución de procedencia.....	73
4.5. Análisis molecular.....	74
CAPÍTULO V.....	77
5. DISCUSIÓN.....	77
5.1. Edad.....	77
5.2. Relación género y estudio molecular.	78
5.3. Análisis clínico y molecular	79
CAPITULO VI.....	82
6. Conclusiones.....	82
CAPITULO VII.....	83
7. Anexos	83
7. 1. Aspectos Éticos y Legales	83
CAPITULO VIII.....	84
8. BIBLIOGRAFIA.....	84

VI. INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Pronostico según el tipo de oncogén

Tabla 2. Clasificación de la LLA según la asociación Franco-Americano-Britanico

Tabla 3. Genes implicados en la leucemia linfoblástica aguda de células B y T.

Tabla 4. Variables de la caracterización molecular de los oncogenes.

Tabla 5. Operacionalización de las variables.

Tabla 6. Líneas celulares utilizadas como controles positivo.

Tabla 7. Secuencia de *primers* para los rearrreglos génicos.

Tabla 8. Protocolo de PCR utilizada para cada secuencia.

Tabla 9. Tamaño (pb) de los productos obtenidos por PCR.

Tabla 10. Resultados de biometría hemática al diagnóstico en los pacientes con LLA

Tabla 11. Oncogenes presentes en los pacientes positivos con alguna translocación positiva.

Tabla 12.

VII. INDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Esquemas que muestra la posición de los primers que se utilizaron para amplificar los segmentos de cDNA por RT-PCR.

Figura 2: Se presenta el gel de agarosa al 0.9% con pacientes positivo a oncogén BCR-ABL p190.

Figura 3: Gel de agarosa con pacientes positivos.

VIII. INDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Distribución de las edades de los pacientes.

Gráfica 2. Gráfica de los pacientes según su grupo de riesgo.

Gráfica 3. Distribución de los pacientes pediátricos por género.

Gráfica 4. Dispersión de los valores de concentración de hemoglobina en los pacientes con LLA.

Gráfica 5. Dispersión de los porcentajes de hematocrito en pacientes con LLA

Gráfica 6. Muestra la distribución del recuento eritrocitario en los 49 pacientes.

Gráfica 7. Recuento leucocitario de los 49 pacientes

Gráfica 8. Diferencial mostrando recuento linfocitario con tendencia a la izquierda por linfopenia.

Gráfica 9. Recuento plaquetario que muestra un total de 19 pacientes con valores bajos.

Gráfica 10. Instituciones de procedencia de los 85 pacientes pediátricos integrados al estudio.

Gráfica 11. Porcentaje de los oncogenes presentes en la muestra estudiada.

Gráfica 12. Prevalencia de leucemia linfoblástica aguda de acuerdo a grupos de edad.

Gráfica 13. Relación de la presencia de los oncogenes según el género del paciente.

Gráfica 14. Relación de la presencia de alguna translocación según el género del paciente.

CAPÍTULO I

1.1. Introducción

Durante los últimos años se han desarrollado grandes avances en la investigación y tratamiento de las leucemias, a pesar de ello, según las estadísticas proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), aún representa la segunda causa de mortalidad infantil en el país, 18 de cada 100 casos de morbilidad hospitalaria en México fueron por tumores malignos en los órganos hematopoyéticos de los cuales la leucemia aguda obtuvo la mayor frecuencia en niños menores de 15 años (1,2). Aunándole una alta incidencia en el noroeste del país, 36.46 casos por millón de niños-año (3) nos revela la necesidad de encontrar métodos diagnósticos con mayor nivel de precisión y eficacia. A pesar de existir diversos estudios en el tratamiento y diagnóstico de la LLA siguen siendo pocas las investigaciones con un enfoque en pacientes mexicanos y aquellas realizadas en niños de esta región son aún más escasos (3), como resultado de esto se ha visto un incremento en los índices de mortalidad en pacientes diagnosticados con este padecimiento, mostrando un pico entre las edades de 2 a 3 años (1).

Las alteraciones cromosómicas se han venido estudiando en asociación con el buen o mal pronóstico de las leucemias al igual que la enfermedad mínima residual (MRD por sus siglas en ingles). La utilización de técnicas de RT-PCR para el control de MRD en pacientes leucémicos, basa en las limitantes que implican obtener un fragmento de DNA de alrededor de 10 kb en lugar de un pequeño fragmento de mRNA con la translocación deseada (4,5), ha permitido el seguimiento y manejo de pacientes leucémicos en alrededor de 14 países europeos. Con la ayuda de técnicas de biología molecular se ha logrado comprobar la existencia de una translocación críptica la t (12;21) en la LLA de tipo B, que no se detecta por las técnicas citogenéticas convencionales que involucra los oncogenes TEL y AML1 (6). Esta alteración es actualmente la más común en esta leucemia y se observa aproximadamente en el 25% de los casos (1). Las translocaciones cromosómicas más frecuentes en la LLA presentes en pacientes

pediátricos son: t(12;21)(p12;q22), t(1;19), (q23;p13), t(4;11)(q21;q23) y t(9;22)(q34;q11) (6). Investigaciones nos han revelado la alta incidencia de estas translocaciones, presentándose hasta en un 31.1% de los pacientes con LLA menores de 17 años la t(12;21) (7). Los genes de fusión comprometidos en estas alteraciones pueden ser detectados mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa o RT-PCR (por sus siglas en inglés reverse transcription polymerase chain reaction) técnica que puede ser utilizada tanto para el diagnóstico como para el estudio de la enfermedad residual durante el tratamiento. En una investigación realizada en el 2006 se utiliza esta técnica para determinar la frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con LLA, a partir del ARN mensajero (ARNm) obteniendo un ADN complementario mediante la reacción de transcriptasa reversa y fue utilizada para amplificar la secuencia específica de los genes de las fusiones antes mencionadas, como control interno se utilizó una PCR simple (6). Esta técnica nos revela una alta sensibilidad en el diagnóstico, en estudios realizados en el Hospital Nacional de Pediatría en Argentina reflejo a 33 casos positivos para algún rearrreglo cromosómico, 15 correspondieron a TEL-AML1, el cual no puede ser observado por técnicas de bandeado G (5).

Es bien conocido que los rearrreglos cromosómicos involucrados en el gen ABL-1 usualmente dan como resultados la fusión génica BCR-ABL1 la cual es frecuente en la leucemia linfoblástica aguda de células T y en la leucemia mieloide crónica (8,9); pero estudios recientes nos revelan la existencia de otros genes del producto de esta fusión cromosómica (BCR-ABL1, ETV6-ABL1, ZMIZ1-ABL1, EML1-ABL1 y NUP214-ABL1), donde el NUP214-ABL1 representa el 5% de las LLA de células T (10), por ello la necesidad del continuo estudio de estas translocaciones. La caracterización de las mutaciones del Gen FLT3 se ha utilizado como blancos terapéuticos en la leucemia aguda, sin embargo, esta alteración génica es detectada en 15.2% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y solo en un 10% de las LLA (11) por lo que no es recomendable su utilización en este tipo de estudio.

Los estudios génicos de las translocaciones $t(12;21)(p12;q22)$, $t(1;19)(q23;p13)$, $t(4;11)(q21;q23)$ y $t(9;22)(q34;q11)$ (6) en pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA nos muestran la posibilidad de establecer nuevas pautas de tratamiento, incluso criterios de selección de pacientes candidatos para trasplante de médula ósea o quimioterapia designando el curso de acción a tomar para cada paciente. De esta forma lograremos terapias individualizadas mejorando la esperanza y calidad de vida de los niños que sufren esta enfermedad. Ciertas translocaciones génicas han permitido plantear un subgrupo de pacientes con una evolución favorable, por lo que se considera un indicador de buen pronóstico; por ello, con el objetivo de disminuir los índices de mortalidad infantil por LLA (leucemia linfoblástica aguda) en el estado de Baja California, se debe buscar la estandarización de pruebas moleculares como método diagnóstico enfocadas en la búsqueda de marcadores genéticos (oncogenes) asociados al pronóstico. Para contribuir en el desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento que permitan establecer, con mayor índice de efectividad, el curso que se tomará para combatir la enfermedad proporcionando esquemas de tratamiento individualizados para mejorar la calidad de vida de los pacientes pediátricos con LLA.

CAPÍTULO II

2.1 Antecedentes

2.1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

Cáncer es el término utilizado para una serie de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo de células malignas con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado. El cáncer es una enfermedad genética ya que puede rastrearse hasta alteraciones dentro de genes específicos en las células somáticas de un individuo afectado. A causa de estos cambios, las células afectadas, se liberan de ciertas restricciones a las que se encuentran sujetas las células normales perdiendo la capacidad de autorregulación y de entrar en el proceso de apoptosis, proliferándose de manera incontrolable, ocasionando que formen masas malignas que destruyen y sustituyen a los tejidos normales (12,13). Debido a que las leucemias son un tipo de cáncer que se desarrolla a partir de células sanguíneas progenitoras y no en forma de tumores sólido, fue difícil que se considerara como un cáncer maligno (14) y no fue hasta mediados del siglo XIX que se tiene el primer registro de un caso. Las leucemias son un conjunto de neoplasias que podemos distinguir por una proliferación no regulada y maligna de células endógenas de la médula ósea. Estas células malignas o inmaduras rempazan e interfieren con la función de la médula normal, pudiendo incluso llegar a invadir otros órganos y causar la muerte del paciente (15,16).

2.1.1.1. El descubrimiento de la Leucemia

Las primeras descripciones de la sangre fueron hechas en 1647 por Leeuwenhoek pero estas solo se concentraron en un tipo de células sanguíneas, los eritrocitos, y no fue hasta 1749 que el anatomista francés Joseph Lieutaud describió a los glóbulos blancos, a los que llamo *globuli albicante*; en ese mismo año describen a las células blanquecinas presentes en el pus (glóbulos blancos). Un cuarto de siglo después, alrededor de 1774, el anatomista inglés William Hewson nos describe por primera vez al linfocito (18). Con estos grandes

descubrimientos se abre un nuevo panorama en la hematología concentrándose, principalmente, en los procesos inflamatorios y en la formación de pus, aunque aún no se lograba tener una descripción satisfactoria de pacientes con casos de leucémicos (17).

En 1845 tenemos el primer caso de leucemia publicado por el doctor John Bennett, en el *Edimburg Medical and Surgical Journal*. En él se describe el caso de una necropsia realizada a un paciente de 28 años, donde se observó hipertrofia del bazo (más de 3 kg) e hígado, llegando a la conclusión que la muerte del paciente tuvo lugar por una “supuración de la sangre” en donde toda la sangre estaba afectada y el paciente había sufrido una transformación dentro de su sistema sanguíneo y no una inflamación. (17,14). El segundo caso de leucemia fue publicado en Berlín, seis semanas después que Bennett, por Rudolph Virchow, el cual presento a un paciente de 50 años femenino con una enfermedad crónica y crecimiento del bazo. Durante la necropsia, Virchow, en encontró en todos los vasos sanguíneos lo que describió como una sustancia semejante al pus, presentando una descripción de las células con características morfológicas particulares, semejantes a lo que hoy en día conocemos como una leucemia linfocítica crónica. Después de publicar su segundo caso en 1847, Virchow, introdujo el término leucemia y para 1849 había identificado dos tipos de leucemias, esplénica y linfocítica. El siguiente gran avance fue hecho por Paul Ehrlich quien concluyo que la leucemia es una enfermedad del sistema hematopoyético primario y, en 1891, nos brinda la tinción que lleva su nombre la cual permitió diferenciar las distintas etapas de maduración de los leucocitos logrando, de esta forma, la clasificación de las leucemias (17,18).

2.1.1.2. El descubrimiento de las translocaciones en la Leucemias

En el año de 1960, se logra un gran avance en el entendimiento de la leucemia, Peter Nowell trabajando en colaboración con David Hungerford descubren que los pacientes con cierto tipo de leucemia (hoy sabemos que eran

pacientes con LMA) tenían células con cromosomas anormales (19) con estos avances se fundan las bases de la investigación cromosómica como posible factor determinante de las leucemias. A principios de los años 70s la Dra. Janet D. Rowley, especialista en inmunología de la Universidad de Chicago, utilizando una técnica combinada de Giemsa y bandeo con quinacrina, descubrió que esos cromosomas anormales, descritos por Nowell y Hungerford, eran provocados por una translocación, un cambio, recíproco entre el brazo largo del cromosoma 22 y la parte distal del cromosoma 9, otorgándole el nombre de cromosoma filadelfia. (19,20).

2.1.1.3. El descubrimiento del cromosoma Filadelfia

La fusión génica *BCR-ABL* da como resultado la formación del cromosoma Filadelfia esta translocación se encuentra en un 3-5% en pacientes pediátricos y es considerado como mal pronóstico, incluso con tratamientos de quimioterapia (21) por ello la importancia de su descubrimiento. En 1903 se propone la posibilidad que el cáncer pudiera deberse a anomalías cromosómicas como la ganancia o pérdida de cromosomas, esto gracias a los trabajos realizados por T. Boveri sobre mitosis en gusanos y erizos del mar. Sin embargo, no fue hasta 1960, cuando Peter C. Nowell y D.A. Hungerford identifican la primera anomalía cromosómica asociada a un tipo de cáncer en siete pacientes con leucemia mieloide crónica, sus hallazgos fueron publicados en su artículo original “*A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*” a esta anomalía la llamaron cromosoma Filadelfia (por el lugar donde habían trabajado en su descubrimiento) (22); este diminuto cromosoma es el resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 se encuentra presente en la leucemia mieloide crónica y en algunas leucemias linfoblásticas agudas. Esta translocación genera un gen quimérico formado por los genes *ABL1* y *BCR* que codifican una nueva tirosina cinasa (22,23,24).

Hoy se conoce ya cerca de 200 aberraciones cromosómicas cuya aparición se correlaciona con el cáncer, por ejemplo, endoreduplicación en la leucemia aguda la cual puede ocurrir tanto en la mitosis como en la meiosis y consiste en dos o más rondas sucesivas de replicación cromosómica sin pasar por ningún periodo mitótico intermedio, es decir, al terminar el periodo S los cromosomas no entraran en mitosis sino que volverán a la fase S. Esta aberración fue descrita por primera vez por Bottura y Ferrari en 1963 (25). Frecuentemente, las aberraciones cromosómicas originan que la síntesis de factores reguladores de la expresión génica este alterada, expresándose bien de modo anormalmente elevado, o bien como proteínas de fusión con otras, pudiendo en este caso provocar la pérdida de genes supresores (24).

2.1.2. Etiología de la LLA

En la leucemia linfoblástica aguda, como en la mayoría de los cánceres, las causas de la enfermedad son diversas y en ocasiones aún desconocidas pero se ha logrado establecer una relación o predisposición con ciertos factores, los cuales son llamados “factores de riesgo”. Existen una serie de síndromes o enfermedades congénitas en las cuales las LLA se presentan con mayor frecuencia, claro que esto no significa que las leucemias sean enfermedades que se hereden, por lo que el riesgo de esta afecciones no aumenta si uno de los miembros de una familia tiene la enfermedad (26). Algunos síndromes o enfermedades hereditarios que implican cambios genéticos que parecen elevar el riesgo de padecer LLA son la gammaglobulinemia, la anemia congénita de Fanconi, los síndromes de Wiskott-Aldrich, Schwchmann, Bloom, Down y Klinefelter. También en la denominada ataxia-teleangiectasia congénita se acumulan los casos de leucemias agudas (27,26).

Otras posibles causas son las alteraciones o transformaciones de un protooncogen, genes de células que codifican proteínas que estimulan el crecimiento y la división celular normal (28), un oncogén o la pérdida de un gen

supresor determina la transformación de una célula precursora hematopoyética normal en una leucémica (29). Se ha logrado observar hipoploidias, déficits de cromosomas cinco o siete, en las leucemias agudas mieloide; hiperploidias, exceso de cromosoma 8, en las agudas mieloides; en algunos pacientes que presentan leucemias agudas linfoides se han observado 50 y hasta 60 cromosomas, translocaciones frecuentemente la 9-22 (denominada cromosoma filadelfia) y otras. La exposición a diversas sustancias químicas ha sido asociado a diferentes tipos de padecimientos oncológicos, entre ellos los pesticidas o herbicidas han sido asociadas con diversas leucemias entre ellas la LLA y LLM, el ejemplo más común son las personas que trabajan con el benceno o sus derivados (industrias de caucho, lubricantes, tinturas, detergentes, etc), ya que este disolvente orgánico es oxidado hasta formar un epóxido a través del CYP2E1 hepático, un componente del sistema de la enzima P- 450, este epóxido y otros metabolitos alteran la diferenciación celular de la medula ósea y causan aplasia medular y leucemia (30). Por lo que los trabajadores con una exposición prolongada al benceno y sus derivados presentan una mayor incidencia de leucemias mieloides y linfoides que el resto de la población, en una frecuencia de 5 a 10 veces mayor en aquellos expuestos en comparación con la población no expuesta. Los trabajadores agrícolas que manipulan habitualmente herbicidas y pesticidas padecen mayor cantidad de leucemias linfoides crónicas (26,31).

Algunas otras sustancias químicas que también pueden ser causantes de diferentes tipos de leucemias, entre ellas la LLA, son ciertos medicamentos utilizados en las quimioterapias, los enfermos que reciben tratamiento citostático poliquimioterápico por padecer linfoma, por ejemplo, aunque benéfico para eliminar su enfermedad de base, desarrollan en los años siguientes una mayor cantidad de casos de leucemia mieloide aguda (31). Esto es causado por el efecto citotóxico la quimioterapia sobre las células en división por lo que los tejidos más afectados son la medula ósea, los folículos pilosos y las mucosas. Un ejemplo de este efecto son los quimioterapicos con agentes alquilantes los cuales ocasionan daño directo sobre el ADN de las células, forman una unión molecular en los

codones de ADN dentro de las células impidiendo su reproducción. Lo que puede ocasionar, a largo plazo, daño medular dando como resultado una leucemia aguda, pudiéndose presentar incluso hasta 10 años después de la administración del tratamiento. De la misma forma, los fármacos inhibidores de la topoisomerasa II pueden aumentar el riesgo de LMA en un periodo de tiempo más corto (2 a 3 años).

La exposición a altos niveles de radiación es un riesgo tanto para LLA como para LMA. Un dato muy conocido es que las personas que han estado sometidas a dosis altas de radiaciones ionizantes (bombas atómicas, accidentes en centrales nucleares, etc) ofrecen una alta mortalidad para leucemias mieloides agudas y crónicas y para leucemias linfoblástica agudas. Ejemplo de ellos son los casos de los niños de Hiroshima y Nagasaki los cuales presentaron una elevada incidencia de LMA después de la exposición a la radiación de bombas (31). El tratamiento del cáncer con radioterapia también aumenta el riesgo de leucemia, aunque el riesgo es mayor en la LMA (27). Sin embargo, recientes estudios nos muestran que la exposición crónica a bajas dosis de radiación, por ejemplo el personal de salud o trabajadores de plantas nucleares, también presentan un elevado índice de mortalidad por leucemia; siendo la mortalidad proporcional al tiempo de exposición (32). Existen diversos mecanismos y teorías por los cuales las radiaciones ionizantes afectan la estructura la estructura molecular del ADN, uno de ellos, el cual se ha visto asociado a diversas aberraciones cromosómicas, es la rotura bihelice. Esta suele producirse como consecuencia de fenómenos ionizantes inducidos en puntos opuestos de ambas hélices ocasionando la rotura, su reparación es en especial difícil al ser defectuosa o estar ausente la información genética necesaria para la restructuración de una y otra hélice. La aparición tardía de estas enfermedades al exponerse a la radiación es debida a la cinética de reparación de estas roturas bihelices, caracterizada por un componente inicial rápido el cual decrece al paso del tiempo.

En la actualidad se manejan dos teorías: 1) “reagrupación incorrecta de fragmentos de ADN y lento desarrollo del proceso de reparación” y 2) “Inducción de un subconjunto de rupturas bihelices radioinducidas que se expresan cuando progresa el ciclo celular, como translocaciones e intercambio cromosómico de material genético, lesiones que podrían manifestarse de forma tardía como leucemia, linfoma o tumores” (32,33). El papel de los virus como agentes causales de leucemia en niños no se ha comprobado hasta el momento (29), se cree que la inserción, por parte de algunos virus, de un oncogén asociado a la secuencia promotora estimuladora en las células del huésped puede inducir la activación de leucemogénesis (34). Aunque la relación directa entre ciertos virus y la leucemia aún está bajo estudio asociación entre los virus HTLV-1 (virus 1 de la leucemia/linfoma de células T) y las leucemias agudas o crónicas de tipo T-linfocítico. Parece ser que los mecanismos de adquisición del virus son la vía sexual, la transmisión madre-recién nacido y la administración de productos sanguíneos; la mayoría de los casos ocurren en Japón y en el área del Caribe. El virus de Epstein-Barr (EBV), común en África, está relacionado con el linfoma de Burkitt, mononucleosis infecciosa y LLA (26). Las aplasias medulares, las hipoplasias y las mieloplasias son frecuentes mensajeros de LLA o LMC (27).

2.1.3. Factores pronósticos de la LLA

Los pacientes pediátricos diagnosticados con LLA se clasifican en grupos de riesgos, con un tratamiento más intensivo aquellos con el riesgo mayor. Los factores pronóstico más importantes son la edad al diagnóstico y la cuenta inicial de leucocitos. Aquellos pacientes diagnosticados entre las edades de 1 a 9 años con LLA suelen tener mejor tasa de supervivencia, mientras que aquellos mayores de 10 o menores al año en el momento del diagnóstico, entran a la clasificación de alto riesgo. Sin embargo, el pronóstico de los pacientes con la LLA de células T no parece ser alterado por este factor (26).

Los análisis de pacientes con LLA han revelado una asociación estrecha entre la presencia de ciertas translocaciones y un pronóstico

favorable/desfavorable; ya que pacientes que portan la formación del cromosoma Filadelfia t(9:22) [*BCR-ABL*], desarrollan una LLA agresiva con pocas alternativas de tratamiento, al igual que pacientes con una t(4:11) [*MLL-AF4*]. Mientras que aquellos la fusión *E2A-PBX1* [t(1;19)] y *TEL-AML1* [t(12;21)] tienen un pronóstico favorable con ventaja de un tratamiento menos agresivo (35,36). Con los esquemas terapéuticos internacionales actuales, la LLA infantil, tiene una remisión completa entre el 95 y 98% de los pacientes con el tratamiento de inducción, a las 4 – 5 semanas, es decir una regresión de los signos y síntomas y restauración de la actividad de medular sin células blásticas detectables al examen con microscopia convencional (29). Alrededor del 80% se mantiene durante 5 años en la situación alcanzada después de recibir quimioterapia de consolidación y mantenimiento durante dos años.

Tabla 1. Pronostico según el tipo de oncogén.

Oncogén	Translocación	Pronostico
TEL-AML1	t(12;21)	Favorable
MLL-AF4	t(4;11)	Desfavorable
E2A-PBX1	t(1;19)	Favorable
BCR-ABLp190	t(9;22)	Desfavorable
BCR-ABLp210	t(9;22)	Desfavorable

Mutaciones de los genes con sus respectivas translocaciones mostrando la asociación a pronóstico favorable y aquellos cuya presenciase es desfavorable.

2.1.4. Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda

Aunque con la aparición de nuevas terapias y tratamientos se ha ido modificando la clasificación de las leucemias, aún podemos identificar dos grupos principales: aguda y crónica. En el pasado, esta clasificación se basaba en la supervivencia de los pacientes; sin embargo, actualmente se reconoce que la leucemia aguda implica la proliferación maligna de células inmaduras (blastos), mientras que la leucemia crónica se refiere a la proliferación de tipos celulares más diferenciados. Además, de acuerdo con el origen del tronco celular del que

proceden, la leucemia crónica y aguda se clasifica en linfoide y mieloide (37). Combinando estos criterios obtenemos los cuatro tipos principales de leucemias:

- Leucemia Mieloide Aguda (LMA)
- Leucemia Linfoide Aguda (LLA)
- Leucemia Mieloide Crónica (LMC)
- Leucemia Linfoide Crónica (LLC)

La palabra leucemia, como ya se vio anteriormente, significa “sangre blanca” y el término “aguda” es utilizado por razones históricas, antiguamente los pacientes con esta enfermedad tenían una sobrevida menor que aquellos con la LC (16). Las leucemias agudas (LA) son un grupo heterogéneo de padecimientos los cuales podemos identificar por una proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a sobreproducción neoplásica de células incapaces de madurar y funcionar normalmente (16).

Tabla 2. Clasificación de la LLA según la asociación Franco-Americano-Británico.

Tipo	Características	
L1	Presencia de blastos pequeños, con escaso citoplasma y vacuolización variable. El núcleo se presenta irregular y con nucléolos.	Negativo para mieloperoxidasa
L2	Presencia de blastos de tamaño heterogéneo, con citoplasma y vacuolización variable. El núcleo de características normales y sin presencia de nucléolos.	
L3 (tipo Burkitt)	Presencia de blastos grandes, citoplasma basófilo y vacuolización intensa. Núcleo de forma y tamaño regular con nucléolos.	

Clasificación de la FAB basada en la morfología y nivel de maduración de los blastos publicada en 1986.

La clasificación para la leucemia linfoblásticas aguda de mayor aceptación es la establecida por un grupo franco-americano-británico (FAB) la cual nos establece tres variantes morfológicas, conocidas como L1, L2 y L3 (Tabla 2). La diferencias entre cada una será dada por el grado de maduración del núcleo del linfocito, el tamaño y la presencia de vacuolas.

La LLA-L1 presenta células uniformes, con tamaño pequeño y escaso citoplasma. Núcleo de tamaño regular y cromatina homogénea, con las anomalías citogenéticas t(9:22), t(4:11) y t(9:19). Este tipo de leucemia es más frecuente en la población pediátrica que en la adulta (85% y 25 – 30 % respectivamente). Mientras que la LLA-L2 se presentara con linfoblastos de tamaño variable, nucléolos grandes y cromatina heterogénea; y anomalías citogenéticas 14q11 o 7q34, común en adultos más que en la población infantil (70% adultos y 14 % niños). La LLA-L3 es la menos común presentándose en solo el 1 al 2% de los casos, se distingue por células grandes, indiferenciadas, con nucléolos notorios y numerosas vacuolas, con células B en 95% y células similares al linfoma de Burkitt y las anomalías citogenéticas t(8:14), t(8:22), t(2:8) (38,39).

2.1.5. Epidemiología de la LLA

2.1.5.1. Epidemiología global de la LLA

Según las estadísticas de la OMS el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, en el año 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos (40). Las leucemias son el tipo de cáncer más común en niños y adolescentes. Representando casi la tercera parte de todos los casos de cáncer en menores de 15 años, reportados en Europa, Asia y América; y la cuarta parte de los casos que ocurren antes de los 20 años (26). La Sociedad Americana del Cáncer pronostica que cerca de 2,700 niños serán diagnosticados con leucemia en los Estados Unidos durante el año 2003. De los 2,700 niños con leucemia, cerca de 2,200 (81.5 %) serán diagnosticados con leucemia linfocítica aguda, y del 18.5 % restante muchos serán diagnosticados con leucemia mielógena aguda (26). Las leucemias crónicas son muy raras en los niños. La leucemia linfocítica aguda es más común en la infancia temprana, y alcanza su mayor incidencia entre las edades de 2 a 3 años (> 80 por millón por año), con tasas que disminuyen a 20 por millón entre niños de 8 a 10 años de edad. La incidencia de LLA en pacientes de 2 a 3 años de edad es aproximadamente 4 veces mayor que entre niños menores de 2 años y casi 10 veces mayor que entre

los de 19 años de edad (26). Diversos estudios han demostrado que la translocación de mayor frecuencia en la población adulta mundial es la BCR-ABL t(9:22), también conocido como cromosoma filadelfia, el cual presenta un pronóstico desfavorable; mientras que en la población pediátrica la aberración cromosómica TEL-AML1 t(12;21) se presenta en un mayor porcentaje, siendo una translocación de pronóstico favorable (36).

2.1.5.2. Epidemiología de la LLA en el continente Americano

Durante el 2011, de cada 100 personas menores de 20 años con tumores malignos, 59 lo presentaron en los órganos hematopoyéticos, siendo la causa principal por leucemia (41). La LLA se presenta a una tasa anual de 35 a 40 casos por millón de personas en los Estados Unidos, en donde hay alrededor de 2.900 niños y adolescentes menores de 20 años diagnosticados anualmente con LLA. Durante los últimos 25 años, se ha presentado un aumento gradual de la incidencia de la LLA (26). La incidencia más alta de LLA se observa en niños hispanos (43 casos por millón). La incidencia es mucho mayor en niños blancos que en niños negros; se observa una incidencia de LLA tres veces mayor en niños blancos que en niños negros de 2 a 3 años (26). En Argentina se registran de 370 casos/año de leucemia en menores de 15 años de edad. De aquellos diagnosticados con LLA, el 22 % presenta la t(12:21) seguido del 8% con t(4:11) (36).

2.1.5.3. Epidemiología de la LLA en México

En un periodo de 5 años los estados con la mayor incidencia relativa por millón de habitante de casos con cáncer fueron: Baja California Sur (147), seguida por Colima (93), Durango (88) Sonora (87), Sinaloa (82) y por ultimo Tamaulipas con una incidencia relativa de 59 (42). Formando un bloque que muestra claramente el mayor número de casos en el noroeste del país. Baja California fue descartado de este bloque, aunque su incidencia relativa sigue siendo alta de 51.1

(casos por año). La leucemia representa la primera causa de muerte, no accidental, en edad preescolar (de 5 a 14 años) en (41) (43). De acuerdo al Registro Epidemiológico de Neoplasias Hemato-Oncológicas se registraron alrededor de 10 400 casos nuevos en el año de leucemia, de los cuales la as frecuente es la LLA, y tiene una incidencia de 4-5 por 100 000 habitantes entre la población infantil entre las edades de 2 a 4 años, disminuyendo levemente durante la infancia tardía y la adolescencia (44). Esta elevada incidencia obligo al gobierno federal, a partir del año 2005, y a través de la Comisión Nacional de Protección Social en Salud incorporar a la cobertura del Fondo de Protección contra Gastos Catastróficos la LLA en menores de 18 años (42).

La leucemia linfoblástica aguda representa la primera causa de egresos (en pacientes con algún problema oncológico) y produce el 50% de las atenciones hospitalarias. Tomando como base el promedio de vida esperada de 70 años y la información proporcionada por el INEGI se ha calculado que en promedio se dejaron de vivir por la muerte temprana de LLA 59.2 años por paciente (teniendo como referencia la edad de defunción de niños con LLA en los 10.8 años) (42). Aunque las estadísticas muestran un elevado número de pacientes pediátricos con padecimientos oncológicos, desafortunadamente el Consejo Mexicano de Oncología, A.C., revela que hasta el 2014 había 183 pediatras certificados, de los cuales solo el 54% (99 oncólogos) pertenecen a hospitales acreditados por el Seguro Popular. Lo que nos dejaría con una cifra baja de especialistas por hospital certificado, aunque existen instituciones que tienen un solo especialista que cubre todo el estado, entre ellos Tlaxcala, Baja California Sur y Tabasco (45).

2.1.5.4. Epidemiología de la LLA en Baja California

En Baja California, durante el 2011, de cada 100 personas menores de 20 años con tumores malignos, 70 lo presentaron en los órganos hematopoyéticos, siendo en su mayoría causados por leucemia (41). La principal causa de mortalidad en Baja California la ocupan los tumores malignos en los órganos hematopoyéticos (médula ósea, bazo y timo) que representan 69.7% de los

cánceres; por sexo se concentra 70.9% en los varones y 67.6% en las mujeres de este grupo de edad y condición (1). Para el año 2007 la expectativa de vida a 5 años de niños padeciendo leucemia aguda en el estado de Baja California estaba estimada en un 10% Referencia.

2.1.6. Mecanismos de generación de translocaciones en la LLA

Las mutaciones cromosómicas son aquellas que afectan una parte de uno o varios cromosomas o bien que implican un reordenamiento o translocación (46), estas mutaciones pueden deberse a una recombinación no homologa entre los cromosomas. Para su mejor estudio se han clasificado en dos grupos: mutaciones estructurales y mutaciones numéricas. En este caso, nuestro particular interés, radica en los cambios cromosómicos estructurales que son anomalías en las cuales existe intercambio de un segmento de un cromosoma y otro; por lo tanto podemos considerar como tales a la deleción o duplicación de material genético, o bien, los reordenamiento provocadas por cambios en la orientación (inversión) o en la localización (translocación) de fragmentos cromosómicos (47,48). Las translocaciones usualmente son recíprocas, una parte se intercambia con otra sin material cromosómico perdido o ganado. Las translocaciones ocurren de forma espontánea pero pueden ser transmitidas a la descendencia por varias generaciones. En ocasiones, el punto de ruptura de una translocación en un gen interrumpe su función. Esta es una causa importante de tumores que se originan en el sistema hematopoyético (48). Las translocaciones *robertsonianas* implican dos cromosomas acrocentricos diferentes y las dos fracturas de los cromosomas se producen a nivel de los dos centrómeros originando dos productos, uno variable compuesto por los dos brazos largos unidos por las regiones centromericas, y el otro, que se pierde, formado por los dos brazos cortos y no se traduce en un efecto fenotípico (49). Las translocaciones recíprocas consisten en el intercambio de segmentos entre dos cromosomas y dan como resultado dos cromosomas derivados que en general tienen una forma diferente de la de los dos cromosomas originales (49).

En los años sesenta los citogenetistas comenzaron a observar como muchos tumores, incluidos los linfomas y leucemias, se asociaban con translocaciones cromosómicas recíprocas pero su significado no se conoció hasta 20 años más tarde. En esta época la secuenciación de las regiones de intercambio de los genes de IgH en los linfomas B reveló la presencia de fragmentos de ADN que no derivaban de los genes de Ig. Este fragmento de ADN se identificó como una porción de proto-oncogén *c-myc* (el cual se presenta de forma normal en el cromosoma 8 humano). En todos los casos de linfoma Burkitt, se transloca el gen *c-myc* del cromosoma 8 con uno de los *loci* de las Ig, por lo que se presentan las translocaciones recíprocas 8;14, 2;8 y 8;22. El producto del gen *myc* es un factor de transcripción y su translocación provoca un trastorno de la expresión, este aumento de actividad, se cree que ocasiona proliferación celular incontrolada (23). Desde el descubrimiento de las translocaciones *myc* en los linfomas B, se han identificado genes implicados en las translocaciones de muchos otros tumores linfocíticos y no linfocíticos; entre ellos se encuentran los siguientes ejemplos de LLA:

Tabla 3. Genes implicados en la leucemia linfoblástica aguda de células B y T.

Leucemia	Translocación	Genes Implicados	Prevalencia en LLA
LLA pre-B	t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	25% de los casos infantiles
LLA pre-B y LMC	t(9;22)(p34;q11.2)	BCR - ABL	25% en adultos y 3% de LLA infantiles
LLA pre-T	t(1;14)(p32;q11.2) (1p32)	TAL1-TCR α ; TAL1 – SCL	5% de los casos (p32;q11.2) (1p32) en el 20% de los casos

Genes implicados en las leucemias de células B y T con su prevalencia de acuerdo al grupo poblacional.

En la mayoría de los casos estas translocaciones provocan un trastorno de los factores de regulación de la transcripción, proteínas de supervivencia celular o moléculas que transcriben señales tales como cinasa (23). Cerca del 25% de las LLA infantiles presentan una translocación balanceada (12;21) que produce un gen de fusión que codifica una proteína quimérica que consta de la porción de la unión al ADN de AML-1 y el dominio de dimerización de TEL-1, un factor de

transcripción de la familia Ets. Las proteínas quiméricas que incluyen AML-1 parecen tener una actividad “negativa dominante” que impide la función normal del AML-1, lo que origina un bloqueo de la diferenciación celular (23). El reordenamiento más frecuente en todas las LLA T produce una expresión inadecuada de TAL1, un gen que codifica un factor de transcripción básico de tipo hélice-bucle-hélice, que parece interferir específicamente en la diferenciación de los linfocitos T (23).

2.1.7. Importancia de determinar la clase (translocación) de LLA

Los arreglos moleculares más importantes para LLA por su valor pronóstico y frecuencia son los correspondientes a los genes de fusión *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL(p190, p210)* y *TEL-AML1*, que corresponden respectivamente a las siguientes translocaciones: t(1;19)(q23;p13), t(4;11)(q21;q23), t(9;22)(q34;q11) y t(12;21)(p13;q22). La mayor sensibilidad de las técnicas de biología molecular permite detectar un mayor número de casos positivos, que por citogenética o citometría de flujo, optimizando así el diagnóstico en grupos de riesgo y la consiguiente adecuación del tratamiento (50). El análisis molecular de la LLA ha mostrado una estrecha correlación entre la presencia de alteraciones específicas y el grado de malignidad, ya que pacientes que portan la formación del cromosoma Filadelfia 9 y 22 [*BCR-ABL* t(9;22)] (51), desarrollan una LLA muy agresiva con pocas alternativas de tratamiento; claramente con mejor pronóstico aquellos pacientes que presentan la fusión *E2A-PBX1* [t(1;19)] ya que responden bien al tratamiento; los pacientes que presentan la fusión *TELAML1* [t(12;21)] tienen un pronóstico más favorable, con una probabilidad de supervivencia de hasta un 100% y con la ventaja de que no requieren de terapias agresivas con efectos adversos.

Existen dos formas de la translocación equilibrada t(1;19), o como una alteración no equilibrada, apareciendo un der(19)t(1;19), que resulta en una trisomía del brazo largo del cromosoma 1 y monosomía de la región distal del cromosoma 19p. Las técnicas moleculares pueden revelar el producto de fusión

PBX1/E2A y ser utilizadas en la detección y monitorización de la t(1;19) (52). Esta última forma es más frecuente (75 %) en la t(1;19) que se asocia con leucocitosis alta, niveles altos de LDH, infiltración del SNC, y con un inmunofenotipo pre-B (clg +) (53). La consecuencia molecular en ambas es la fusión del gen *E2A* localizado en 19p13 con el gen *PBX1* en 1q23, originando un gen quimérico cuyo producto es una proteína aberrante que actúa como un potente activador de la transcripción (54), E12 y E47 de la familia HLH (hélicelazo-hélice), que se unen a elementos activadores del gen de las inmunoglobulinas (*IGK*), además de regiones reguladoras de otros genes. Los puntos de rotura en *E2A* tienen lugar en una región de 3.5 kb, entre los exones 13 y 14. El punto de rotura en 1q ocurre en el *locus* de *PBX1*, un gen homeobox (*HOX*), en una región de 50 kb, entre los exones 1 y 2. Los genes *HOX* codifican factores de transcripción que regulan el proceso del desarrollo. La fusión del gen *E2A* en 19p13 con el *locus* *PBX1* en 1q23, como consecuencia de la t(1;19) genera un gen de fusión *E2A-PBX1* que contiene los dominios activadores de *E2A* y el homeodominio de unión a ADN y de dimerización de proteínas de *PBX120*. El potencial neoplásico de la proteína de fusión consiste en aumentar la expresión del gen *PBX1*, debido al dominio de activación del gen *E2A*, activando así la transcripción de genes normalmente regulados por *PBX1* que habitualmente no se expresa en tejidos linfoides (53).

Inicialmente esta alteración se asociaba a mal pronóstico, pero varios estudios han demostrado buenas respuestas con tratamientos más intensivos. En LLA la translocación más frecuente es la t(4;11), presentándose en el 60% de los casos pediátricos menores de 1 año, en un 3% en aquellos mayores al año y 5-10 % de adultos (50), En la mayor parte de los protocolos clínicos, los pacientes con la t(4;11) se asignan a grupos de alto riesgo, requiriendo quimioterapias intensivas ya que el pronóstico de los pacientes es malo y únicamente el 75% consiguen la remisión completa. Las recaídas son precoces y la supervivencia es menor de 2 años por lo que el trasplante alogénico es el tratamiento de elección (55).

El punto de rotura en 11q23 o t(4;11) implica a un gen de gran tamaño con 37 exones (> 1Mb): *MLL* (también llamado *HRX*, *ALL1*, *HTRX1*). En todas las

translocaciones que afectan a 11q23, el gen *MLL* se rompe en un área restringida de 8.3 kb entre los exones 5 y 11. En la t(4;11) la porción 5 del gen *MLL* se une a la porción 3 del gen *AF4* en 4q21. El ARNm quimérico (*AFL4-MLL*) generado por esta translocación produce una proteína que contiene la región N-terminal de *MLL*, incluyendo los dominios AT y metiltransferasa, unida a la región C-terminal de *AF425*. Esta estructura es común a todas las proteínas de fusión en las que interviene *MLL* y su efecto neoplásico está relacionado con las alteraciones de la capacidad de *MLL* en la regulación de la expresión de genes *HOX*. Son relativamente frecuentes los casos CD10- y expresión de marcadores mieloides (CD13, CD15 y CD33). En general, la presencia de reordenamientos en 11q23 está asociada a poca respuesta al tratamiento y mal pronóstico, especialmente en niños < 1 año (55) .

La aberración génica *ABL-BCR* se produce cuando una parte del gen *ABL* localizado en el cromosoma 9 es transferida e insertada dentro del gen *BCR* del cromosoma 22, originando el transcrito de fusión *BCR/ABL*. En LLA los puntos de rotura en *ABL* se dan principalmente entre el exón 1 y 2, en *BCR* se dan en la mayoría de los casos también entre el exón 1 y 2 (región m-*bcr*), dando lugar a un transcrito e1a2 que traduce para una proteína 190 kDa (p190). Se ha descrito que el gen híbrido p190*BCR-ABL* actúa básicamente durante la diferenciación linfocítica y monocitoide. Entre los exones 12 y 16 (región M-*bcr*) se producen (con menor frecuencia) los transcritos b2a2 o b3a2, siendo en este caso la proteína resultante la p210 Kd. Ambas proteínas de fusión (p190 y p210) tienen una actividad tirosinasa (56) superior a la proteína p145 Kd del gen *ABL* normal. El mal pronóstico de esta alteración parece independiente del tipo de proteína de fusión ya que la persistencia del cromosoma Filadelfia durante más de 6 meses después del trasplante es indicativa de un mal pronóstico (57). La técnica molecular por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa) es más sensible en la detección de translocaciones, pudiendo detectar la fusión del gen con una sensibilidad de 10^6 .

El reciente descubrimiento de reordenamiento *TEL/AML1* originado por la $t(12;21)$ (58), se ha identifica en un 25 % de LLA infantil que no es detectado en un análisis citogenético convencional debido a la similitud en tamaño y patrón de bandas de los segmentos 12p y 21q implicados en la translocación que requiere la utilización de otros métodos de análisis genéticos como FISH o RT-PCR (59). La gran mayoría de los pacientes con $t(12;21)$ pertenecen a un grupo de edad favorable (1-9 años). Inmunológicamente se asocia con CD10+, aumento en la expresión de CD13 y CD33, KOR-SA3544 (-) y con la presencia de cariotipos diploides. Independientemente de otros factores, como la edad o el recuento leucocitario, la $t(12;21)$ conlleva un buen pronóstico. La fusión del gen *TEL* (*ETV6*) en 12p13 con el gen *AML1* (*CBFA2*) en 21q22, como consecuencia de la $t(12;21)$ genera un gen de fusión *TEL-AML1* (60). *TEL* es un gen de 8 exones, y los puntos de rotura en esta translocación se dan principalmente en una región de 15 kb, entre los exones 5 y 6. Se expresa en numerosos tejidos y contiene dos dominios encontrados en otros factores de transcripción de la familia ETS: un dominio N-terminal de dimerización hélice-lazo-hélice (HLH) y un dominio C-terminal ETS de 70 aminoácidos de unión a ADN, y juega un papel esencial en la hematopoyesis de la médula ósea. La otra diana de la $t(12;21)$, el gen *AML1* fue clonado inicialmente en la $t(8;21)$ en LANL. *AML1*, que contiene un dominio *runt* de unión a ADN y transactivación, codifica la subunidad del factor de transcripción CBF, se une a la secuencia activadora TGT/cGGT como un heterodímero con CBF y es esencial para el desarrollo de la hematopoyesis de todas las líneas. La consecuencia de la $t(12;21)$ es la fusión del dominio 5 HLH del gen *TEL* con el dominio 3 (*runt*) de unión a ADN y transactivación del gen *AML1*.

El efecto neoplásico de la función *TEL-AML1* parece estar mediado en parte por la pérdida de función de la proteína *TEL* normal (61). Por medio del dominio HLH, *TEL-AML1* puede formar homodímeros y heterodímeros con la proteína *TEL* (62). El alelo no traslocado de *TEL* está frecuentemente deletado en LLA con $t(12;21)$, lo que puede modificar el pronóstico de estos pacientes, correlacionándose en algún estudio con progresión y considerándose como una

alteración secundaria. La alteración en los dos alelos de TEL sugiere que la proteína TEL puede actuar como un regulador negativo de la proliferación celular (63). Además, TEL-AML1 inhibe la transactivación de genes por la proteína normal AML1. Se piensa que esta inhibición de la función normal de AML1 contribuye directamente a la transformación de las células neoplásicas. Se han descrito más de 40 translocaciones implicadas en fusiones con TEL, distintas a la t(12;21), tanto en leucemias mieloides como linfoides, de las cuales actualmente se han clonado 17 genes: JAK2, MN1, EVI1, entre otros, lo que sugiere las alteraciones en la función normal de este gen juegan un papel significativo en el proceso neoplásico (64).

2.1.8. Metodologías para la detección de LLA

La sospecha de cualquier tipo de leucemia comienza con la exploración física del paciente seguido de una serie de estudios de laboratorio. La exploración puede revelar alguna o varias de las siguientes anomalías: adenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, sangrado y/o lesiones infiltrativas en piel, encías, ojos o testículos (65). Los estudios de laboratorio que auxilian en el diagnóstico y que posteriormente también permiten la valoración del paciente comienzan con una biometría hemática, la cual puede ser normal en etapas tempranas y posteriormente puede aparecer citopenias aisladas (anemia, neutropenia o trombocitopenia) o combinadas (bicitopenias o pancitopenia) (65). Estudios han revelado como una de las alteraciones más frecuentes en la línea eritrocitaria es la anemia microcítica hipocromica con una media de hemoglobina de 7.11 g/dL. Los frotis sanguíneo de sangre periférica presentaran blastos en etapas tardías (66). Dependiendo del grado de infiltración se observara una elevación en los valores de deshidrogenasa láctica y ácido úrico (debido al aumento del catabolismo de las purinas). La hipercalcemia nos puede reflejar una infiltración en hueso (38).

La radiografía de tórax permite detectar crecimiento del timo y/o de ganglios, en el 30 a 50% de los casos se revelan masas mediastínicas en pacientes con LLA de células T. Las lesiones óseas pueden ser mínimas o inespecíficas en la etapa inicial y solo en un 50% de los pacientes con LLA en etapa avanzada se pueden observar anomalías óseas como osteolisis u osteopenia (65,38). El procedimiento diagnóstico por excelencia sigue siendo el aspirado de médula ósea en la cual se realizarán estudios morfológicos de las células de médula. Sin embargo, si se utiliza la morfología como medio único para el proceso de clasificación de la LLA existe un margen de error diagnóstico y de tratamiento de casi 20% de los casos (38).

2.1.9. Tratamiento contra la LLA

Al no ser considerada la leucemia como cáncer hasta mediados del siglo XIX no existen tratamientos previos y, ya que se creía que era solamente una enfermedad crónica, las terapias disponibles eran muy limitadas enfocándose al tratamiento de los síntomas no a la enfermedad. Ejemplo de ellos a sido la utilización de quinina para la fiebre, opio y morfina para la diarrea y el dolor, así como hierro para la anemia. En 1865, el médico alemán Lissauer, utilizó por primera vez una dilución de arsénico para tratar a una mujer con leucemia mieloide crónica logrando una mejora temporalmente; volviendo este el medicamento de primera línea para ciertas formas de leucemias. En 1828, Cutler y Brandford, publica los resultados de un estudio en el que muestran como el arsénico no solo disminuida considerablemente la cantidad de glóbulos blancos sino también se producía una drástica disminución de eritrocitos, perjudicando a los pacientes. En 1873 el primer caso de transfusiones sanguíneas, para el tratamiento de leucemia, es publicado por Callender en el hospital de St. Bartholomews; este procedimiento logra cierta remisión en los pacientes. El descubrimiento de los rayos X traen nuevas formas terapéuticas aunque su controversia radica en producir efectos similares a aquellos tratamientos con arsénico (14,18).

A mediados del siglo XX se comienza a utilizar como tratamiento para las leucemias folatos y sus antagonistas. En 1947, Farber y colaboradores utilizan un antagonista de amnopterin al darse cuenta que posiblemente el folato acelera la leucemia linfoblástica aguda en niños (67). De esta forma comienzan las investigaciones de nuevos fármacos que brinde a los pacientes un mejor pronóstico. Hoy en día, los tratamientos de la LLA, es una combinación de fármacos en regímenes de secuencia específicos con los objetivos de reconstruir la hematopoyesis normal, prevenir la aparición de sub-clonas resistentes, proporcionar la profilaxis adecuada y eliminar la enfermedad mínima residual. Para poder cumplir con estos objetivos la planificación de los tratamientos dependerá del grupo de riesgo. De acuerdo al *National Cancer Institute* la clasificación de estos grupos es la siguiente:

- Un riesgo bajo o estándar implica un paciente que fue diagnosticado entre las edades de uno a diez años de edad con un recuento de leucocitario de inferior a 50.000/ μ l.
- Riesgo alto comprende a aquellos pacientes diagnosticados antes del año o después de los 10 años con recuento leucocitarios superior a los 50.000/ μ l en el momento del diagnóstico.

Los esquemas de tratamiento para pacientes pediátricos con LLA se dividen usualmente en etapas: Inducción a la remisión, tratamiento post-remisión o consolidación, terapia de mantenimiento o continuación y profilaxis del SNC. La de esta terapia varía entre 24 a 36 semanas, con la excepción de pacientes diagnosticados con LLA de estirpe B que son tratados con un régimen más intenso pero con un periodo menor de 6 a 8 semanas. Los pacientes clasificados como riesgo estándar o las niñas diagnosticadas con este padecimiento pueden tener una duración más corta. (43,68).

2.1.9.1. Quimioterapia

El primer paso en la quimioterapia será el régimen de inducción, el cual tiene como objetivo la eliminación de las células neoplásicas del organismo.

Convencionalmente este régimen incluye tres fármacos (vincristina, prednisona/dexametasona y L-asparaginasa) además de terapia intratecal (IT, tratamiento que consiste en la administración de fármacos entre las capas delgadas de tejido que cubren el cerebro y la médula espinal (69), esta combinación ha mostrado una tasa de remisión del 95% (43,70).

Esta fase está dirigida a inducir la remisión, la cual se caracteriza por la resolución de los hallazgos anormales relacionados con la enfermedad, es decir, los valores en sangre periférica deberán retornar a la normalidad y el examen de médula ósea al microscopio presenta menos del 5% de linfoblastos (68). En pacientes considerados de alto riesgo, un régimen de inducción más intenso (con 4 ó 5 agentes farmacológicos) da un mejor resultado de supervivencia libre de eventos; y los pacientes de "alto riesgo" generalmente reciben terapia de inducción que incluye una antraciclina además de la vincristina, prednisona/dexametasona y L-asparaginasa. Debido a las probabilidades de que ocurra un incremento en la toxicidad cuando se añade una antraciclina a una terapia de inducción de 3 fármacos, la mayoría de los centros tratan a sus pacientes promedios o de bajo riesgo con prednisona/dexametasona, vincristina and L-asparaginasa y reservan el uso de los regímenes de inducción que usan 4 o más agentes para paciente de mayor riesgo.

La dexametasona debe emplearse con cuidado en aquellos pacientes que reciben terapia de inducción intensiva (de más de 3 fármacos) ya que su uso parece aumentar la frecuencia y severidad de complicaciones infecciosas. Existen varias formas de L-asparaginasa disponibles para usarse en el tratamiento de los niños con LLA pero también se puede utilizar la pegaspargasa como alternativa de la L-asparaginasa en la que la enzima *E. coli* está modificada por el adjunto covalente glicol polietileno. La pegaspargasa tiene una vida media sérica mucho más larga que la L-asparaginasa *E. coli* nativa, lo cual le permite propiciar una reducción de la asparagina con una administración menos frecuente. Una dosis única intramuscular de pegaspargase administrada conjuntamente con vincristina y prednisona durante la terapia de inducción, parece tener una actividad y

toxicidad similar a la de 9 dosis de L- asparaginasa E. coli intramuscular (3 veces a la semana por 3 semanas). En general, los pacientes lograrán una remisión completa en las primeras 4 semanas. Los pacientes que requieren más de 4 semanas para lograr una remisión tienen un pronóstico precario. El resultado también es menos favorable para los pacientes que muestran más del 25% de blastos en la médula ósea o blastos persistentes en la sangre periférica después de 1 semana de terapia de inducción intensiva (43,69).

2.1.9.2. Tratamiento tras la remisión

Para reducir aún más la cantidad de células malignas en sangre, se lleva a cabo un tratamiento tras la remisión con el fin de evitar las recaídas. Esto suele darse en dos fases:

-Consolidación o intensificación

Este comenzara inmediatamente después de la inducción y su objetivo es asegurarse que la remisión de la leucemia ha sido completa, es decir, se busca eliminar las células leucémicas que no fueron suprimidas por la quimioterapia de inducción, también incluye la profilaxis del SNC (70). La terapia de consolidación consistirá en la introducción de fármacos nuevos sin resistencia cruzada. Los fármacos utilizados con mayor frecuencia son hidrocortisona, citosina arabinosido, antraciclinas, metotrexato, ciclofosfamida y epipodofilotoxina. Los fármacos utilizados durante el periodo de inducción pueden administrarse de nuevo durante esta etapa en forma de ciclos en los cuales se alternan con nuevas combinación. Otra estrategia de tratamiento en esta etapa, llamada intensificación retardada, es la administración de uno o dos ciclos de tratamiento agresivo con varios fármacos durante 4 a 6 meses después de la inducción a remisión (68,70).

-Mantenimiento o continuación

Después de los 6 a 12 meses de duración del tratamiento de consolidación seguirá la etapa de mantenimiento por un periodo de 18 a 24 meses. Comúnmente consistirá en la administración diaria de 6-mercaptopurina (V.O.) y

dosis semanal de metotrexato (V.O o I.M.), con periodos en los que se incorpora fármacos como vincristina y un glucocorticoide (68).

2.1.9.3. Trasplante de medula ósea

El trasplante de células madre hematopoyéticas puede ser de tipo autógeno o alogénico, el primero es utilizado como estrategia de rescate tras la administración de dosis elevadas de radioterapia o quimioterapia las cuales resultan ser extremadamente toxicas para los pacientes pediátricos con alguna leucemia. Mientras que el trasplante alogénico se usa como parte del tratamiento del paciente leucémico cuando este se considera de alto riesgo o sufre recaídas, indicios de un desenlace desfavorable. En estos casos se ha visto un aumento en supervivencia en aquellos pacientes que fueron sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) (71,72).

Para ser sometidos a este proceso, los pacientes, deben cumplir con ciertos factores:

- No haber alcanzado la remisión tras el tratamiento de inducción.
- Una vez concluido el periodo de consolidación presentar una persistencia en la enfermedad mínima residual.
- Hipodiploidia extrema.
- Menores de 6 meses, reordenamiento MLL e hiperleucocitosis.
- Recaída medular precoz (previa a 6 meses).
- Recaída combinada o extramedular en los 18 primeros meses desde el diagnóstico (71).

La LLA es la indicación más frecuente para trasplante de células madre hematopoyéticas en la infancia. El resultado de estos trasplantes dependerá de diversos factores tanto del donador, de la enfermedad y del paciente. Los pacientes con LLA trasplantados en la primera remisión tienen una probabilidad del 60-70% de supervivencia a largo plazo sin complicaciones, mientras que aquellos trasplantados en etapas posteriores tendrán resultados inferiores (72).

2.1.9.3.1. Clasificación y régimen de los trasplantes de células madre hematopoyéticas

Tradicionalmente se ha utilizado la médula ósea como fuente de células hematopoyéticas progenitoras, sin embargo no es la única fuente disponible. En sangre periférica se logró obtener células madre hematopoyéticas movilizadas con factores de crecimiento y en cordón umbilical progenitores hematopoyéticos. Otra fuente común son los hermanos con antígeno leucocitario humano compatibles. Estas fuentes son las que han tenido un mayor éxito, pero la dificultad de obtención de estas fuentes ha llevado a emplear nuevos métodos, como voluntarios o donantes de sangre de cordón umbilical no emparentados y familiares haploidenticos (72).

2.1.9.4. Profilaxis del sistema nervioso central

Es importante establecer una inducción temprana a la profilaxis del Sistema Nervioso Central (SNC) para lograr evitar recaídas y reducir la neurotoxicidad. Los medicamentos que se administran de forma sistémica como la dexametasona, L-asparaginasa, metotrexato de alta dosis, y el Ara-C de alta dosis podrían proveer cierto grado de protección al SNC. Esta terapia se comienza al inicio de la inducción y se continúa durante todo el periodo de tratamiento (72). La quimioterapia intratecal podría ser la única forma de terapia presintomática del SNC, o podría combinarse con una sistémica moderada a infusiones de alta dosis de metotrexato con leucovorina de rescate y/o radiación craneal., esta última se usa solamente en los casos con infiltración meníngea inicial o cuando ocurre recaída meníngea durante el tratamiento (43,73).

Los pacientes con t(4;11) generalmente presentan durante la infancia un conteo leucocitario alto y están más propensos que otros niños con LLA a desarrollar enfermedad del SNC y responder precariamente a la terapia inicial. Si bien tanto los adultos como los niños menores de 2 años con presencia de t(4;11) corren un riesgo alto de no responder al tratamiento. Por ello la importancia de una profilaxis adecuada al SNC. Estudios han revelado como la combinación de una

terapia sistémica apropiada y la quimioterapia IT disminuye las probabilidades de recaídas, 5% menos en niños con riesgo estándar de LLA. Ya sea que los pacientes con alto riesgo de sufrir una recaída del SNC (por ejemplo, una edad mayor o igual a 10 años, presencia de hiperleucocitosis o LLA de células T) continúen requiriendo irradiación craneal además de terapia intratecal prolongada, resulta polémico, aunque los pacientes que han sido designados como de alto riesgo, generalmente reciben radiación craneal como parte de la terapia santuario del SNC.

Sin embargo, los pacientes de alto riesgo, con una respuesta temprana rápida, parecen tener una profilaxis del SNC adecuada, solo con la terapia intratecal. Los niños con LLA que presentan enfermedad del SNC al momento del diagnóstico (definido como mayor o igual a 5 glóbulos blancos por mm^3 en el líquido cerebroespinal con presencia de linfoblastos) generalmente reciben radiación craneal con o sin radiación espinal concurrente, además de la quimioterapia sistémica e intratecal apropiada.

2.1.9.5. Radioterapia

La radioterapia es el uso de radiación, comúnmente ionizante, para la destrucción de células cancerosas. Funciona al causar daño en los genes que controlan el crecimiento y división celular (26), es decir, la radiación eliminara primero aquellas células que estén en división activa. La radioterapia comenzó a ser utilizada en patologías infantiles en la década de los 50 (74) pero en la actualidad el tratamiento con radioterapia ha disminuido, solo se utiliza la irradiación craneal para la prevención de recaídas en pacientes que llenen las características (75) o aquellos con infiltración en el SNC al diagnóstico. En los protocolos modernos solo del 2 al 20% de los pacientes con LLA reciben tratamiento profiláctico holocraneal. La irradiación craneo espinal ha dejado de utilizarse por la inclusión del Metrotrexate intratecal y sistémico a altas dosis.

2.1.10. Toxicidad de la terapia contra la LLA

Los efectos tóxicos de la terapia dirigida al SNC para el tratamiento de LLA infantil, se puede dividir en aguda-subaguda y crónica. En la toxicidad aguda-subaguda presentaran convulsiones, derrames, somnolencia y parálisis ascendente. El grupo de aquellos con toxicidad crónica se caracteriza por la presencia de leucoencefalopatía y una variedad de trastornos conductuales, neuropsicológicos y neuroendocrinos. Cuando las dosis de irradiación craneal sobrepasan 1800 cGy los pacientes presentan un riesgo significativo de presentar una secuela de trastornos neurocognitivos y neuroendocrinos, mientras que aquellos que recibieron 1800 cGy de irradiación craneal, corrieron un riesgo menor de toxicidad neurológica que aquellos que recibieron 2400 cGy, aunque se ha observado 16 efectos neurocognitivos y neuroendocrinos durante esta dosis bajas. Los niños más jóvenes (por ejemplo, menores de cuatro años) corren un mayor riesgo de disminución neurocognitiva, y otras secuelas después de someterse a radiación craneal. Parece ser que las niñas corren un riesgo mayor que los niños de presentar una secuela de trastornos neuropsicológicos y neuroendocrinos inducidos por la radiación (43,72).

En general, no se recomienda la administración de altas dosis de metotrexato después de la radiación craneal. La toxicidad más frecuente relacionada con la terapia intratecal, en ausencia de radiación craneal, suele ser convulsiones. Aproximadamente del 5% al 10% de los pacientes con LLA presentarán al menos una convulsión durante la terapia. A los pacientes con LLA que desarrollan convulsiones en el transcurso del tratamiento y que requieren de tratamiento anticonvulsivo, no se les recomienda el uso de fenobarbital o dilantin como tratamiento anticonvulsivo, ya que estos fármacos podrían aumentar la eliminación del sistema, de algunos fármacos quimioterapéuticos. El ácido valproíco o la gabapentina constituyen anticonvulsivos alternativos con menos capacidad de inducción enzimática. Los pacientes que reciben terapia intratecal sin radiación craneal como profilaxis del SNC, parecen presentar una baja

incidencia de secuela neurocognitiva, y el déficit que surge, representa disminuciones relativamente modestas. Sin embargo, los regímenes que utilizan un horario quincenal de 12 dosis de metotrexato intravenoso de alta dosis con rescate de leucovorina y quimioterapia intratecal durante la semana libre, ha sido relacionado con toxicidad neurológica excesiva (43).

2.1.10.1. Farmacogenética

Los factores genéticos en la disposición y respuesta a fármacos hacen que se encuentre una gran variación en la farmacocinética y respuestas terapéuticas entre cada paciente haciendo que las quimioterapia habituales varían su efectividad de paciente a paciente, no logrando los efectos deseados en grupos poblacionales importante. Estas variaciones en los genes humanos nos han llevado a buscar nuevas terapias, la individualización del tratamiento o medicina personalizada, la cual consiste en identificar el fármaco adecuado para el paciente correcto (72,76). La administración de fármacos enfocados a la variabilidad génica ha tomado un lugar importante en la investigación clínica, ya que nos permite tener las bases moleculares de la absorción, resistencia y toxicidad de un fármaco (76). Recientes estudios han mostrado que estos factores son determinados, en su mayor parte, por complejos enzimas encargados de la biotransformación y eliminación de fármacos antineoplásicos, los cuales pueden presentar polimorfismo génico que influye sobre la efectividad de la terapéutica. Estos factores son los que estudia la farmacogenética y farmacogenómica.

2.1.10.2. Terapia intratecal

Este tipo de tratamiento es de mucha ayuda con la profilaxis del SNC y consiste en la administración de fármacos anticancerígenos al espacio intratecal, líquido que rodea el cerebro y medula espinal, llamado líquido cerebroespinal (CSF). Este método puede ser administrado de dos formas, la primera consiste en administrar los medicamentos dentro del reservorio de Ommaya (un aparato en

forma de cúpula que se ubica bajo el cuero cabelludo mediante una cirugía; el mismo contiene los medicamentos que circularán a través de un tubo pequeño hacia el cerebro). La otra forma consiste en inyectar los medicamentos directamente en el LCR en la parte inferior de la columna vertebral, después que se adormece una pequeña área en la parte inferior de la espalda (69).

2.1.12. Cultivo Celular

El desarrollo de los cultivos celulares nos ha permitido grandes avances en la ciencia moderna, desde el primer cultivo obtenido de células cancerosas, las células HeLa, se observó la propiedad de inmortalidad de este tipo de líneas celulares (continua reproducción sin pasar por un proceso apoptótico) lo que permite su mantenimiento *in vitro* y, por lo tanto, el estudio de sus funciones y propiedades similares a aquellas *in vivo*. Actualmente el cultivo celular se comprende como un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológica, bioquímicas y genéticas. En las investigaciones actuales los cultivos celulares son muy utilizados debido a la obtención de grandes cantidades de líneas celulares, la mayoría de los cultivos contienen un solo tipo de células, permiten el estudio de diversas actividades celulares, se puede estudiar la respuesta a fármacos, hormonas factores de crecimiento y otros sustratos en los cultivos celulares, etc (13).

Existen diversos tipos de cultivos celulares, el cultivo primario es un preparado directo a partir de un tejido u órgano, las células se mantienen con vida conservando sus características originales y su proliferación es limitada posteriormente pueden ser removidas para formar un cultivo secundario. En los cultivos secundarios las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie formando una monocapa, este contacto detiene temporalmente su proliferación hasta ser traspasadas a recipientes con medios frescos, estos pasos pueden continuar por semanas o meses. Sin embargo, la mayoría de las células de vertebrados tiene un número limitado de divisiones en cultivo, esto puede ser el

resultado del acortamiento progresivo de los telómeros durante la replicación de ADN o como consecuencia de mecanismos denominados “puntos de control” del ciclo celular. La inmortalización de las células puede darse introduciendo oncogenes que alteren los puntos de control o genes para codificar la telomerasa, obteniendo líneas celulares conocidos también como cultivos continuos (13).

2.2. Justificación y uso de los resultados

Durante los últimos años se han desarrollado grandes avances en la investigación y tratamiento de las leucemias en México, a pesar de ello, según los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (1) aún representa la primera causa de mortalidad infantil en el país, 18 de cada 100 casos de morbilidad hospitalaria en México son causados por tumores malignos en los órganos hematopoyéticos de los cuales la leucemia aguda se presenta con mayor frecuencia en niños menores de 15 años (2,77,78) ocupa alrededor del 35% de todos los casos de neoplasias malignas. El diagnóstico molecular y la estandarización de tratamientos han dado como resultado una supervivencia del 75-80% en LLA en países desarrollados (79,80,81,82). Son diferentes los factores que han hecho posible alcanzar estos porcentajes de supervivencia, entre ellos, las investigaciones realizadas a las diferentes translocaciones, el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, la creación de grupos multidisciplinarios en atención primaria, clasificación de pacientes en grupos de riesgo, supervisión del tratamiento, introducción del trasplante y la mejora continua en las transfusiones sanguíneas. Una de las principales causas de la alta mortalidad de niños con LLA es el diagnóstico molecular aún es limitada, por lo que no es posible establecer el pronóstico del padecimiento con base a las alteraciones genéticas. Para disminuir la tasa de mortalidad en niños con LLA en el Estado de Baja California, se realizó este proyecto de investigación, para estandarizar pruebas moleculares para su diagnóstico en la búsqueda de marcadores genéticos (oncogenes) asociados al pronóstico y además determinar las implicaciones clínicas del padecimiento, para contribuir en el desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento que permitan establecer terapias más adecuadas e individualizadas y aumentar la calidad de vida de los pacientes pediátricos con LLA.

2.3. Pregunta de investigación

¿Cuál es la prevalencia de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL, E2A-PBX1 presentes en niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda (LLA) del estado de Baja California?

2.3. Objetivos de investigación

2.3.1. Objetivo general

Obtener la prevalencia de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL, E2A-PBX1 presentes en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños de Baja California.

2.3.2. Objetivos específicos

- Identificar la frecuencia de las alteraciones moleculares *BCR-ABL*, *TEL-AML*, *Fusiones MLL* y *E2A-PBX1* en niños con diagnóstico de LLA de Baja California.
- Identificar los puntos de fusión de las translocaciones t(9;22), t(12;21), t(4;11) y t(1;19) en pacientes pediátricos de Baja California con diagnóstico de LLA.
- Relacionar las translocaciones moleculares con factores de riesgo de LLA.

CAPÍTULO III.

3.1. Población

Nuestra población de estudio será referida por los médicos que colaboran con el Centro Oncológico Pediátrico de Baja California en donde acuden niños de escasos recursos con limitado acceso a los servicios de salud, afiliados al Seguro Popular (organización que se encarga de la provisión de los servicios de salud a la población beneficiaria del Sistema de Protección Social en Salud de México) con el fin de garantizar la cobertura de su tratamiento. El grupo de edad con mayor incidencia de leucemia en México se encuentra entre los 5 y 9(37.8%) años de edad, seguido por los niños menores de 5 años (26.5%), entre la edad de 10 a 14 años representa el 21.5% (1). Por ello, en nuestra muestra de estudio se tomó el mayor margen posible, entre la población con la más alta incidencia, lo que nos deja con un grupo de edad de 0 a 17 años, cumpliendo los siguientes criterios.

- **Criterios de inclusión:**

Pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de LLA que se encuentren entre las edades de 0 a 17 años, con consentimiento de sus padres o tutores.

- **Criterios de exclusión:**

Pacientes pediátricos con alguna clase de tratamiento que disminuya la concentración de glóbulos blancos en sangre y pacientes mayores de 17 años.

- **Criterios de eliminación:**

Pacientes diagnosticados con LLA entre las edades de 0 a 17 años sin consentimiento firmado del padre o tutor, así como a los pacientes a los cuales no se les haya podido realizar la toma de muestra y los pacientes pediátricos diagnosticados con LLA que ya estén bajo tratamiento médico.

3.1.1. Diseño del estudio

Este estudio es de tipo descriptivo transversal observacional, ya que se procesó una sola muestra de los pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de LLA y no se realizara un seguimiento posterior. El tamaño de la muestra fue calculado considerando una población en Baja California de al redor de 900,000

niños entre las edades de 0 a 14 años (83) y una incidencia de la enfermedad de 44 casos por cada millón por año (2); el nivel de confianza es de 0.05 ($z=1.96$) y un error muestral de 0.03, lo que nos revela una muestra de 40 casos. El estudio incluyó a todos los pacientes de 0 a 17 años recién diagnosticados con LLA remitidos entre las fechas de septiembre del 2011 a junio del 2014, sin tratamiento médico. Los casos recolectados fueron de 85 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. Para el análisis estadístico de las biometrías hemáticas se descartaron pacientes al no tener la información en el momento del diagnóstico, quedándose con 49 pacientes.

3.1.2. Variables

Las variables consisten en la caracterización molecular de los oncogenes BCR-ABL, TEL-AML, MLL-AF4 y E2A-PBX1, estos son los resultados de los puntos de fusión formados cuando parte de dos cromosomas que se rompen y cambian de posición formando las translocaciones correspondientes (Tabla 4).

Tabla 4. Variables de la caracterización molecular de los oncogenes.

Variable	Definición	Oncogén
Caracterización molecular del oncogén BCR-ABL.	El gen ABL del cromosoma 9 se une al gen BCR del cromosoma 22 para formar el gen de fusión BCR-ABL.	Fusiones BCR-ABL t(9:22).
Caracterización molecular del oncogén TEL-AML.	El gen TEL del cromosoma 12 y el gen AML1 del cromosoma 21, originando el transcrito de fusión TEL/AML1.	Fusiones TEL-AML t(12:22).
Caracterización molecular del oncogén MLL-AF4.	Los cromosomas 4 y 11 originan el transcrito de fusión t(4:11)	Fusiones MLL- AF4 t(4:11).
Caracterización molecular del oncogén E2A-PBX1.	Fusión entre el gen E2A en el cromosoma 19 y el genPBX1 en el cromosoma 1.	Fusiones E2A-PBX1 t(1:19).

Representación de los genes y cromosomas involucrados en las alteraciones génicas.

Tabla 5. Operacionalización de las variables.

Variable	Tipo de variable	Operacionalización	Categorización
Edad	Cualitativa nominal	Años cumplidos al inicio del ensayo.	0 año, 1 año, 2 años, 3 años....17 Años.
Sexo	Cualitativa dicotómica	Genero biológico que pertenezca.	Femenino y Masculino.
Oncogenes	Cualitativa nominal	Variante de los oncogenes que se determine por la técnica de RT-PCR	Fusiones: -BCR-ABL t(9:22). - TEL-AML t(12:22). -MLL- AF4 t(4:11). -E2A-PBX1 t(1:19).

VARIABLES UTILIZADAS EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

El análisis molecular se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina y Psicología en el Laboratorio 3 de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Tijuana. Los lineamientos están diseñados de acuerdo a normas vigentes que regulan este tipo de procedimientos. Para resguardar la confidencialidad del paciente se utilizó un sistema que consiste en identificar al paciente por un número consecutivo seguido de las iniciales de sus apellidos con el fin de resguardar la identidad de los sujetos de estudio.

3.2. Metodología

3.2.1. Obtención de la muestra

La toma de la muestra sanguínea o de medula ósea, se realizó en un lugar perfectamente iluminado, privado y sin tránsito de personas para evitarles estrés a los niños en el Centro Oncológico Pediátrico de B.C. Se localiza una vena adecuada en el brazo y se desinfecta el área con un algodón humedecido con alcohol al 70%, se coloca el torniquete, y posteriormente se realiza la punción y se introduce la aguja con el bisel hacia arriba. Al empezar a fluir la sangre se retira el torniquete y una vez que se haya obtenido la cantidad de sangre requerida, se retira la aguja y se coloca una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia. En la toma de muestra se utilizan tubos con EDTA (anticoagulante). Las muestras se identifican con un número clave de identificación, número del perro, lugar de procedencia (clave del estado),

fecha (día/mes/año) y hora (hora/minutos) de toma de muestra. Las muestras no deben estar hemolisadas para su aceptación. Se evita el calentamiento o enfriamiento excesivos ya que dejarían de ser útiles y se habría que tomar una nueva muestra.

3.2.2. Transporte de la muestra

Las formas y procedimientos de embalaje, transporte y disposición final del material utilizado y desechos de material biológico en los procesos del análisis del estudio se elabora tomando como referencia los siguientes documentos y normas oficiales mexicanas.

1. Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos de la OMS-División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Transmisibles, Ginebra, 1997.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Las muestras utilizadas fueron de sangre total con un volumen aproximado de 5ml utilizando como anticoagulante EDTA, tomadas por personal calificado en las instituciones donde fueron diagnosticados los pacientes.

3.2.3. Obtención de linfocitos

La obtención de los linfocitos se realizó mediante el lisado de los eritrocitos con cloruro de amonio 0.16M (NH_4Cl), el cual fue preparado utilizando agua estéril y desionizada, posteriormente fue pasado por filtros de 0.2 μm con la finalidad de eliminar cualquier posible contaminación. La separación se realizó utilizando un

volumen de sangre total entre 2-4 ml al cual se le agrego 10 ml de NH_4Cl , obteniendo la lisis de los eritrocitos después de 10 minutos de mezclar suavemente las muestras. Posteriormente se centrifugaron a 1000rpm/min por 10 minutos. Se decanta el lisado y los linfocitos se resuspenden en PBS 1x pH 7.4. Se repite este último paso hasta logra la eliminación completa del lisado eritrocitario. Los linfocitos quedan listos para la extracción de ARN, pueden ser guardados a -20°C en espera del proceso de extracción.

3.2.4. Cultivo celular

Las líneas celulares, que fueron utilizadas como controles positivos (Tabla 6), fueron adquiridas de ATCC® (American Type Culture Collection) y consisten en una población de células linfoides inmortalizadas originarias de medula ósea. Las líneas inmortalizadas utilizadas deben ser suspendidas en medios nutritivos, el medio necesario es RPMI compuesto por sales inorgánicas, aminoácidos, Vitaminas, glucosa, glutatión y rojo de fenol (permite observar cambios de pH). Para evitar la contaminación de las células en cultivo se utilizaron antimicóticos y antibióticos al 1%.

Recibidas en criotubos en congelación con CO_2 solido (hielo seco) antes de comenzar el proceso fue necesario realizar la limpieza y desinfección de toda el área de trabajo, incluyendo la campana de flujo laminar, utilizando una combinación de productos, peróxido de hidrogeno al 3%, por ser altamente oxidante tiene un efecto germicida, y una solución acuosa de alcohol al 70% de alcohol (etanol o isopropanol), esta concentración es utilizada debido a que el efecto desnaturalizante solo se logra en soluciones acuosas. La combinación de estas dos sustancias como método de desinfección permite lograr la eliminación de las formas vegetativas de bacterias, hongos y virus. Enseguida se irradia con luz UV por 15 minutos con el objetivo de esterilizar toda la superficie de trabajo (el material que no es desechable también es sometido a un procedimiento similar antes de entrar al campo estéril de la camp) (84). Una vez concluido el proceso de desinfección y preparación del material, los criotubos que contiene las líneas celulares fueron introducidos a un baño maría de 37°C hasta lograr su

descongelación. Posteriormente son agregados a un tubo Falcón de 15ml con 10 ml de medio RPMI 1640 atemperado, en seguida serán centrifugados por 10 minutos a no más de 700 rpm, con el fin de evitar el estrés celular. El sobrenadante es decantado y el paquete celular se resuspende en 1ml de medio de cultivo. La suspensión es transferida a un frasco T25 con 6 ml de medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10% y colocada en una incubadora a 37°C en un ambiente al 5% de CO₂, hasta obtener la confluencia de alrededor del 70%.

Al tener líneas celulares que se mantienen en suspensión en su medio, no formando monocapa, no fue necesario utilizar tripsina para lograr la separación de las células. El medio con las células fue transferido a un tubo Faltocon de 15 ml y centrifugado a 1000 rpm durante 8 minutos, El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspende nuevamente en 1 ml de medio de cultivo. En este punto puede amplificarse o proceder a la obtención de RNA. Cabe mencionar que la línea celular ReH establecida a partir de un paciente pediátrico con LLA pre-B, expresa el oncogén *TEL-AML1* [t(12;21)]; mientras que la células K562 derivadas de un paciente con LCM, es positiva para el oncogén *BCR-ABL* [t(9;22)]. Estas líneas celulares serán utilizadas como controles positivos para la realización de los RT-PCR.

Tabla 6. Líneas celulares utilizadas como controles positivo.

Línea celular	Procedencia	Oncogen	Translocación	Catalogo ATCC	Lote
K-562	Leucemia (CML) Humana	BCR-ABL p210	t(9;22)(q34;q11)	CCL-243	60814607
MV-4-11	Myelomonocytic Leucemia Humana	MLL-AF4	t(4;11)(q21;q23)	CRL-9591	60062233
Rs4(11)	Leucemia Humana	MLL-AF4	t(4;11)(q21;q23)	CRL-1878	57985220
ReH	Leucemia Humana	TEL-AML1	t(12;21)(p13;q22)	CRL-8286	59429141

Células utilizadas como controles positivos para las diferentes aberraciones génicas.

3.2.5. Obtención de RNA

La ruptura de los linfocitos se realizó utilizando el reactivo *TRI-REAGENT* (SIGMA) (85). Se mezcló 100 µL de leucocitos en PBS 1X con el doble de volumen de *TRI-REAGENT* y 100 µL de cloroformo. Mezclar vigorosamente por 15 segundos en vortex posteriormente se dejan reposar por 10 minutos en hielo. Tras la centrifugación a 14000 r.p.m. por 15 minutos a 6°C, se separaron las dos fases (DNA y proteínas) de la fase acuosa superficial y el RNA se recuperó por precipitación con 500 µL de isopropanol a 4°C mezclando en vortex seguido de un reposo de 10 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifugo a 15 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se remueve el sobrenadante cuidando de no desechar el pellet. El material resultante se lavará con 200 µL de etanol y se dejara reposar a -20°C, seguido de esto se centrifugo a 7500 rpm por 10 minutos a 6°C, se decantó y se dejó secar el etanol, sin permitir que el pellet se seque por completo, resuspender el material en 40 µL de H₂O-DEPC. El material purificado queda listo para ser almacenado a -20°C hasta su uso.

3.2.6. Obtención de cDNA por la técnica de Transcripción reversa

La obtención de cDNA a partir del RNA purificado de linfocitos se elaboró mediante reacciones de RT (transcripción reversa de RNA). La mezcla de reacción debía presentar 0.5 µg del oligonucleótido complementario al extremo 3' y 1 µg de RNA en 5µL tampón de la enzima, 125 mM MgCl₂, 25 mM dNTP y 20 mM DTT. Esta mezcla se calentará a 65 °C durante 10 min y después se añadirá 1.1 µL de la enzima *SuperScript III* (200u/µl) (Invitrogen) y se incubará a 55 °C durante 30 min. Posteriormente, la reacción se detuvo mediante incubación a 85 °C durante 5 min. El material amplificado queda listo para ser almacenado a -20°C hasta su uso. En la tabla 7 se muestra las secuencias de *primers* utilizados para las diferentes aberraciones génicas.

Tabla 7. Secuencia de *primers* para los rearrreglos génicos.

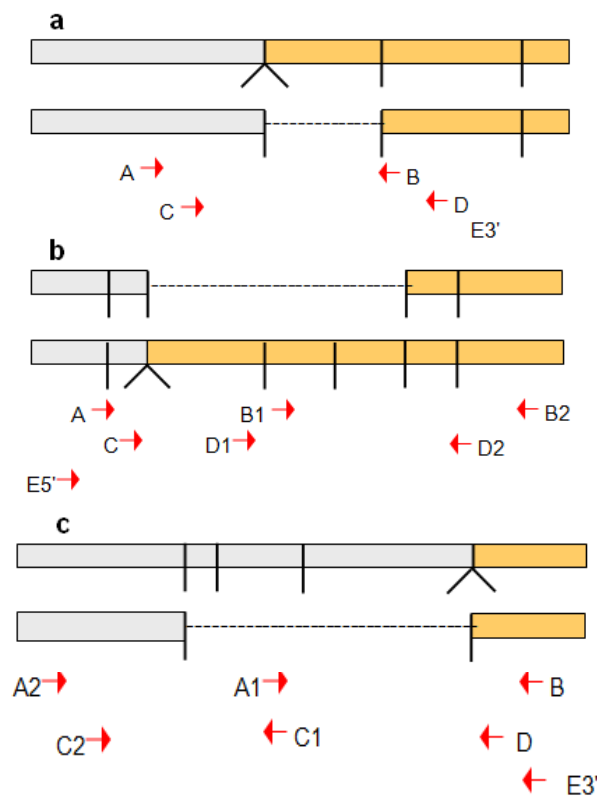
Transcripción	Rearreglo génico	Código del primer	Secuencia 5' –3'
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	E2A-A	CACCAGCCTCATGCACAAC
		PBX-B	TCGCAGGAGATTCATCACG
		E2A-C	CACCCTCCCTGACCTGTCT
		PBX-D	GGCCTGCTCGTATTTCTCC
		PBX-3'	TGAACTTGCGGTGGATGAT
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	MLL-A	CCGCCTCAGCCACCTAC
		AF4-B	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG
		MLL-C	AGGACCGCCAAGAAAAGA
		AF4-D	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG
		MLL-E5'	AAGCCCGTCGAGGAAAAG
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABLp190	BCR-e1-A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC
		ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC
		BCR-e1-C	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC
		ABL-a3-D	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA
		ABL-a3-e3'	TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABLp210	BCR-b1-A	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC
		ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC
		BCR-b2-C	CAGATGCTGACCAACTCGTGT
		ABL-a3-D	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA
		ABL-a3-e3'	TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	TEL-A	TGCACCCTCTGATCCTGAAC
		AML1-B	AACGCCTCGCTCATCTTGC
		TEL-C	AAGCCCATCAACCTCTCTCATC
		AML1-D	TGGAAGGCGGCGTGAAGC
		TEL-E5'	CGCACCAGGAGAACAACCAC

Secuencias de nucleótidos en cada *primer* utilizados en la PCR para los diferentes rearrreglos génicos.

En todos los casos el proceso de amplificación de las translocaciones consistió en una primer PCR utilizando un par de *primers* denominados A y B, específicos para cada translocación estudiada. Los resultados positivos fueron confirmados con una segunda PCR, utilizando un juego alternativo de primers (llamados C y E3' ó E5' y D) (Figura 1). La realización de una segunda PCR confirmatoria tiene como objetivo aumentar la especificidad de la detección y disminuir la posibilidad de resultados falsos positivos. Ambas PCR se realizaron utilizando como sustrato ADNc y las condiciones de reacción ya descritas se incluyeron en todos los casos controles positivos para la translocación en estudio y dos controles negativos (agua y ADNc de donantes sanos). El análisis de los resultados se realizó por electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1.8%, con tinción con Bromuro de Etidio y observación a la luz ultravioleta (UV). El peso

molecular (PM) de las bandas obtenidas fue estimado por comparación con un marcador de PM conocido. Los resultados se documentaron y archivaron en forma de fotografías digitalizadas de dichos geles. La figura 1 a continuación muestra las tres posibilidades de diseño para la detección por RT-PCR de las translocaciones del gen de fusión, que dependen de la presencia o ausencia de más de una región de ruptura de los dos genes de fusión.

Figura 1: Esquemas que muestra la posición de los primers que se utilizaron para amplificar los segmentos de cDNA por RT-PCR.



El dibujo muestra (a) El diseño de los primers amplifica los genes de fusión de dos regiones externas(A y B), dos regiones internas (C y D), y una región desplazada (primer E). (b) Si más de un punto de interrupción se produce, se diseñan los primers B y D regiones abajo del sitio de fusión. (c) Si más de un punto de interrupción en la región se produce, se diseña primers extra C regiones arriba del sitio de fusión.

3.2.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Para las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se utilizará la enzima *HotStarTaq DNA Polymerase* (QUIAgen, CA). El programa empleado para

las reacciones de amplificación varió en función de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (SIGMA) que se emplearán y el tamaño del producto de amplificación esperado (Ver tabla 8).

Tabla 8. Protocolo de PCR utilizada para cada secuencia.

Translocación	Rearreglo génico	Parámetros utilizados *		
		Tiempo	Temperatura	Ciclos
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	5 min	95 °C	35
		30 seg	94 °C	
		30 seg	65 °C	
		1 min	72 °C	
		10 min	72 °C	
		Hold	10 °C	
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	5 min	95 °C	35
		30 seg	94 °C	
		30 seg	58 °C	
		1 min	72 °C	
		10 min	72 °C	
		Hold	10 °C	
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABLp190	5 min	95 °C	35
		30 seg	94 °C	
		30 seg	59 °C	
		1 min	72 °C	
		10 min	72 °C	
		Hold	10 °C	
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABLp210	5 min	95 °C	35
		30 seg	94 °C	
		30 seg	59 °C	
		1 min	72 °C	
		10 min	72 °C	
		Hold	10 °C	
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	5 min	95 °C	35
		30 seg	94 °C	
		30 seg	65 °C	
		1 min	72 °C	
		10 min	72 °C	
		Hold	10 °C	

Los tiempos de cada fase son similares por cada par de *primers*. La temperatura de hibridación puede variar en función de la especificidad de la reacción.

*Termociclador utilizado fue el equipo MultiGeneMini

3.2.8. Electroforesis

La separación electroforética de los fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa (LMP, Invitrogen) al 1% en tampón TAE 1X (lbuffer empleado para la separación de fragmentos de DNA por electroforesis) y en presencia de 1µg/mL de bromuro de etidio (Sigma). Se utilizaron marcadores de peso molecular para DNA de 100 Y 50 pb de Roche. Se usó el equipo de laboratorio (Bio-Rad) para la separación e identificación de acuerdo al tamaño de los genes (Tabla 9). La base de la separación utilización de geles de acrilamida a una concentración determinada que permita la separación de las muestras basada en el tamaño de partícula y la capacidad de las muestras para viajar a través de los poros del gel. La separación electroforética de los fragmentos de DNA se realizará en geles de agarosa (LMP, Invitrogen) del 0.7-1% en tampón TAE y en presencia de 1µg/mL de bromuro de etidio (Sigma). Se emplearan marcadores de peso molecular para DNA de Quiagen.

Tabla 9. Tamaño (pb) de los productos obtenidos por PCR.

Rearreglo	Translocación	Secuencia pb		
E2A-PBX1	t (1;19)	A ---- B	C ---- D	C ---- E3'
		373 *+ 27 pb	289 *+ 27 pb	401 *+ 27 pb
MLL-AF4	t (4;11)	A ---- B	C ---- D	E3' ---- D
		*184 a 673	*127 a 616	*270 a 759
BCR-ABLp190	t (9 ; 22)	A ---- B	C ---- D	C ---- E3'
		521 347	381 207	445 271
BCR-ABLp210	t (9 ; 22)	A ---- B	C ---- D	C ---- E3'
		*417 a 168	*360 a 111	*424 a 175
TEL-AML1	t (12;21)	A ---- B	C ---- D	E3' ---- D
		298 * - 39 pb	181 * - 39 pb	417 * - 39 pb

Segmentos esperados en los geles de agarosa de acuerdo a sus pb, secuencias de los *primers* utilizada y oncogén.*Los tamaños de los fragmentos muestran variación en el número de pb dependiendo de oncogén.

3.2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando una hoja de cálculo de Excel donde se obtendrá una base de datos de los pacientes incluidos en el estudio, capturando: Edad, género, institución de procedencia, biometría hemática y resultados del estudio molecular. Posteriormente fueron exportados a SPSS para obtener un análisis comparativo de las variables incluidas con los datos clínicos y los resultados positivos a las aberraciones moleculares, logrando obtener la prevalencia de las aberraciones génicas en la población de los 85 pacientes en el estudio.

CAPÍTULO IV

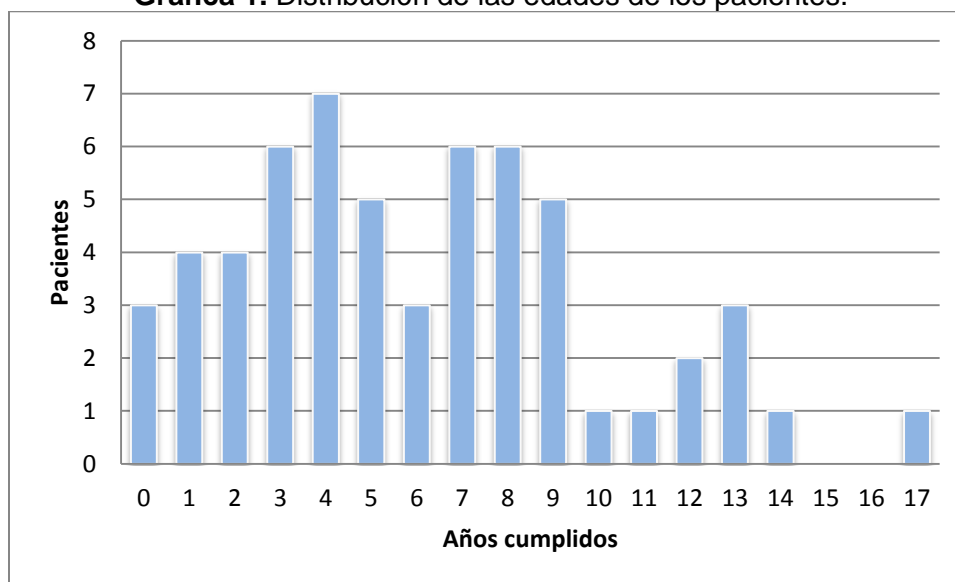
4. Resultados

La búsqueda por RT-PCR de los oncogenes moleculares BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, y TEL-AML1 se realizó en un total de 85 pacientes, los resultados obtenidos se analizaron, con sus estudios comparativos utilizando los parámetros establecidos en la sección de material y métodos: edad, género, estudios clínicos. Posteriormente se analizó la institución de procedencia y prevalencia puntual de los oncogenes y translocaciones correspondientes a aquellos pacientes positivos.

4.1. Edad

El promedio de edad del total de los pacientes pediátricos, en el momento de la caracterización molecular de las aberraciones génicas, fue de 6.07 años con una desviación estándar de 4.02. La distribución por edad, según el rango de 0 a 17, se muestra en la Gráfica 1, donde se logra observa la moda a los 4 años cumplidos, seguidos de valores de alta incidencia a los 3 y 8.

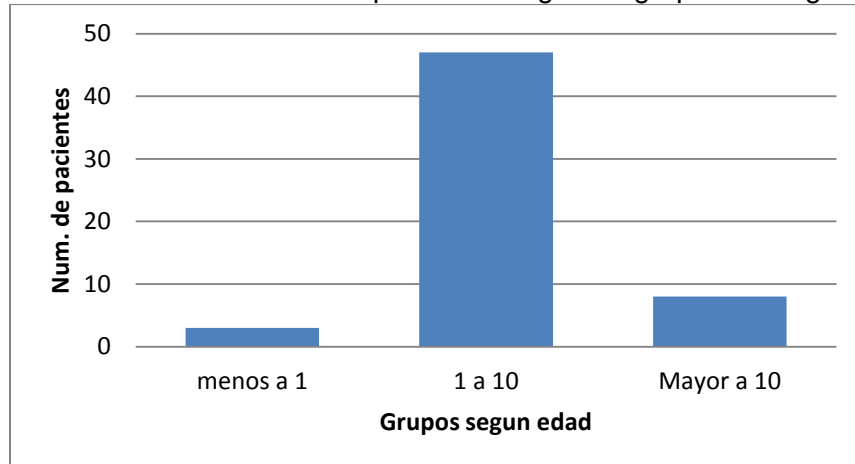
Gráfica 1. Distribución de las edades de los pacientes.



Distribución de los pacientes pediátricos de acuerdo a la edad en el momento del diagnóstico reflejando una moda a los cuatro años, mostrando una disminución después de los 9.

El análisis estadístico posterior según grupos de riesgo por edad, Gráfica 2, nos revela una distribución de 11 pacientes en los niveles de riesgos alto, que son aquellos pacientes que su diagnóstico fue antes cumplir su primer año o mayores de 10.

Gráfica 2. Gráfica de los pacientes según su grupo de riesgo

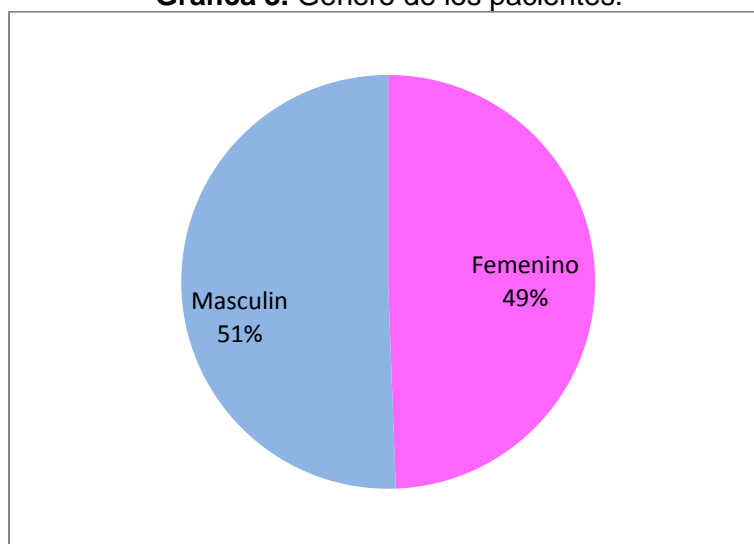


La grafica muestra la distribución de los pacientes por edades y grupos de riesgo, logrando observar un mayor número de pacientes con riesgo estándar entre las edades de 1 y 10 años. Los de riesgo elevado menor del año o mayor a 10 en el momento del diagnóstico.

4.2. Genero

Del total de 85 pacientes incluidos en el estudio 42 fueron de género femenino y 43 de masculino, lo que equivale a 49.4% y 50.6% respectivamente. Su representación gráfica se muestra en la Gráfica 3.

Gráfica 3. Genero de los pacientes.



Distribución de los pacientes pediátricos por género con una relación 1.02:1 de hombres y mujeres.

4.3. Información clínica.

De la muestra inicial de 85 pacientes 7 refieren dolor óseo, 7 fiebre y uno hipoxemia en su ficha de diagnóstico. Con respecto a los estudios de laboratorio se realizó el análisis estadístico a 49 de los 85 pacientes, ya que estos presentaban la información clínica necesaria completa (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de biometría hemática al diagnóstico en los pacientes con LLA

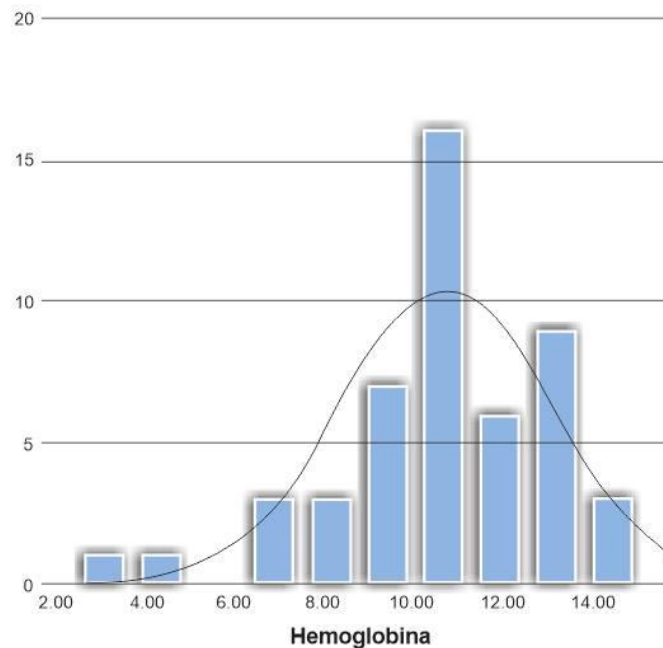
Criterios clínicos	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Std
Casos N= 49				
Numero de Leucocitos	0.30	85.60	14.6286	18.55972
Recuento de Eritrocitos	1.15	5.04	3.6151	0.80926
Hemoglobina	3.50	14.80	10.6286	2.35018
Hematocrito	9.40	44.20	31.8429	7.43788
% Neutrofilos	4.00	97.40	60.3333	25.70299
Recuento de Basofilos	0.00	.50	.0286	0.07906
Recuento de Neutrofilos	0.00	55.30	8.5939	11.25956
% Bosofilos	0.00	33.70	1.3020	4.94455
*VCM	70.10	113.10	89.1510	8.09748
Recuento de Plaquetas	4.00	491.00	186.9388	118.03096
Recuento de Eosinofilos	0.00	1.20	.0918	0.18801
% Linfocitos	2.00	87.20	25.8429	20.53291
Recuento de Linfocitos	0.20	47.80	3.8041	8.95770
Recuento de Monocitos	0.00	9.70	1.0042	1.75135
% Eosinofilos	0.00	6.20	1.0776	1.42497
% Monocitos	0.00	29.70	8.2571	7.12689

Resultados de las Biometría Hemática realizada a los 49 pacientes con LLA

4.3.1. Serie roja.

Los resultados de la biometría hemática, mostrados en la Tabla 10, revelan en la mayoría de los pacientes, valores disminuidos de hemoglobina, 29 con valores menores a 11 g/dL, con una media de 10.63 g/dL y una desviación estándar de 2.35, mostrando un máximo de 14.8 g/dL y un mínimo de 3.5 g/dL(Gráfica 4).

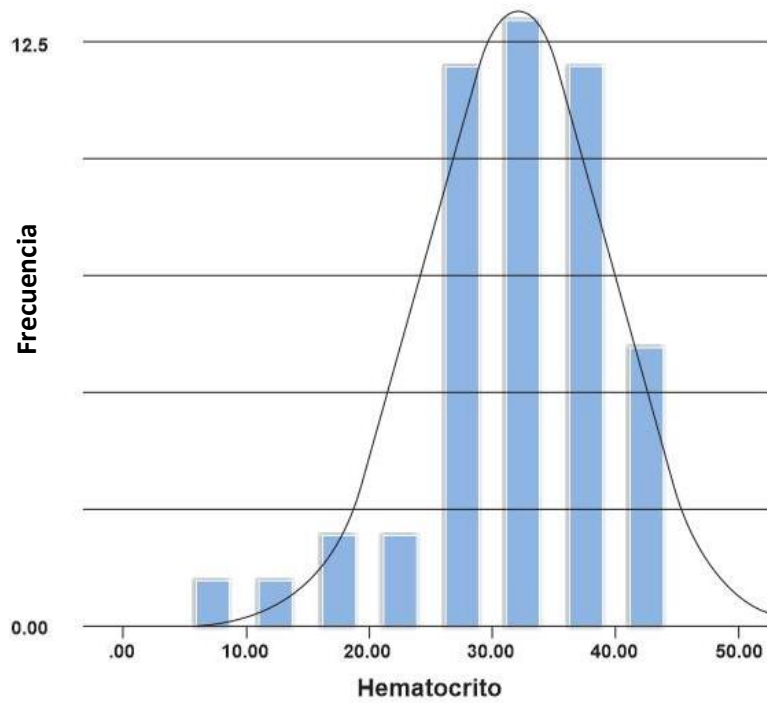
Gráfica 4. Distribución de los niveles de hemoglobina.



Valores de dispersión de concentración de hemoglobina en los pacientes con LLA mostrando una media de 10.63 g/dL y una desviación estándar de 2.35.

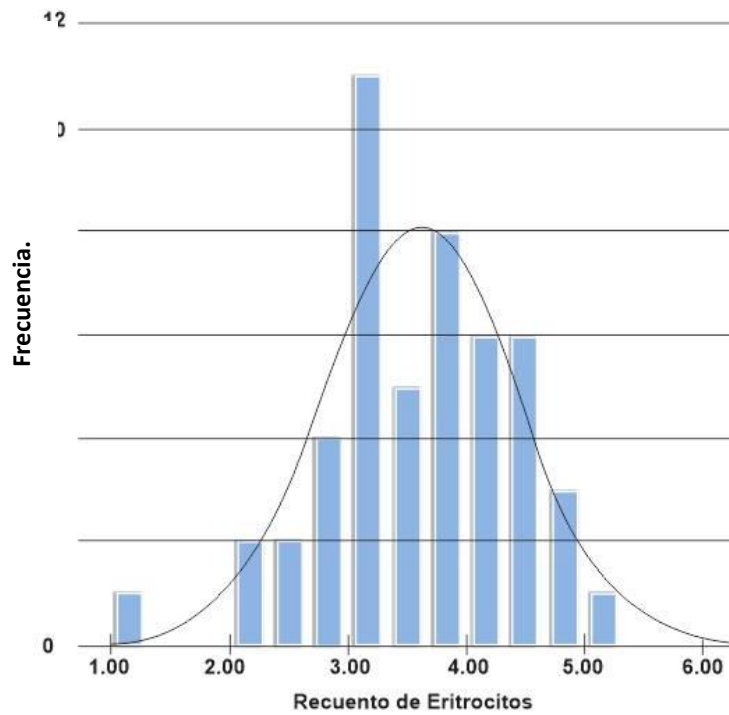
Los valores del hematocrito (Gráfica 5) también se vieron disminuidos con un promedio de 31.84 % y una desviación estándar de 7.43. La Gráfica 6 muestra el recuento de glóbulos rojos de los pacientes procesados revelando una ligera distribución a la izquierda debido a un mayor número de pacientes con valores disminuidos (menor a 4.2 c/mcL). Siendo la media de 3.62 y su desviación estándar de 0.809, con un mínimo de 1.15 y un máximo de 5.04.

Gráfica 5. Dispersión del porcentaje de hematocrito



Porcentaje de hematocrito de los pacientes con una media de 31.84% y una desviación estándar de 7.43, mostrando un mayor porcentaje de niños con valores disminuidos presentando en su ficha clínica anemia.

Gráfica 6. Distribución del recuento de eritrocitos.

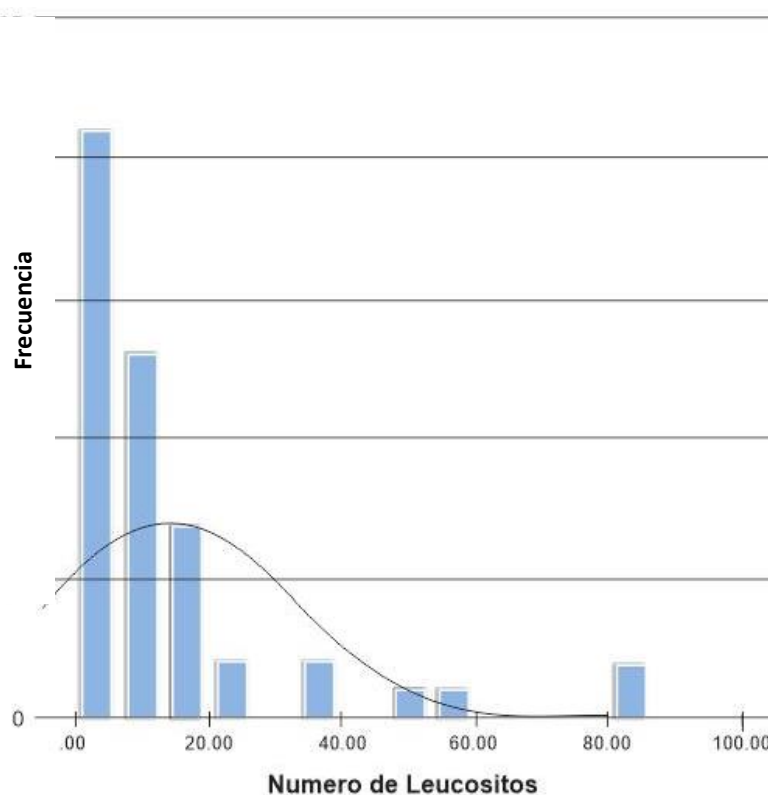


Gráfica mostrando la dispersión del recuento eritrocitario en los 49 pacientes con una media de 3.62 y una desviación estándar de 0.809.

4.3.2. Serie blanca

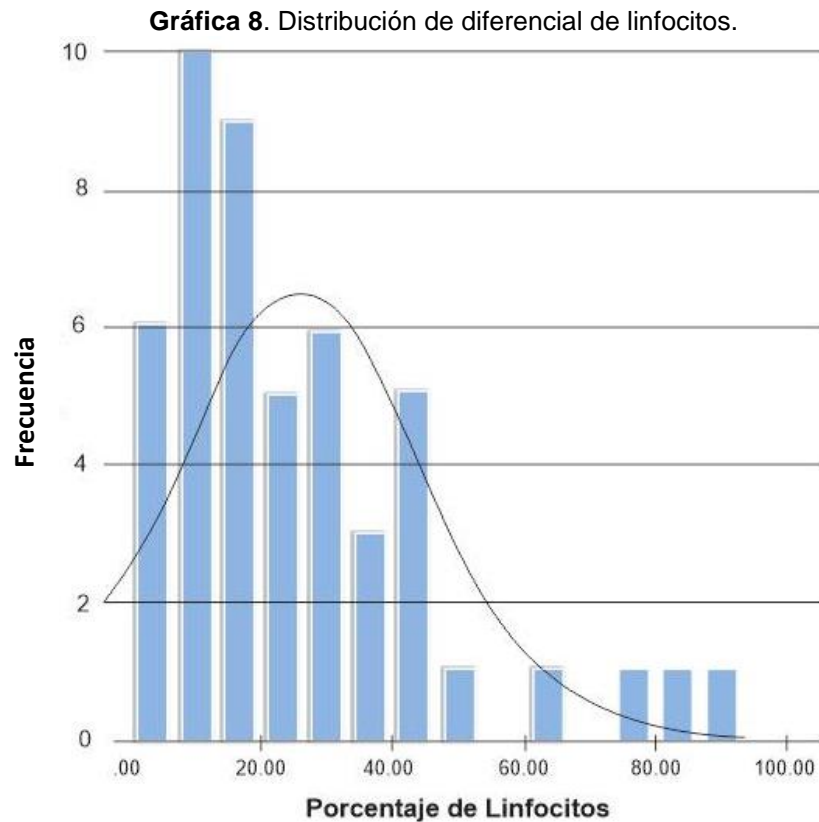
En cuanto a la formula blanca se observó una media de 14.63 k/uL leucocitos y una moda de 12.4 k/uL. La Gráfica 7 muestra una distribución hacia la izquierda con 21 pacientes con leucopenia y con 8 pacientes una marcada leucocitosis (valores superiores a 20 k/uL). Como valor máximo se presentó un caso de leucocitosis con recuento de 85.06 k/uL.

Gráfica 7. Recuento leucocitario de los 49 pacientes.



Distribución Gráfica leucocitaria donde se muestra una media de 14.63 y una desviación estándar de 18.56, con dos pacientes con una leucocitosis mayos a 80 k/uL.

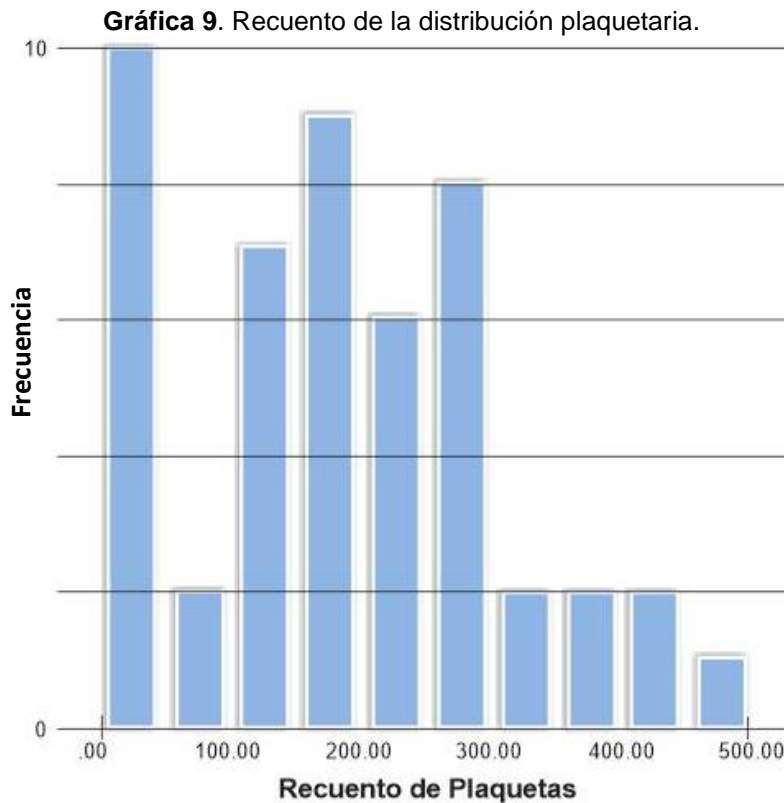
El diferencial de los glóbulos blancos nos revelo un promedio de 25.84% de linfocitos con 25 de los 49 pacientes con linfocitosis mostrando valores por debajo de 20% (Gráfica 8) y una desviación estándar de 20.53. Mientras que el 14.3% de los pacientes presentaron neutropenia, 2 de género femenino y 5 de género masculino.



Porcentaje de linfocitario presentes en los diferenciales con tendencia a la izquierda por pacientes linfopenicos con mayor número de blastos, mostrando una media de 25.84 y una desviación estándar de 20.53.

4.3.3. Plaquetas

En cuanto al recuento plaquetario se observó en 19 casos trombocitopenia, promedio de 38.7% de los pacientes, 8 de sexo femeninos y 11 masculinos, el total del recuento plaquetario nos dio una media de 186.9×10^3 (Gráfica 9).

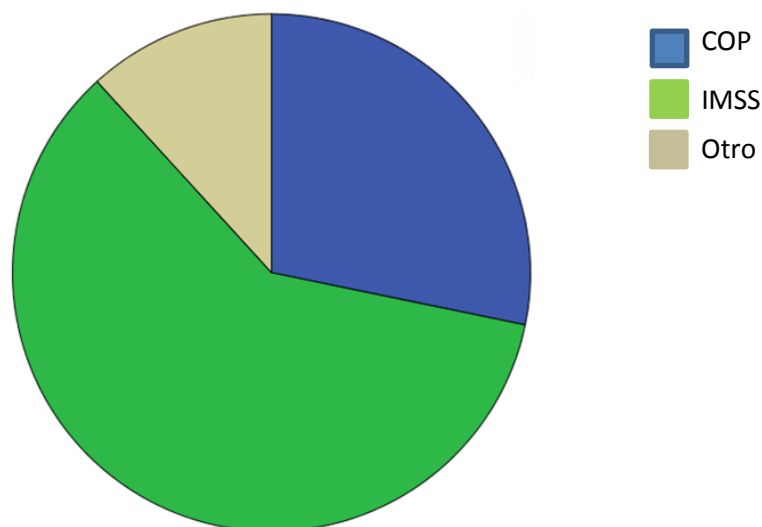


Gráfica mostrando un total de 19, pacientes de los 49, con valores disminuidos de plaquetas, una media de 186.94 y una desviación estándar de 118.031. Un paciente con valor máximo de 491 en el recuento plaquetario.

4.4. Institución de procedencia.

Los 85 pacientes de este estudio fueron referidos por diversas instituciones del estado, el Centro Oncológico Pediátrico del cual procedían pacientes pediátricos que corresponde al 28.2%, el IMSS, del cual proceden el mayor número de pacientes 51 en total siendo el 60% y por ultimo diversas otras instituciones o médicos externos con un total de 10 pacientes o 10.8% (Gráfica 10).

Gráfica 10. Instituciones de procedencia.



Institución de la cual fueron referidos los 85 pacientes pediátricos integrados al estudio, mostrando el 60% de ellos pertenecientes al IMSS, 28.2% al COP y 10.2% referidos por alguna otra institución o médicos privados.

4.5. Análisis molecular.

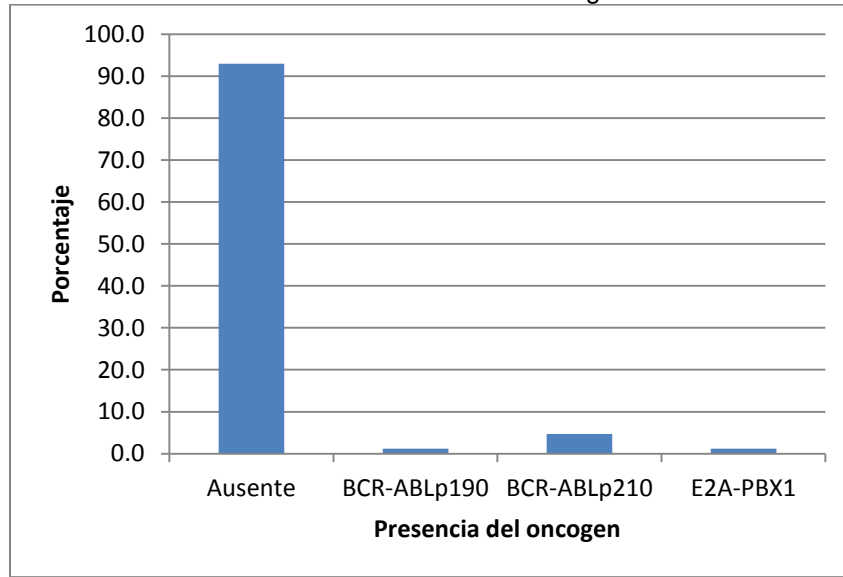
Los resultados obtenidos en los 85 pacientes procesados fueron los siguientes (Gráfica 11): *E2A-PBX1(+)*: 1 pacientes (1.2%); *MLL-AF4(+)*: no se identificaron pacientes con esta translocación (0%); *BCR-ABL(p190) (+)*: 1 paciente positivo (1.2%); *BCR-ABL(p210) (+)*: 4 pacientes (4.7%); y *TEL-AML1(+)*: no se identificaron pacientes con esta translocación (Tabla 11).

Tabla 11. Oncogenes presentes en los pacientes positivos con alguna translocación positiva.

Número de control	Oncógen producto de la translocación					Numero de oncogenes
	E2A-PBX1	MLL-AF4	BCR-ABL (p190)	BCR-ABL (p210)	TEL-AML1	
2AQ	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	1
3DH	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	1
5VA	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	1
44VA	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	1
45VA	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	1
19MM	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1

El análisis de los resultados obtenidos se realizó basándose en los parámetros desarrollados por las secuencias de oligos utilizados, en donde identificamos determinadas translocaciones, según clasificadas por la Organización Mundial de la Salud en términos de diagnóstico molecular de Leucemias Linfoblásticas Agudas.

Gráfica 11. Presencia del oncogén. .



Porcentaje de los oncogenes presentes comparada con los pacientes sin la presencia de los cinco oncogenes estudiados, el resultado de los oncogenes MLL-AF4 y TEL-AML1 estuvieron ausentes en todos los casos.

El cálculo de las medidas de proporción nos revela una prevalencia puntual de 7.05% de los casos, con el número de casos prevalentes de 6. Estos resultados fueron obtenidos por la interpretación de los geles de agarosa, realizando un análisis comparativo entre los marcadores de peso molecular y las bandas obtenidas (Figura 2-3).

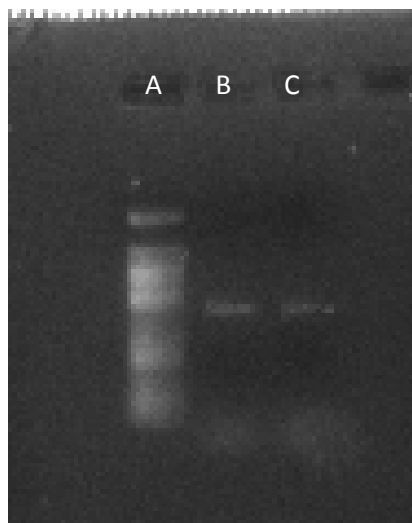


Figura 2: Se presenta el gel de agarosa al 0.9%; A. Marcador de peso molecular de 50pb; B. Control positivo de 445 pb TOM1, oncogén BCR-ABL p190 secuencia C-E3' (BCR-e1-C y ABL-a3-E3'). C. Paciente # 2 positivo para el oncogén BCR-ABL p210 con banda en 445 pb.

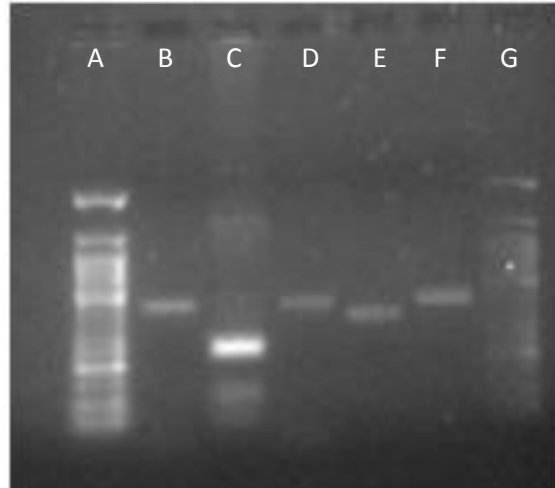


Figura 3: Se presenta el gel de agarosa al 0.9% con los pacientes positivos al oncogén BCR-ABL p 210 translocación 9:22 ; A. Marcador de peso molecular de 50pb; B. Control positivo 417 pb línea celular K562 secuencia A - B (BCR-B1-A y ABL-a3-B) oncogén BCR-ABLp210 t(9;22); C. Paciente # 3 secuencia A – B a 243 pb positivo; D. Paciente #5 a 417 pb secuencia A – B positivo; E. Paciente # 44 a 342 pb secuencia A – B positivo; F. Paciente # 45 a 417 pb positivo secuencia A – B; G. Marcador de peso molecular de 50pb.

Tabla 12. Presencia de translocaciones.

	Frecuencia	Porcentaje
Ausente	79	92.9
t(1;19)	1	1.2
t(9;22)	5	5.9
t(12;21)	0	0
t(4;11)	0	0
Total	85	100.0

Porcentaje de translocaciones presentes en los 85 pacientes estudiados con una prevalencia de 7.1% de pacientes con algún tipo de translocación.

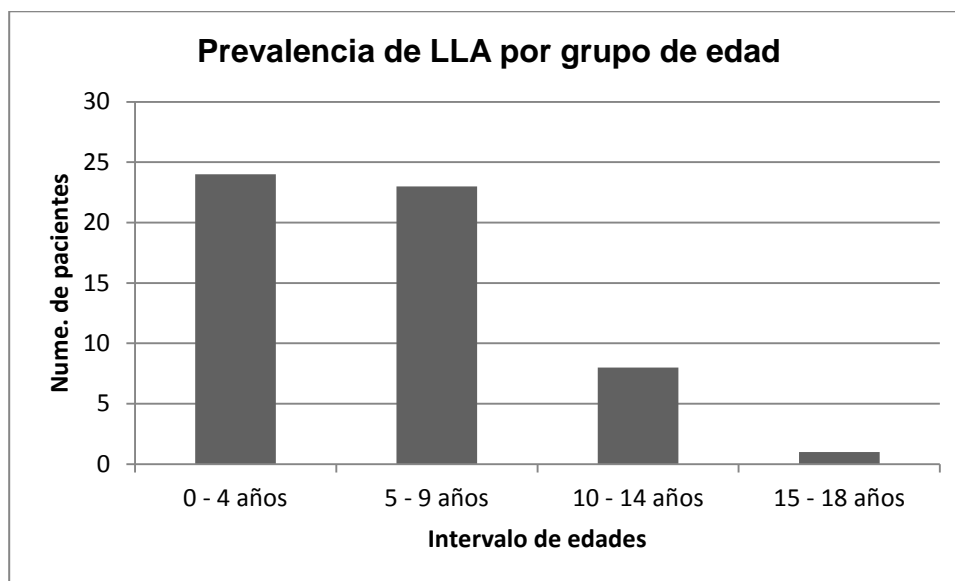
CAPÍTULO V.

5. DISCUSIÓN

5.1. Edad

El cáncer infantil representa la primera causa de mortalidad pediátrica por enfermedad en México entre las edades de 4 a 15 años (86), en nuestra población de estudio se mostró una mayor incidencia en los pacientes menores de 9 años (47 pacientes) mostrando un descenso en el comienzo de la adolescencia (Gráfica 12), estos resultados son similares a estadísticas reportadas que muestran un 77% de los pacientes de LLA en México se encuentran entre las edades de 0 a 9 años (45). El estudio también demostró un mayor número de pacientes dentro de los rangos de pronóstico favorable, según su grupo de edad (Gráfica 2), entre uno y diez años (43). De acuerdo a los factores de riesgo aquellos pacientes diagnosticados entre las edades de 1 a 9 años con LLA suelen tener mejor tasa de supervivencia (26) lo que indica una probabilidad mayor de entrar a un estado de remisión en los pacientes estudiados.

Gráfica 12. Prevalencia de leucemia linfoblástica aguda de acuerdo a grupos de edad.



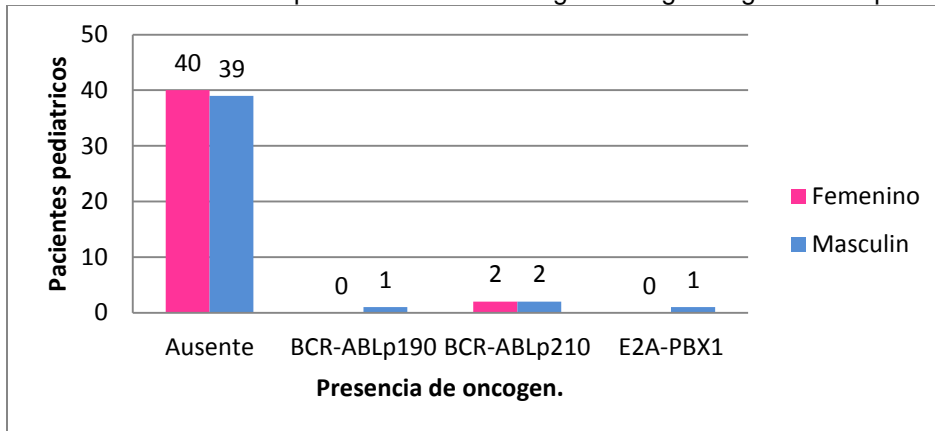
Grupos de edad estableciendo una disminución en la etapa de la adolescencia teniendo los grupos de mayor riesgo entre las edades de 0 a 9 años.

5.2. Relación género y estudio molecular.

El estudio nos revelo un total de 6 pacientes con presencia de oncogén, en los 85 niños con diagnóstico de LLA, mostrando un número mayor de pacientes de género masculino, 4.7% con algún tipo de translocación, comparado con un 2.35% de género femenino lo que concuerda con la literatura estableciendo un mayor número de incidencia en pacientes masculinos (87) y el mal pronóstico establecido para pacientes del masculinos (3). Excluyendo del estudio a los pacientes de género femenino, no deja un total de 43 pacientes de sexo masculino de los cuales 4 presentaron algún tipo de oncogén representando el 9.3% de los pacientes de este género, lo que puede explicar por qué en la literatura los pacientes masculinos tiene un pronóstico desfavorable en comparación con el género femenino (88).

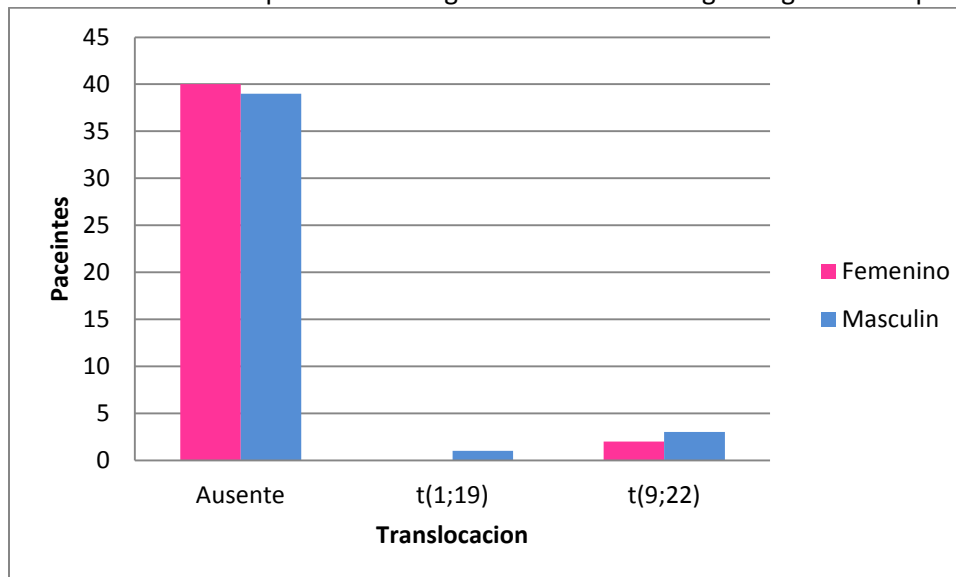
Existe una particular importancia en cinco casos positivos a la translocación t(9:22) conocida como cromosoma filadelfia, asociado con un pronóstico desfavorable y una baja respuesta al tratamiento (66)(Gráfica 13 – 14).

Gráfica 13. Relación de la presencia de los oncogenes según el género del paciente.



Gráfica mostrando una relación 2:1 con número de pacientes de género masculino positivos en relación al sexo femenino.

Gráfica 14. Relación de la presencia de alguna translocación según el género del paciente.



Gráfica de translocaciones presentes en los pacientes con cinco casos de t(9;22), conocido como cromosoma filadelfia, signo de mal pronóstico; y un caso positivo de t(1:19).

5.3. Análisis clínico y molecular

Los resultados individuales de cada rearrreglo génico se evaluaron estandarizando diferentes métodos moleculares para identificar las frecuencias de las diferentes translocaciones [t(12;21); t(4;11); t(1;19); t(9;22)], utilizando técnicas moleculares por RT-PCR, con resultados reproducibles y con un elevado grado de sensibilidad; volviéndose un complemento para los métodos clásicos de diagnóstico y clasificación de los grupos de riesgo según el pronóstico de la translocación.

La incidencia de BCR-ABL[t(9;22)] se presentó en cinco casos positivos para este oncogén, un caso para la proteína p190 y cuatro para p210, los cuales no pueden ser diferenciados por técnicas citogenéticas. Dando una prevalencia de este oncogén en nuestro grupo de estudio del 5.8%, correspondiendo a lo registrado en la literatura de la LLA en pacientes pediátricos (88). Este grupo de pacientes fue clasificado como de mal pronóstico después del diagnóstico molecular (57), lo que conlleva un tratamiento intensivo (dosis elevadas de quimioterapia), seguido de un trasplante de médula ósea alogénico o trasplante de células progenitoras de sangre periférica (71,72). La agresividad de esta translocación dio como resultado el reporte del fallecimiento de un paciente, con el

oncogén p210, durante el transcurso de este proyecto. Los resultados clínicos asociados con el cromosoma filadelfia usualmente revelan una hiperleucocitosis, blastos de tamaño heterogéneo, con citoplasma y vacuolización variable presentándose en pacientes mayores de 10 años (11). El promedio de edad para este grupo fue de 10.3 años, correspondiendo a lo descrito en estudios previos (89).

La aberración génica TEL-AML1[t(12;21)] no se encontró en los 85 pacientes pediátricos estudiados con diagnóstico de LLA. Sin embargo la importancia de utilizar un análisis de RT-PCR para este rearrreglo radica en la incapacidad de métodos citogenéticos para lograr su detección. Los resultados de este oncogén en la población estudiada son considerablemente menores a los reportados, del 18 al 33% en estudios obtenidos de artículos internacionales (6), también se refleja un alza en la incidencia de esta aberración en pacientes con recaídas. Este oncogén se encuentra asociado a leucocitosis en un rango de edad de 2 a 5 años (6). La asociación de la LLA con el oncogén TEL-AML1 está biológicamente caracterizada por una prolongada o completa remisión y una buena sobrevida libre de evento a largo plazo, estableciendo esta aberración cromosómica como pronóstico favorable (6,90). Sin embargo se ha revelado que la presencia de anomalías cromosómicas secundarias, como una deleción del alelo TEL no translocado o duplicación del cromosoma 21, tiene un efecto adverso en el pronóstico de los pacientes positivos a TEL/AML1 (6).

El rearrreglo E2A-PBX1[t(1;19)] fue detectado en un solo caso de los 85 pacientes (1.17%), la frecuencia de esta translocación se encontró en porcentajes menores a los que marca la literatura, en donde se reporta una prevalencia del 4 al 8% (91). Este oncogén ha sido altamente estudiado por su asociación con recaídas al SNC, de hecho su presencia es uno de los factores pronóstico para recaídas. Otro indicador importante de recaídas es la hiperleucocitosis que en presencia de este oncogén se vuelve de mal pronóstico. Sin embargo nuestro paciente positivo no presentó leucocitosis sino valores dentro de los rangos establecidos por la institución de procedencia (4.9 K/u). El diagnóstico molecular

de este oncogen procede a un incremento en la intensidad de la quimioterapia permitiendo una sobrevida similar a la de pacientes clasificados como de riesgo estándar o medio (92,11).

La aberración génica MLL-AF4 [t(4;11)] no fue detectada en ningún caso de los 85 pacientes pediátricos estudiados con diagnóstico de LLA. Este porcentaje difiere con la frecuencia descrita por otros autores (93). Este oncogén puede presentarse en forma de translocación críptica, que sólo son detectables por técnicas moleculares como RT-PCR y FISH (11). La presencia de este oncogén es asociado a un pronóstico desfavorable, debido a su baja respuesta a los tratamientos de quimioterapia reduciendo los niveles de sobrevida.

CAPITULO VI.

6. Conclusiones.

Se obtuvo una prevalencia significativamente similar de sexo, edad y translocaciones positivas con lo reportado por grupos nacionales e internacionales.

La frecuencia de las translocaciones [t(12;21); t(4;11); t(1;19); t(9;22)] génicas fue del 7.05% en una población de 85 niños con diagnóstico de LLA en el estado de Baja California.

El oncogén BCR-ABL[t(9;22)] se presentó con una frecuencia mayor 5.8% en el estudio, pero muy similar a lo descrito por otros grupos (del 5%).

La incidencia del rearreglo E2A-PBX1[t(1;19)] fue detectado en un solo caso de los 85 pacientes, presentando una frecuencia del 1.2%.

Los resultados plasmados en esta tesis permitieron estandarizar diferentes técnicas moleculares para logrando diagnósticos efectivos y mejora el desarrollo de tratamientos personalizados que permitieron aumentar la calidad de vida de los niños con LLA.

CAPITULO VII.

7. Anexos

7. 1. Aspectos Éticos y Legales

Las muestras sanguíneas de los pacientes pediátricos son tomadas una vez que los padres o tutores den su autorización mediante la firma del consentimiento informado. En el cual se les explicara los términos de su participación, los riesgos que conlleva el estudio, la forma en que se protegerá la confidencialidad de su información y su libertad para retirar del estudio cuando lo desee. Una vez que tanto el paciente como el padre o tutor hayan comprendido los términos del consentimiento este será firmado.

Este proyecto ha sido evaluado y autorizado por el comité de bioética de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California.

CAPITULO VIII

8. BIBLIOGRAFIA

1. Instituto-Nacional-de-Estadistica-Y-Geografia. Estadistica a proposito del dia mundial contra el cancer. Serie Estadisticas Vitales. 2011 Febrero.
2. Mejia-Aragure JM. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Revista de Hematología. 2010 Abril-Mayo; 11(Supl. 1): p. 35-36.
3. Rodriguez L, González-Llano O, Mancias C, Pompa T, González G, Sandoval A, et al. Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noroeste de Mexico. Rev Hematol Mex. 2010 Abri-Junio; II(11): p. 78-81.
4. van-Dongen J, Macintyre E, Gabert J. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia. 1999;(13).
5. Alonso-M CN, Alfaro EM, et.al.. Caracterizacion molecular en leucemia linfoblastica aguda pediatrica en una institucion hospitalaria. Hematologia. 2006 Enero-abril; 10: p. 8-12.
6. Ariaga-A G, Cabrera-C ME, Melo A, et.al.. Frecuencia de los genes de fusion TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediatricos con leucemia linfoblastica aguda. Rev Med Chile. 2006;(134): p. 1367-76.
7. García-González A, Et.al.. Determinacion de translocaciones cromosomicas 4:11 y 12:21 en niños con diagnostico de leucemia linfoblastica aguda y 15:17 en leucemia promielocitica aguda por medio de la RT-PCR. CONCYT-SENACYT-FONACYT-Facultad de Medicina Universidad de San Carlos de Guatemala. 2009 Junio; 90-2006(65).
8. Huettner SC, Pu Z, Van-Etten AR, Tenen GD. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. Nature Genetics. 2000 Enero; 24: p. 57-60.
9. Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, Papayannidis C, Ferrari A, Tiziana-Storlazzi C, et al. The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL. 2010 Octubre; 95(10): p. 1683-1690.

10. Etienne De Braekeleer NDGDRNBFrM. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. *European Journal of Haematology*. 2011 febrero;(86): p. 361-371.
11. Alonso C, Rubio-Longo PL, Luppo S, Medina A, Gallego MS, Scopinaro MJ, et al. Nuevos blancos terapeuticos en leucemia aguda pediatrica: Caracterizacion de las mutaciones del Gen FLT3. *Medicina Infantil*. 2007 Junio; XIV(2): p. 8.
12. DeLaTorre-Galvez I. Cuidados enfermeros al paciente oncologico. 1st ed. Madrid, España: VERTICE; 2008.
13. Karp G. *Biologia celular y molecular*. Septima edicion ed. Mexico, D.F.: McGrawHill; 2013.
14. Bozzone DM. *The biology of cancer: Lukemia House C*, editor. New York: Infobase Publishing; 2009.
15. Rodak-F B. *Hematologia: fundamentos y aplicaciones clinicas* Buenos Aires: Panamericana; 2005.
16. Ruiz-A GJ. *Fundamentos de Hematologia*. 4th ed. Panametricana , editor. Mexico: Medica Panamericana, S.A. de C.V.; 2011.
17. Jaime-Perez JC, Gómez-Almaguer D. *Hematología, La sangre y sus derivados*. 3rd ed. de-Leon-Fraga J, editor. México: McGraw-Hill Companies Inc.; 2012.
18. Piller GJ. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology*. 2001 February; 112(2): p. 282-292.
19. Chavez-Gonzalez MA, Ayala-Sanchez M, Mayani H. La leucemia mieloide cronica en el siglo XXI: biologia y tratamiento. *Rev Invest Clin*. 2009 Mayo-Junio; 61(3): p. 221-232.
20. Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la historia de la leucemia. *Patologia Revista Latinoamericana*. 2013 enero-marzo; 51(1): p. 58-69.
21. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960; 132(1497-500).
22. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic.

- Science. 1960 Diciembre; 142:1497.
23. Abbas Ak, Linchtman AH, Pillai S. cellular and molecular immunology. 6th ed. Madrid, España; 2004.
 24. Muñoz A. Cancer, genes y nuevas terapias. 1st ed. Feduchi E, Irurzun A, editors. Madrid: Helice; 1997.
 25. Bottura C, Ferrari I. Endoreduplication in Acute Leukemia. Blood. 1963 Febrero; 21(2).
 26. American-Cancer-Society. Leucemia Linfoblastica Aguda; Causas, factores de riesgo y prevencion; 2015.
 27. Arribas-Castrillo JM, Vallina-Alvarez E. Hematologia Clinica: Temas de Patologia Medica Oviedo Ud, editor. Oviedo (Asturias): Universitarios ediunno; 2005.
 28. Campbell R. Genomas Eucariontes: Organizacion, regulacion y evolucion. In Comming B, editor. Biologia. Madrid, España: Medica Panamericana ; 2007. p. 371.
 29. Sans-Sabrafen J, Besses-Raebel C, Vives-Corrans JL. Hematologia Clinica. 5th ed. Madrid: ELSEVIER; 2006.
 30. Kumar V, Abbas AK, Robbins SL, Nelson F, Mitcell RN. Robbins Patologia Humana. 8th ed. Kumar V, editor. Barcelona, España: Elsevier España, 2008; 2008.
 31. Herrera-Gomez A, Granados-Garcia M. Manual de oncologia, procedimientos medico quirurgicos. Quinta ed. McGraw-Hill IESADCV, editor. Mexico: McGrawHill; 2013.
 32. Leuraud K, et al. Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. The Lancet Haematology. 2015 Julio; 2(7).
 33. Pedraza-Muriel V. Mecanismos biologicos subyacentes a la accion terapeutica de la radiacion Carreras-Delgado JL, editor. Madrid: Real Academia Nacional De Medicina, Instituto de España; 2009.
 34. Kelley. Medicina Interna. Cuarta ed. Madrid, España: Editorial Medica

Panamericana; 1993.

35. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher MR, Ganser A, Lichter P, et al. Detection of Chimeric BCR-ABL Genes on Bone Marrow Samples and Blood Smears in Chronic Myeloid and Acute Lymphoblastic Leukemia by In Situ Hybridization. *Blood*. 1994; 83(1922).
36. Castro-Rios M, Zerga M, Chiappe G. GUIAS DE DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO: Sociedad-Argentina-de-Hematologia:Julian-Alvarez ; 2015.
37. Rubio-Campal F, Garcia-Espinosa B, Carrasco-Carrasco M. Fundamentos y Tecnicas de Analisis Hematologicos y Psitologicos. 1st ed. Madrid, España: Paraninfo; 2012.
38. Ortega-Sánchez MA, Osnaya-Ortega ML, Rosas-Barrientos JV. Leucemia linfoblástica aguda. *Med Int Mex*. 2007 enero-febrero; 23(1).
39. Van-Eys J, Pullen J, Head D, Boyett J, Crist W, Falletta J, et al. The French—American—British (FAB) classification of leukemia. The pediatric oncology group experience with lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1986 Marzo; 57(1046–1051).
40. World.Health.Organization. Informe Mundial sobre el cancer. IARC Communications. 2014 Febrero; PRESS RELEASE No. 224.
41. Instituto-Nacional-de-Estadistica-y-Geografia. “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DIA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)” DATOS MUNDIALES. INEGI. 2014 ENERO.
42. Secretaria-de-Salud.Subsecretaria-de-prevencion-y-promocion-de-la-Salud. Perfil Epidemiologico de cancer en niños y adolescentes en Mexico. Mexico, D.F.; 2011.
43. INSTITUTO-NACIONAL-DE-SALUD-PÚBLICA , VALIDADO-POR-EL-CONSEJO-DE-SALUBRIDAD-GENERAL. “PROTOCOLO DE LA ATENCIÓN PARA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA. GUÍA CLÍNICA Y ESQUEMA DE TRATAMIENTO”. Seguro Popular. .
44. Mexico:Secretaria-de-Salud. GPC de Diagnostico y Tratamiento de Leucemia Linfoblastica Aguda; 2009.
45. Rivera-Luna R, Cárdenas-Cardos R, Olaya-Vargas , Shalkow-Klincovstein

- J, Pérez-García, M, Pérez-González OA, et al. El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. *An Med (Mex)*. 2015 Marzo; 2(60).
46. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Claria J. *Genetica medica*. 3rd ed. Barcelona: Edicions de la Universitat de Barcelona; 2004.
 47. Benito C, Espino FJ. *Genetica, Conceptos esenciales* Madrid: Panamericano; 2013.
 48. Passarge E. *Genetica: Texto y atlas*. 3rd ed. Bumaschny V, Mikkelsen K, Nain D, editors. Madrid, España: PANAMERICANA editorial medica; 2010.
 49. Solari AJ. *Genetica Humana: Fundametos y Aplicaciones en Medicina*. 3rd ed. Buenos Aires: PANAMERICANA, Editorial Medica; 2007.
 50. Faderl S, Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Blood*. 1998; 91(3995-4019).
 51. Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher M, Ganser A, Lichter P, et al. Detection of Chimeric BCR-ABL Genes on Bone Marrow Samples and Blood Smears in Chronic Myeloid and Acute Lymphoblastic Leukemia by In Situ Hybridization. *Blood* 1994. ; 83(1992).
 52. Hunger S. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. *Blood*. 1996; 87(1211-1124).
 53. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, et al. Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23,p13). A Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1990; 8(1380-1384).
 54. Lu Q, Wright DD, Kamps MP.. Fusion with EA2 converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the(1;19). *Mol Cell Biol*. 1994; 14(3938-3943).
 55. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist VW, Gaynon P. Uniform approach to risk classification and treatment assignment to children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1996; 14(18-24).
 56. Gordon MY. Biological consequences of BCR/ABL fusion gene in humans

and mice. *J Clin Pathol*. 1999; 52(10): 719-22).

57. Harrison CJ. The management of patients with leukemia: The role of cytogenetics in this molecular era. *Br J Haematol*. 2000; 108(19-30).
58. Romana SP, Le-Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer*. 1994; 9(186-191).
59. Buijs A, Sheir S, Van-Baal S, Davis JN, Potter MD, Adams C, et al. Translocation (12;22)(p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like Tel gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene*. 1995; 10(1511-1216).
60. Loh M, Silverman L, Young M, Neuberg D, Golub T, Sallan S, et al. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1998; 92(4792-7).
61. Golub TR, Barker GF, Stegmaier K, Gilliland DG. The TEL gene contributes to the pathogenesis diverse molecular genetic mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997; 220(67-79).
62. Rubnitz JE, Shuster JJ, Land VJ, Link MP, Pullen J, Camitta BM, et al. Case control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite based therapy. A Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1997; 89(1143-6).
63. Takeuchi S, Seriu T, Bartram CR, Golub TR, Reiter A, Miyoshi I, et al. TEL is one of the targets for deletion on 12p in many cases of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1997; 11(8): p. 1220-3.
64. Rowley JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol*. 2000; 37(4): p. 315-9.
65. Consejo-de-Salubridad-General. Diagnostico temprano y oportuno de Leucemia Aguda en la Infancia y Adolescencia en el primer nivel de atencion. Guia de practica clinica GPC. Secretaria de Salud, Centro Nacional de Excelencia Tecnologica en Salud. Report No.: SSA-061-08.
66. Dorantes-Acosta E, Zapata-Tarrés M, Miranda-Lora A, Medina-Sansón A, Reyes-López A, Peña-del-Castillo H, et al. Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica

aguda afiliados al Seguro Popular, con respecto al desenlace. Bol Med Hosp Infant Mex. 2012 Mayo-Junio; 69(3): p. 190-196.

67. Saha V, Kearns P. New Agents for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia Saha V, Kearns P, editors. Neew York: Springer; 2011.
68. Rudolph CD, Rudolph AM, Hostetter MK, Lister G, Siegel NJ. Peditria de Rudolph. 21st ed. Madrid: McGrawHill; 2004.
69. National-Cancer-Instutute. NCI Dictionary of Cance. [Online]. [cited 2015 Septiembre 29. Available from:
<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=46681>.
70. Martinez R, Martinez. Salud y enfermedad del niño y del adolescente. 6th ed. Morales-Saavedra L, editor. Mexico: El Manual Moderno; 2009.
71. Lassaletta-Atienza. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. Pediatr Integral. 2012; XVI(6): p. 453-462.
72. Kliegman , Stantion , ST.Geme , Behrman. Nelson. Tratado de peditria. 19th ed. Behrman RE, editor. Barcelona: ELSEVIER SAUNDERS; 2013.
73. Madrigal G. Manual de diagnostico y terapeutica peditrica. In Rica CEdludC, editor.. San Jose: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2003. p. 288-294.
74. Pacheco M, Madero L. ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA. PSICOONCOLOGÍA. 2003; 0(1): p. 107-116.
75. Perez-Villanueva H. Guías de Tratamiento para Leucemia. Servicio de Radioterapia; Hospital Infantil de México Federico Gómez. 2011.
76. Badell I, Del-Rio E, Pardo N, Farre R, Torrent M, Fraga G, et al. Aplicación de la farmacogenética a la individualización terapéutica en la leucemia linfoblástica aguda: presentación de caso clínico. An Pediatr (Barc). 2007 Abril; 66(4): p. 437-438.
77. Fajardo-Gutierrez A, Mejia-Arangure J, Hernandez-Cruz L, Mendoza-Sanchez H, Garduño-Espinoza J, Martinez-Garcia M. Epidemiologia descriptiva de las neoplasias malignas en niños. Rev Pan de Salud Pub. 1999; 6(75-88).

78. Abdullaev F, Rivera-Luna R, Roitenburd-Belacortu V, Espinnoza-Aguirre J. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Archives of Medical Research*. 2000; 31(526-531).
79. Schrappe M, Camitta B, Pui CH. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2000;(14): p. 2193-4.
80. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et.al.. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90 German-Austrian Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*. 2000;(95): p. 3310-22.
81. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et.al.. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukaemia: results of Dana-Farber consortium protocol 91-01. *Blood*. 2001;(97): p. 1211-8.
82. Kamps WA, Bokkerink JP, Harkvoort-Cammel FG, et.al.. BFM-oriented treatment for children with acute lymphoblastic leukaemia without cranial irradiation and treatment reduction for Standard risk patients: results of DCLSG protocol ALL-8 (1991-1996). *Leukemia*. 2002;(16): p. 1099-111.
83. Instituto-Nacional-de-Estadística-y-Geografía I. CENSO de población y vivienda 2010; 26/08/13.
84. Organización-Mundial-de-la-Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra 2005;(Tercera edición).
85. SIGMA-ALDRICH. TRI-Reagent for processing tissues. ; Cat. Number T9424.
86. Rivera-R C. Conceptos epidemiológicos del cáncer infantil en México. Rivera-Luna R, editor. México: Ed. editores de Textos Mexicanos; 2006.
87. Vargas-Vallejo MdP, Covarrubias-Zapata D, Gómez-Valencia L, Borbolla-Sala ME, Pacheco-Gil L. Alteraciones citogenéticas en niños con leucemia aguda linfoblástica en Tabasco. *SALUD EN TABASCO*. 2011 Enero-Abril; 17(1 Y 2): p. 22 - 29.
88. Martín-Ramos ML, Fernández-Martínez FJ, Barreiro-Miranda E. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *ANALES ESPAÑOLES DE PEDIATRÍA*. 2005; 55(1): p. 45 - 52.

89. Jiménez-Arce G, Carrillo J, Chaves M, Jiménez R, Vargas M, Campos L, et al. Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. *Rev. Biol. Trop.* 2008 Diciembre; 56(4): p. 1613-1618.
90. Attarbaschi A, Mann G, König M, Dworzak MN, Trebo MM, Mühlegger N, et al. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukaemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia.* 2004; 18: p. 1611-16.
91. Pui CH, Thiel E. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood.* 2012 Agosto; 9(120(6)): p. 1165-74.
92. Núñez-Enríquez JC, Mejía-Aranguré JM. Biología molecular y leucemia: E2A-PBX1 y recaída al sistema nervioso central. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015 Septiembre; 53(3): p. 236-9.
93. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer.* 2011; 11(355).
94. Jouve N. Explorando los genes: Del big-bang a la nueva Biología. Ediciones Encuentro, S.A. 2008;: p. 264.
95. Milena-Vera Anyul PC DMCSA. Análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el Instituto Nacional de Cancerología. *Biomedica, Revista del Instituto Nacional de Salud.* 2012 marzo; 3(32).
96. Castedo Julio S-GLM RSCRL. Estandares científico-técnicos en las publicaciones relacionadas con las ciencias de la salud. *Radiología.* 1998 Octubre;(6).
97. Strachan T, Andrew-P. R. *Human Molecular Genetics.* 4th ed.: Garland Publisher; 2010.
98. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano F, Ferrara F, Cimino G, et al. Neutrophilic-chronic myelogenous leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with c3a2 junction). *Blood.* 1996; 88(2410).

99. Cazzaniga G, Lanciotti M, Rossi V, Di-Martino D, Aricò M, Grazia-Valsecchi M, et al. Prospective molecular monitoring of BCR/ABL transcript in children with Ph+ acute lymphoblastic leukaemia unravels differences in treatment response. *British Journal of Haematology*. 2002 Noviembre; 119(2): p. 445–453.
100. Arribas-Castillo JM, Vallina-Álvarez E. “Hematología Clínica”. In *Temas de Patología Médica.*: Ediciones de la Universidad de Oviedo; 2005. p. 280-281.

