



**CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -CONCYT-
SECRETARIA NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -SENACYT-
FONDO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA -FONACYT-**

**FUNDACIÓN ROZAS-BOTRÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES GENÉTICAS Y
METABÓLICAS –INVEGEM-**

**INFORME FINAL
“DETECCIÓN Y EVALUACIÓN POR RT-PCR DEL TRANSCRITO PML-RAR α
PRODUCIDO POR LA t(15;17)(q22;q21), EN PACIENTES CON LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA”**

PROYECTO FODECYT No. 70-2012

**Dra. Claudia Lorena Carranza Meléndez
Investigadora Principal**



Guatemala, Marzo 2015.

AGRADECIMIENTOS:

La realización de este trabajo, ha sido posible gracias al apoyo financiero dentro del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, -FONACYT-, otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología –SENACYT- y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología –CONCYT- .

RESUMEN

Las leucemias mieloides agudas (LMA) son desórdenes malignos de algunos clones celulares hematopoyéticos que se producen como resultado de alteraciones en genes que participan en el ciclo celular. Las principales alteraciones genéticas presentes en LMA son: la translocación t(8;21)(q22;q22) (transcrito AML1-ETO); la t(15;17)(q22;q21), (transcrito PML-RARA) y inv(16)(p13;q22) (transcrito CBF β -MYH11); mutaciones en los genes FLT3, NPM1 y cKIT; y monosomías en los cromosomas 7 y 5. Todos estos marcadores brindan información valiosa sobre el pronóstico del paciente y la terapia a seguir.

El objetivo general del proyecto FODECYT 70-2012 fue detectar y evaluar por RT-PCR el transcrito PML-RAR α producido por la t(15;17) (q22;q21), en pacientes con leucemia mieloide aguda para orientar en la selección de ácido trans-retinoico y quimioterapia combinada como esquema terapéutico de elección.

Se incluyeron un total de 84 pacientes con diagnóstico de LMA; referidos en su mayoría por los hospitales nacionales (Hospital Roosevelt, Hospital General San Juan de Dios, Unidad Nacional de Oncología Pediátrica e Instituto Guatemalteco de Seguridad Social). La mayoría de los pacientes incluidos fueron mujeres (51.2 %); la mediana de la edad fue 16 años y la procedencia de mayor frecuencia fue el área metropolitana (25.0 %) y el área suroccidental (19.0 %) del país.

El transcrito PML-RAR α (en cualquiera de sus isoformas) se detectó en el 17.85 % de los pacientes con LMA referidos; y esto permitió orientar a los médicos hematólogos tratantes sobre el régimen de quimioterapia y ácido trans-retinoico el más adecuado a seguir. El 86.67 % de los pacientes en los que se encontró el transcrito pertenecían a la clasificación FAB M3 o leucemia promielocítica aguda; además ésta mutación fue más frecuente en hombres que en mujeres y la mediana de la edad para los pacientes positivos para t(15;17) (q22;q21) fue de 17 años.

Palabras clave: Leucemia Mieloide Aguda, PML-RAR α , ácido trans-retinoico

ABSTRACT

Acute myeloid leukemias (AML) are a group of malignant disorders in some hematopoietic cell clones that occur as a result of alterations in genes involved in the cell cycle. The main genetic alterations in AML are: translocation t (8; 21) (q22; q22) (transcript AML1-ETO); the t (15; 17) (q22; q21), (PML-RARA transcript) and inv (16) (p13; q22) (transcript CBF β -MYH11); mutations in FLT3 and cKIT NPM1 gene; and monosomy on chromosomes 7 and 5. These markers provide valuable information about the prognosis of the patient and therapy to follow.

The overall objective of the project FODECYT 70-2012 was detect and evaluate RT-PCR the presence of PML-RAR α transcript produced by the t (15; 17) (q22; q21) in patients with acute myeloid leukemia to guide the selection of acid trans-retinoic acid and chemotherapy combined as therapeutic regimen of choice.

We included 84 patients with diagnosis of AML; mostly referred by national hospitals (Hospital Roosevelt, General San Juan de Dios Hospital, National Pediatric Oncologist Unit and Guatemalan Social Security Institute). Most of the patients were female (51.2%); the median age was 16 years and the source of most frequently was the metropolitan area (25.0%) and the south western area (19.0 %) of the country.

The PML-RAR α transcript (in any of its isoforms) was detected in 17.85% of patients with AML referred; and this allowed guide physicians treating hematologists on the regime of the right to continue chemotherapy and trans-retinoic acid. The 86.67 % of the patients positives for the transcript belong to the FAB classification M3 or acute promyelocytic leukemia; well this mutation was more common in men than in women and men the median age for patients positive for t (15; 17) (q22; q21) was 17 years.

Key Words: Acute Myeloid Leukemia, PML-RAR α , transretinoic acid

BIOGRAFÍA BREVE ACADÉMICA DE LOS AUTORES

1. **Dra. Claudia Lorena Carranza, PhD.:**

En el año de 2004 se gradúo de Química Bióloga en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

En el período 2005-2007 cursó el programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular, especializado en el área de Genética en el Centro de Investigación Médica Aplicada – CIMA–, de la Universidad de Navarra, en Pamplona España.

En el año 2008, se incorpora en el Instituto de Investigación Científica y Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas - INVEGEM - , el primer centro de investigación en Genética en Guatemala; donde labora actualmente.

Durante el período 2011-2012 cursa el Master en Bioética de la Universidad del Istmo de Guatemala, graduándose en el año 2013.

2. **Luisa Rosales, Br.:**

Pensum cerrado de la carrera de Química Biológica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, egresada en el 2012.

Desde el año 2013 hasta la fecha ha laborado en varios proyectos de investigación relacionados con enfermedades hemato-oncológicas ejecutados por el Instituto de Investigación Científica y Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas - INVEGEM – como investigadora científica.

3. **Lda. Mariana Herrera, Q.B.:**

En el año de 2012 se gradúo de Química Bióloga en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Desde el año 2013 a la fecha labora como investigadora científica del Instituto de Investigación Científica y Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas - INVEGEM - , participando en diferentes proyectos de investigación en genética humana.

Actualmente cursa el segundo año de la Maestría en Microbiología de las Enfermedades Infecciosas en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
GLOSARIO	xii
RESUMEN	xiii
SUMMARY (ABSTRACT)	xiv
PARTE I	
I.1 INTRODUCCIÓN	1
I. 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
I.2.1 Antecedentes en Guatemala.....	2
I.2.2 Justificación del trabajo de investigación	4
I. 3 OBJETIVOS	6
I.3.1 General.....	6
I.3.2 Específicos.....	6
I.3.3 Hipótesis	6
I. 4 METODOLOGÍA	7
1.4.1 Localización	7
1.4.2 Variables	7
1.4.2.1 Variables Dependientes.....	7
1.4.2.2 Variables Independientes	7
1.4.3 Indicadores	7
1.4.4 Estrategia Metodológica	7
1.4.5 Método	8
1.4.6 Técnica Estadística.....	12
1.4.7 Instrumentos a utilizar.....	12

PARTE II	
II.1 MARCO TEÓRICO	14
PARTE III	
III. 1 RESULTADOS	45
III. 2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
PARTE IV	
IV. 1 CONCLUSIONES	55
IV. 2 RECOMENDACIONES	56
IV. 3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
IV. 4 ANEXOS	64
PARTE V	
V. 1 INFORME FINANCIERO	81

LISTADO DE FIGURAS

Figura No. 1: Frote de Médula Ósea de un paciente con LMA	16
Figura No. 2: Morfología de la LMA según clasificación FAB 1.....	19
Figura No. 3: Morfología de la LMA según clasificación FAB 2.....	20
Figura No. 4: Alteraciones citogenéticas y moleculares más frecuentes LMA	23
Figura No. 5: Células tumorales en médula ósea, con la alteración t(15;17).....	25
Figura No. 6: Translocación entre cromosoma 15 y 17	26
Figura No. 7: Translocación entre cromosoma 15 y 17 por FISH	26
Figura No. 8: Producción de t(15;17).....	27
Figura No. 9: Transcrito de fusión PML- RAR α	27
Figura No. 10: Papel de PML-RAR α en la hematopoyesis.....	28
Figura No. 11: Estructura química del ácido trans-retinoico	30
Figura No. 12: Gráfica de supervivencia de pacientes tratados con ATRA	31
Figura No. 13: Cariotipo de la t(8;21) que da lugar al transcrito AML1-ETO	32
Figura No. 14: Morfología típica de LMA con la translocación t(8;21).....	32
Figura No. 15: Curvas de supervivencia de pacientes con LMA y t(8;21)	33
Figura No. 16: Puntos de ruptura y fusión de t(8;21).....	34
Figura No. 17: Transcrito de fusión AML1-ETO y su función en la hematopoyesis	35
Figura No. 18: Ideograma de la Inv(16) en leucemia mieloide aguda	36
Figura No. 19: Cariotipo de LMA Inv(16).....	37
Figura No. 20: Médula ósea de paciente con LMA, Inv (16).....	38
Figura No. 21: Curva de supervivencia de paciente LMA Inv(16).....	38
Figura No. 22: Diferentes transcritos originados por Inv(16).....	39
Figura No. 23: Cariotipo de un paciente con monosomía 7	40
Figura No. 24: Supervivencia de los diferentes grupos de riesgo en LMA.	41
Figura No. 25: Estructura del receptor FLT3, y sus rutas de regulación.....	42

Figura No. 26: Principales mutaciones encontradas en el gen NPM1	43
Figura No. 27: Transcrito PML-RAR α : LMA-01,02, 05 y 06	47
Figura No. 28: Transcrito PML-RAR α : LMA-13,27, 31, 49 y 50	48
Figura No. 29: Transcrito PML-RAR α : LMA-59, 62, 63, 75, 77 y 83	49
Figura No. 30: Estandarización de RT-PCR para t(15;17) (q22;q21).....	69
Figura No. 31: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	73
Figura No. 32: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	74
Figura No. 33: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	75
Figura No. 34: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	76
Figura No. 35: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	77
Figura No. 36: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	78
Figura No. 37: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	79
Figura No. 38: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21).....	80

INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1: Clasificación de LMA según FAB	18
Tabla No. 2: Alteraciones citogenéticas más frecuentes en LMA	21
Tabla No.3: Pronóstico de la LMA según las principales alteracioens	22
Tabla No. 4: Genes mutados con mayor frecuencia en LMA	23
Tabla No. 5: Genes sobreexpresados asociados a LMA	24
Tabla No. 6: Características sociodemográficas de los pacientes con LMA	45
Tabla No.7: Características hematológicas de los pacientes con LMA.....	46
Tabla No. 8: Listado de pacientes incluidos en el estudio.....	70

GLOSARIO

- **Ácido Transretinoico:** Compuesto usado como terapia antileucémica, en pacientes con leucemia promielocítica aguda con t(15;17), por su participación como factor de transcripción en los procesos de crecimiento, diferenciación y supervivencia celular.
- **Leucemia Mieloide Aguda:** Las leucemia mieloide aguda comprende un grupo heterogéneo de neoplasias ocasionados por desórdenes malignos de algunos clones celulares hematopoyéticos que se producen como resultado de alteraciones en genes que participan en el ciclo celular; y que conlleva a la excesiva proliferación de células mieloides inmaduras en el organismo.
- **PML-RAR α :** Oncoproteína formada por la translocación entre los cromosomas 15y 17 que involucra la fusión de los genes PML (ProMyelocytic Leukemia) y RAR α (receptor α de ácido retinóico), que inhibe la transcripción de forma mucho más potente que el RAR α normal; bloqueando la diferenciación mieloide. Además, provoca la deslocalización subcelular de la PML normal, inhibiendo así su actividad antiproliferativa y pro-apoptótica.
- **Translocación:** Es el intercambio de un segmento o fracción entre dos cromosomas no homólogos. Una translocación ocurre cuando una región cromosómica (brazo o segmento) cambia de posición en el genoma, pero el número de copias de dicha región se mantiene.

RESUMEN

Las leucemias mieloides agudas (LMA) son desórdenes malignos de algunos clones celulares hematopoyéticos que se producen como resultado de alteraciones en genes que participan en el ciclo celular. Las principales alteraciones genéticas presentes en LMA son: la translocación t(8;21)(q22;q22) (transcrito AML1-ETO); la t(15;17)(q22;q21), (transcrito PML-RARA) y inv(16)(p13;q22) (transcrito CBFβ-MYH11); mutaciones en los genes FLT3, NPM1 y cKIT; y monosomías en los cromosomas 7 y 5. Todos estos marcadores brindan información valiosa sobre el pronóstico del paciente y la terapia a seguir.

El objetivo general del proyecto FODECYT 70-2012 fue detectar y evaluar por RT-PCR el transcrito PML-RARα producido por la t(15;17) (q22;q21), en pacientes con leucemia mieloide aguda para orientar en la selección de ácido trans-retinoico y quimioterapia combinada como esquema terapéutico de elección.

Se incluyeron un total de 84 pacientes con diagnóstico de LMA; referidos en su mayoría por los hospitales nacionales (Hospital Roosevelt, Hospital General San Juan de Dios, Unidad Nacional de Oncología Pediátrica e Instituto Guatemalteco de Seguridad Social). La mayoría de los pacientes incluidos fueron mujeres (51.2 %); la mediana de la edad fue 16 años y la procedencia de mayor frecuencia fue el área metropolitana (25.0 %) y el área suroccidental (19.0 %) del país.

El transcrito PML-RARα (en cualquiera de sus isoformas) se detectó en el 17.85 % de los pacientes con LMA referidos; y esto permitió orientar a los médicos hematólogos tratantes sobre el régimen de quimioterapia y ácido trans-retinoico el más adecuado a seguir. El 86.67 % de los pacientes en los que se encontró el transcrito pertenecían a la clasificación FAB M3 o leucemia promielocítica aguda; además ésta mutación fue más frecuente en hombres que en mujeres y la mediana de la edad para los pacientes positivos para t(15;17) (q22;q21) fue de 17 años.

Palabras clave: Leucemia Mieloide Aguda, PML-RARα, ácido trans-retinoico

ABSTRACT

Acute myeloid leukemias (AML) are a group of malignant disorders in some hematopoietic cell clones that occur as a result of alterations in genes involved in the cell cycle. The main genetic alterations in AML are: translocation t (8; 21) (q22; q22) (transcript AML1-ETO); the t (15; 17) (q22; q21), (PML-RARA transcript) and inv (16) (p13; q22) (transcript CBF β -MYH11); mutations in FLT3 and cKIT NPM1 gene; and monosomy on chromosomes 7 and 5. These markers provide valuable information about the prognosis of the patient and therapy to follow.

The overall objective of the project FODECYT 70-2012 was detect and evaluate RT-PCR the presence of PML-RAR α transcript produced by the t (15; 17) (q22; q21) in patients with acute myeloid leukemia to guide the selection of acid trans-retinoic acid and chemotherapy combined as therapeutic regimen of choice.

We included 84 patients with diagnosis of AML; mostly referred by national hospitals (Hospital Roosevelt, General San Juan de Dios Hospital, National Pediatric Oncologist Unit and Guatemalan Social Security Institute). Most of the patients were female (51.2%); the median age was 16 years and the source of most frequently was the metropolitan area (25.0%) and the south western area (19.0 %) of the country.

The PML-RAR α transcript (in any of its isoforms) was detected in 17.85% of patients with AML referred; and this allowed guide physicians treating hematologists on the regime of the right to continue chemotherapy and trans-retinoic acid. The 86.67 % of the patients positives for the transcript belong to the FAB classification M3 or acute promyelocytic leukemia; well this mutation was more common in men than in women and men the median age for patients positive for t (15; 17) (q22; q21) was 17 years.

Key Words: Acute Myeloid Leukemia, PML-RAR α , transretinoic acid

PARTE I

I. 1 INTRODUCCIÓN

Las alteraciones genéticas presentes en la leucemia mieloide aguda participan en el proceso de patogénesis de la enfermedad, dando lugar a una proliferación de células inmaduras o blastos. Con la ayuda de técnicas genéticas y moleculares modernas, se han logrado determinar las principales alteraciones genéticas presentes en leucemias mieloides agudas y se ha podido establecer el impacto que representan en la selección del esquema terapéutico, pronóstico, supervivencia, tasas de recaída, duración de la remisión completa, etc. Y Es por ello que el análisis citogenético y molecular de la LMA es considerado una de las herramientas más importantes para el manejo médico de la enfermedad.

Las principales alteraciones genéticas presentes en leucemias mieloides agudas con alto valor pronóstico son: la translocación $t(8;21)(q22;q22)$ (transcrito AML1-ETO); la $t(15;17)(q22;q21)$, (transcrito PML-RARA) y $inv(16)(p13;q22)$ (transcrito CBFB-MYH11); mutaciones en los genes FLT3, NPM1 y cKIT; y monosomías en el cromosoma 7 y 5.

En la translocación $t(15,17)(q22;q12)$, el gen α receptor del ácido retinoico (RAR α) en 17q12 se fusiona con un factor de regulación nuclear en 15q22 (gen de la leucemia promielocítica o PML) que da como resultado un transcrito de la fusión de los genes PML/RAR α . La proteína anormal que resulta de esta fusión juega un papel crucial en la leukemogénesis promielocítica. Además, la presencia de esta alteración permite la combinación de quimioterapia con ácido transretinoico; logrando remisiones de hasta un 80 % de los pacientes.

En el presente estudio se evaluó la presencia del transcrito PML-RAR α producido por la $t(15,17)(q22;q12)$, por medio de la técnica RT-PCR, en 84 pacientes con Leucemia Mieloide Aguda referidos de los hospitales nacionales y otros centros privados. Con la finalidad de informar a los médicos tratantes sobre pronóstico y el tratamiento con ácido trans-retinoico. Así como también, determinar la frecuencia de este marcador en Guatemala.

I. 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1 Antecedentes en Guatemala

En Guatemala, la genética humana se encuentra desarrollada pobremente. Actualmente no existen publicaciones guatemaltecas que involucren estudios de genética en humanos. La biología molecular es una herramienta útil para el área de genética humana.

Los estudios sobre enfermedades de origen genético como las neoplasias hematológicas poseen un alto impacto en países en vías de desarrollo como Guatemala. Pues gracias a estos estudios se puede apoyar en diagnóstico y pronóstico al clínico hematólogo. Y por otro lado también es posible la caracterización genética de nuestra población en distintas enfermedades.

En Centroamérica, se ha realizado un estudio epidemiológico sobre leucemias infantiles, incluyendo México, realizado por Arangúre y colaboradores; en donde se incluyeron datos de pacientes desde 1996 hasta el 2000. El promedio anual de incidencia obtenido fue de: 44.9 por millón de niños para leucemia linfoblástica aguda –LLA-(el principal tipo de leucemia infantil) y 10.6 por millón de niños para Leucemia mieloide aguda. La incidencia de LMA va de 6.8 % a 24.6% por 100,000 casos, aumentando según la edad [1].

A nivel mundial, principalmente en países desarrollados se han implementado como técnicas de rutina, el análisis de la presencia de distintos marcadores genéticos para cada una de las neoplasias hematológicas. Además se está realizando una amplia investigación para conocer mejor el desarrollo de estas afecciones, para encontrar también nuevos biomarcadores y para establecer nuevas estrategias terapéuticas [2].

En España, se ha tenido experiencia personal en la caracterización genética de neoplasias hematológicas mediante la utilización de distintas técnicas moleculares citogenéticas, principalmente en la búsqueda de nuevos mecanismos que expliquen la sobreexpresión del gen EVI1, un gen importante en leucemias mieloides agudas [3].

En Centroamérica existen muy pocos estudios sobre estos temas, el único país que lo ha reportado en Costa Rica, en donde se estudiaron algunos marcadores genéticos en leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloide aguda [4].

En Guatemala, El Instituto de Investigaciones en Genética –INVEGEM- de la FUNDACIÓN ROZAS-BOTRÁN; formado por la inquietud de varios investigadores guatemaltecos y extranjeros en desarrollar la genética humana en Guatemala, y ser una institución a la vanguardia en los países centroamericanos; se encuentra desarrollando una gran variedad de proyectos relacionados.

En el área hemato-oncológica, se ha finalizado el primer proyecto relacionado con neoplasias hematológicas (FODECYT 48-2009), en el cual se detectaron cuatro transcritos de fusión BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4 y ETV6-AML1 en 200 pacientes con leucemia linfoblástica aguda; los cuales confieren información importante sobre el pronóstico y el tipo de terapia a escoger. Con este proyecto se ha empezado un largo y extenso objetivo que es el de caracterizar genéticamente las neoplasias hematológicas en la población guatemalteca. Todo esto a largo plazo permitirá seleccionar algunos genes importantes, con el fin de estudiar sus funciones, mecanismos de activación, etc. Y con todo esto describir nuevos procesos y buscar nuevos tratamientos más eficaces [4].

Para continuar con este extenso proyecto, se ha iniciado otro proyecto en leucemia mieloide crónica (FODECYT 24-2010), En la cual por un lado se establecerán los distintos transcritos del gen BCR-ABL, y a los pacientes positivos se les realizará un monitoreo molecular cada 4 meses para cuantificar si la cantidad del gen ha disminuido, según el tiempo de tratamiento.

Para continuar con esto se ha planteado el presente proyecto en el cual se evaluará el marcador genético PML-RAR α en leucemia mieloide aguda; este marcador tiene una utilidad clínica para el médico ya que orienta a buen pronóstico y a tratamiento específico con ácido trans-retinoico; y además contribuirá a la caracterización genética de la leucemia mieloide aguda en Guatemala.

1.2.2 Justificación del trabajo de investigación

En Guatemala, las técnicas de análisis genético se han desarrollado pobremente; siendo INVEGEM, la primera institución guatemalteca y Centroamericana que ha desarrollado esta área. Estas técnicas están aportando una gran variedad de conocimiento sobre el origen de distintas enfermedades, lo que de cierta manera ha enriquecido el conocimiento de los mecanismos que originan las enfermedades.

En el área de oncología, estas herramientas tienen una vital importancia, ya que se sabe que el cáncer es una enfermedad genética adquirida en la mayoría de los casos; por lo tanto la utilidad de las técnicas genéticas y moleculares es muy importante para el diagnóstico, pronóstico, manejo y tratamiento de cada neoplasia.

Existen a nivel internacional laboratorio de análisis genéticos, cuya función es aportar características genéticas de las distintas neoplasias, y con ello mejorar el manejo de la enfermedad, aportando información valiosa para el médico.

El establecimiento e implementación de estas técnicas en Guatemala, permitirá un avance biotecnológico y clínico, para el diagnóstico y manejo de la enfermedad; ya que se puede conocer el diagnóstico, la agresividad de la enfermedad; así como el mejor tratamiento.

En el caso de leucemia mieloide aguda, existen una gran variedad de marcadores genéticos, que brindan información sobre pronóstico y tratamiento; entre ellos se pueden mencionar algunas translocaciones, mutaciones en genes y sobreexpresión de genes.

En el presente proyecto se estudiará la translocación t(15;17) que da lugar al transcrito PML-RAR α , este gen quimérico brinda información de buen pronóstico cuando se encuentra en pacientes con leucemia mieloide aguda; y además orienta a un tratamiento específico con ácido trans-retinoico.

Se espera con estos marcadores poder mejorar el manejo de la leucemia mieloide aguda en Guatemala.

En posteriores estudios se incluirán otros marcadores que también brindan información sobre pronóstico en leucemia mieloides agudas; y también poder extender estos servicios a otras neoplasias y enfermedades genéticas.

I. 3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1.3.1 Objetivo General:

Detectar y evaluar por RT-PCR el transcrito PML-RAR α producido por la t(15;17) (q22;q21), en pacientes con leucemia mieloide aguda.

1.3.2 Objetivos Específicos:

- 1.3.2.1. Detectar y evaluar por RT-PCR el transcrito PML-RAR α producido por la t(15;17) (q22;q21), en pacientes con leucemia mieloide aguda.
- 1.3.2.2. Caracterizar y evaluar genéticamente la población guatemalteca con leucemia mieloide aguda, mediante la detección de la frecuencia del marcador genético estudiado en esta población.
- 1.3.2.3. Informar sobre el buen pronóstico y orientar a tratamiento de ácido trans-retinoico combinado con quimioterapia; a todos los pacientes con leucemia mieloide aguda, que tengan el transcrito PML-RAR α .
- 1.3.2.4. Divulgar los resultados obtenidos a los hospitales y médicos relacionados con el área de hemato-oncología

1.3.3 Hipótesis

La detección del transcrito PML-RAR α producido por la t(15;17), en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda originarios de Guatemala; brinda información sobre un buen pronóstico para los pacientes; y con ello permite al médico hemato-oncólogo un mejor manejo de dicha enfermedad, orientándolo a regímenes terapéuticos específicos como el uso de ácido transretinoico.

I. 4 METODOLOGÍA

1.4.1 Localización:

En el presente estudio se incluyeron pacientes con Leucemia Mieloide Aguda procedentes de todos los departamentos de Guatemala; que fueron referidos por el Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt, Unidad Nacional de Oncología Pediátrica, Instituto Guatemalteco de Seguridad Social y dos clínicas privadas.

1.4.2 Variables:

1.4.2.1 Variables dependientes: no aplica a este estudio por ser descriptivo.

1.4.2.2 Variables independientes: no aplica a este estudio por ser descriptivo.

1.4.3 Indicadores:

El indicador este proyecto fue de tipo cualitativo y consistió en determinar la presencia o ausencia del transcrito PML-RAR α ; para ello se evaluaron los productos de PCR amplificados en las muestras de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda; que evidenciaron la presencia de la t(15;17). Después de realizar una RT-PCR se observó a través de una electroforesis en gel de agarosa, la presencia de los fragmentos de 178 pb (bcr2), 214 pb (bcr1) y 289 pb (bcr3) correspondientes a la presencia del transcrito PML-RAR α .

1.4.4 Estrategia Metodológica:

1.4.4.1 Población:

La población objetivo de este estudio la integran todos los pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio de leucemia mieloide aguda; sin importar la edad.

La técnica de muestreo a utilizar es por conveniencia. Y los criterios de inclusión son:

- Paciente con leucemia mieloide aguda recién diagnosticada
- Edad: 0 años a 99 años.

Los criterios de exclusión para participar en este estudio son:

- Paciente con otras formas de leucemia
- Pacientes con quimioterapia o tratamiento actual
- Paciente con leucemia mieloide aguda que experimente una recaída.

1.4.4.2 Muestra:

Ochenta y cuatro pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda referidos por los médicos Hematólogos; Dr. Julio Cáceres, Dr. Mauricio Villegas, Dra. Silvana Torselli, y médicos tratantes de la Unidad Nacional de Oncología Pediátrica –UNOP- que presentaron todos los criterios de inclusión mencionados anteriormente.

La cantidad de muestras que se analizaron, fueron todas las recolectadas en el período de un año y medio de realización del proyecto (84 a partir de enero 2013).

1.4.5 El Método:

1.4.5.1 Materiales y suministros de laboratorio:

- Guantes de nitrilo libres de polvo.
- Puntas de pipeta desechables PCR clean de volúmenes variables.
- Pipetas de Pasteur de plástico
- Liga de hule.
- Aguja Vacutainer® 21 x 1 ½ G.
- Camisa para Vacutainer®.
- Tubos Vacutainer® de tapón morado (EDTAK2) con capacidad de 4 cc al vacío.
- Jeringas con aguja 21 x 1 ½ G.
- Papel mayordomo.
- Algodón.
- Fichas de recolección de datos.
- Hojas de consentimiento informado.
- Marcador indeleble negro.

- Gradillas cooler.
- Tubos PCR clean de 0.2, 0.6 y 1.6 mL
- Guardianes para el descarte de material punzocortantes.
- Papel parafilm

1.4.5.2 Reactivos:

A. Lisis diferencial de eritrocitos:

- Bicarbonato de sodio
- Cloruro de amonio
- EDTA
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio.
- Etanol 70 %
- Hipoclorito de sodio 5%
- Solución salina fisiológica 9 %

B. Extracción de ARN con TRIZOL:

- RNasezap
- Trizol
- Isopropanol
- Etanol 75 %
- Agua DPC
- Cloroformo

C. RT-PCR:

- Kit de retrotranscripción Applied Biosystems
- H₂O DEPC

D. PCR convencional:

- Kit de amplificación (DNA polimerasa, buffer 10X, MgCl₂)
- Deoxinucleótidos, 10 mM
- Primers específicos de detección (10 picomoles)

- H₂O DEPC

E. Electroforesis y tinción de geles:

- Agarosa LE
- Buffer TAE 1x (Tris Base, EDTA, ácido acético)
- Gel Red

1.4.5.3 Procedimientos de laboratorio:

A. Muestra biológica:

Se utilizaron muestras de médula ósea o sangre periférica, cuyo diagnóstico presuntivo fue Leucemia Mieloide Aguda y que acudieron a los distintos hospitales nacionales, durante el período de dos años correspondientes a febrero 2012 hasta diciembre 2014. La muestra fue recolectada previo a la firma del consentimiento informado y aceptación de los pacientes y/o encargados (en caso de menores) a participar en el estudio (Ver Anexo 1).

Las muestras fueron recolectadas mediante punción aspirativa de 1 cm³ de sangre medular; o a través de una flebotomía estándar para la obtención de sangre periférica. Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA y almacenadas a 4 °C por un período máximo de 24 horas hasta su procesamiento.

B. Obtención de glóbulos blancos por lisis diferencial de eritrocitos:

La forma bicóncava de los eritrocitos, hace su membrana particularmente sensible a cambios de osmolaridad; y ésta característica permite hacer una lisis diferencial para obtener células blancas mediante el uso de soluciones de alta osmolaridad con cloruro de amonio [5-10].

C. Extracción de ARN con TRIZOL:

El RNA total se extrajo utilizando Trizol comercial (INVITROGEN, USA) a partir de las suspensiones de leucocitos obtenidos en el proceso anterior. El procedimiento fue realizada según las indicaciones de fabricante (ver manual en www.invitrogen.com) [5-10].

D. Retrotranscripción:

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1µg de RNA extraído y se utilizó el kit comercial de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, que utiliza hexámeros al azar para la síntesis en 20µl de reacción en condiciones estándar.

E. PCR para detección del transcrito y gen control ABL:

La comprobación de la calidad del cDNA obtenido luego de la retrotranscripción se realizó de forma indirecta amplificando el gen Abelson (ABL), ya que éste reúne las mejores condiciones para la utilización como gen control de la expresión [5-10].

La PCR para la evaluación del transcrito de fusión, se estandarizó utilizando las secuencias de los cebadores y las precauciones descritas por Dongen y colaboradores para mantener la calidad de la reacción de la cadena de la polimerasa [5-10]. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron 30 segundos a 95°C, 35 ciclos de 60 segundos a 94° C , 65 segundos a 65° C y 65 segundos a 72° C, sin extensión final.

F. Electroforesis en gel de agarosa:

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, después de la tinción por 25 minutos con GelRed 2,000X. La presencia del transcrito fue comprobada con la visualización de fragmentos de 178 pb (bcr2), 214 pb (bcr1) y 289 pb (bcr3) correspondientes a la presencia del transcrito PML-RAR α

G. Análisis de resultados:

La recopilación de información del paciente y de los exámenes realizados se realizó mediante la boleta de recolección de datos (Ver Anexo 2).

1.4.5.4 Consideraciones éticas:

Se solicitó mediante un consentimiento escrito informado la aceptación expresa de los pacientes de participar en el estudio y proporcionar los datos necesarios para su

ejecución, en el caso de los menores de edad, el encargado responsable del paciente debió aceptar el consentimiento (Anexo 1). Además el presente estudio fue sometido a un comité de bioética asociado a la institución.

1.4.6 La Técnica Estadística:

1.4.6.1 Tipo de estudio:

El presente estudio fue de tipo descriptivo, prospectivo, longitudinal. Descriptivo ya que se estableció, por primera vez en Guatemala, la presencia de marcador genético de buen pronóstico como lo es la t(15;17) que produce el transcrito de fusión PML-RAR α en Leucemia Mieloide Aguda. Fue longitudinal y prospectivo, porque se inició en enero del 2013 y se recolectaron muestras por un período de un año y medio aproximadamente.

1.4.6.2 Tipo de estudio:

El muestreo realizado fue de tipo aleatorio, por conveniencia incluyendo a los pacientes con diagnóstico sugestivo de Leucemia Mieloide Aguda referidos en el período de febrero 2013 a diciembre 2014 que cumplieron con todos los criterios de inclusión y que aceptaron participar en el estudio.

1.4.6.3 Diseño estadístico:

Las variables sociodemográficas y hematológicas fueron recolectadas mediante una ficha de recolección de datos (Anexo 2).

Las variables obtenidas a través de la ficha de datos fueron tabuladas a de una base de datos creada en el programa Excell, en el que se realizó el análisis.

- Estadística descriptiva general de la muestra en el programa estadístico Excell.
- Las variables cuantitativas se analizaron en base a la mediana de la muestra.

1.4.7 Instrumentos a utilizar:

Durante la parte experimental de este proyecto, se utilizó una gran diversidad de equipo de laboratorio y análisis:

- Refrigeradora.
- Pipetas automáticas de volumen variable de 1.0 – 10.0 μ L

- Pipetas automáticas de volumen variable de 10 – 100 μL
- Pipetas automáticas de volumen variable de 100 – 1000 μL
- Centrífuga.
- Autoclave.
- Cabina de seguridad biológica tipo II.
- Balanza analítica.
- Termociclador
- Vórtex
- Congelador $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Potenciómetro.

PARTE II

II. 1 MARCO TEÓRICO

A. Aplicación de las técnicas citogenéticas y moleculares en el estudio del cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que se produce un crecimiento desordenado de un clon celular, debido a una alteración en el proceso de crecimiento celular, en la diferenciación celular o en la apoptosis celular. Es una enfermedad considerada de origen genético adquirido; esto quiere decir que su causa son las distintas alteraciones genéticas que se han desarrollado y adquirido con el transcurso del tiempo.

Las principales técnicas que actualmente se utilizan para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de las neoplasias son las técnicas citogenéticas y moleculares. Las técnicas de análisis citogenético permiten estudiar de manera global los 46 cromosomas, y detectar cualquier alteración presente. Estas técnicas se han desarrollado mejor en neoplasias hematológicas debido a la facilidad de obtención de metafases en tejidos líquidos. En neoplasias sólidas se tiene la dificultad de obtención de metafases adecuadas, por lo que la utilidad de las técnicas citogenéticas es limitada.

Las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa – PCR- y sus distintas variedades, se han desarrollado también ampliamente para el estudio de distintas neoplasias. Sin embargo estas técnicas no son pruebas de screening, por lo que se necesita conocer específicamente la alteración genética que se desea estudiar. Entre las ventajas de las técnicas moleculares sobre las citogenéticas es que poseen una mayor sensibilidad y especificidad.

En el estudio de neoplasias hematológicas es posible la aplicación de métodos de biología molecular por medio de la detección de transcritos (mRNA de una sección genética específica). Estas técnicas son de gran utilidad para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de la enfermedad mínima residual (EMR) y, por tanto, ayudan en las decisiones clínicas para definir nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan la disminución de la actividad oncogénica [11].

En resumen, para un estudio genético completo de una neoplasia hematológica y algunos tumores sólidos se recomienda utilizar tanto las técnicas citogenéticas como las moleculares [11].

B. Neoplasias Hematológicas:

Las neoplasias hematológicas forman un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas. La leucemia constituye una colección heterogénea de neoplasias originadas en el tejido formador de sangre, que se caracteriza por la expansión clonal de células hematopoyéticas como resultado de una alteración en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, en cualquiera de las etapas de maduración de las células sanguíneas, habitualmente acompañada de la invasión al torrente sanguíneo y producción de metástasis, con mayor o menor grado de desorganización de los tejidos invadidos [11,12].

Las leucemias se clasifican basándose en el tipo de células afectadas y en su estado de maduración. Las agudas se caracterizan por la presencia de células muy inmaduras (denominadas blastos) y por un curso rápidamente mortal. Las crónicas se caracterizan por una población expandida de células que proliferan y que conservan su capacidad para diferenciarse y madurar. Se distinguen dos variantes: linfocíticas y mielocíticas. Así pues de forma rudimentaria las leucemias se pueden clasificar en cuatro tipos: leucemia linfocítica aguda (linfoblástica) (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica aguda (mieloblástica) (LMA) y leucemia mielocítica crónica (LMC) [11,12].

El diagnóstico se realiza, considerando, además de las manifestaciones clínicas, estudios de laboratorio que incluyen hemograma, frotis de sangre periférica, inmunofenotipo, biopsia y el frotis de médula ósea. En la actualidad la tinción con inmunohistoquímica de células malignas en sangre periférica, es uno de los métodos más específicos para clasificar las leucemias por lo cual se recomienda realizar este procedimiento en todo paciente con esta enfermedad, al igual que el seguimiento de un protocolo que combine la citomorfología y citoquímica con el inmunofenotipo, y siempre que sea posible acompañado por métodos citogenéticos y moleculares permitiendo con ello

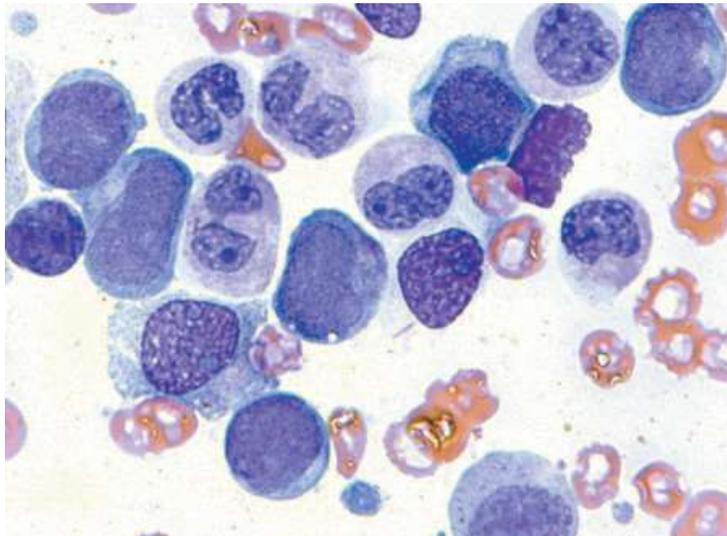
no solo un diagnóstico certero, sino que además proporcionar una amplia información sobre el pronóstico del paciente y el tratamiento a seguir [11,12].

C. Leucemia Mieloide Aguda:

1. Generalidades y Epidemiología:

Las leucemias mieloides agudas son desórdenes malignos de algunos clones celulares hematopoyéticos que se producen como resultado de alteraciones en genes que participan en el ciclo celular. Las alteraciones genéticas presentes limitan la diferenciación de glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas, dando lugar a una proliferación de células inmaduras o blastos (Ver Figura No.1).

Figura No. 1: Frote de Médula Ósea de un paciente con LMA.



Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

En Estados Unidos aproximadamente 11,000 personas son diagnosticadas anualmente de LMA; la incidencia de LMA en estos países desarrollados es de 2.7

por 100,000 habitantes, comparado con 1.5 por 100,000 de Leucemia Linfoblástica Aguda.

En Guatemala no se cuentan con datos epidemiológicos acerca de esta incidencia; en un documento publicado en American Society of Cancer, se reporta que la incidencia de leucemias en general en Guatemala es de 6.3 por cada 100,000 habitantes [13].

La mayor parte de LMA se diagnostica en adultos, siendo la media internacional de 64 años. Se ha visto una mayor incidencia de LMA en hombres y en razas europeas, sin embargo estudios recientes han demostrado que la leucemia promielocítica aguda, un subtipo de LMA, es más común en poblaciones latinas.

Algunos desordenes aumentan la incidencia de LMA, entre ellas se pueden mencionar la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, síndrome de Kostmanns y síndrome de Down entre otros. Y por último la LMA puede ser secundaria a un síndrome mielodisplásico.

Los principales síntomas asociados a LMA, son fatiga, sangrado, fiebre e infecciones. En estos pacientes es común la pancitopenia, usualmente la hemoglobina es menor a 12 g/dl y únicamente el 10% de los pacientes tienen un recuento leucocitario arriba de 100,000 [11,12].

2. Diagnóstico y Clasificación:

El diagnóstico de leucemia aguda se realiza demostrando un número incrementado de la blastos en médula ósea. Según el criterio del grupo cooperativo Francés-Americano-británico (FAB), se debe encontrar un porcentaje de blastos mayor al 30% en 200 células contadas, para establecer un diagnóstico de leucemia aguda; y según la OMS es suficiente un 20%. Una vez establecido el diagnóstico, se hace la diferenciación morfológica de mieloide o linfoide [11, 12].

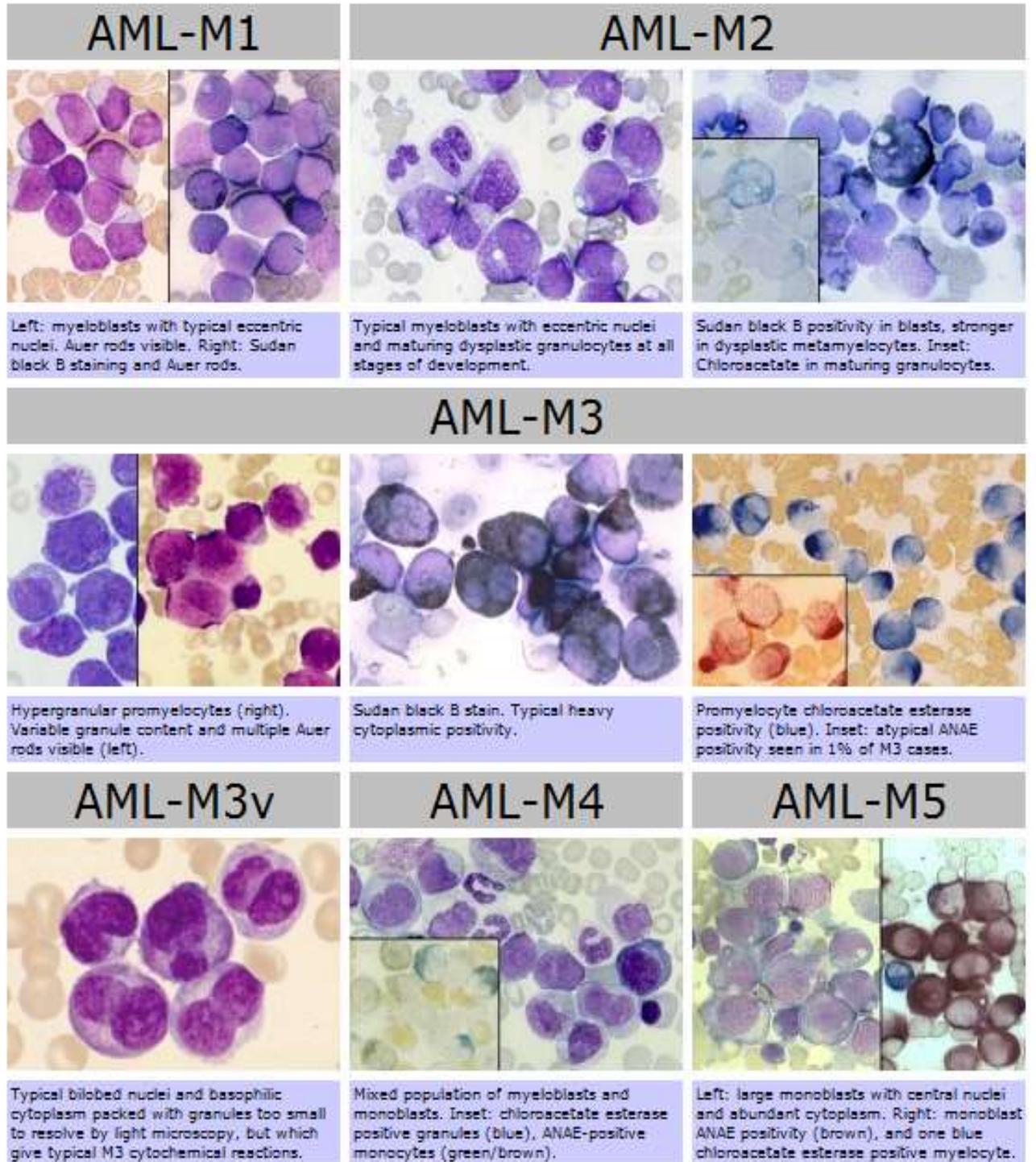
El inmunofenotipo puede ayudar a la clasificación de la leucemia; una leucemia de origen mieloide puede expresar los antígenos CD13, CD33, C-Kit, CD14, CD64, CD41, CD61 y glicoforina A; y por otro lado una leucemia de origen Linfoide puede expresar los antígenos CD10 CD19, CD20, CD2, CD3, CD4, CD5 Y CD8. [11,12] En la tabla No. 1, se puede observar la clasificación LMA según FAB (Figura No. 2 y 3).

Tabla No. 1: Clasificación de LMA según FAB

SUBTIPO	DESCRIPCIÓN	CARACTERÍSTICAS	CITOGENÉTICA	PRONOSTICO
MO	Indiferenciada	Presencia de mieloblastos	-----	Pobre
M1	AML	Mieloblastos, con poca maduración	-----	Pobre
M2	AML con diferenciación	>10% granulocitos maduros	t(8;21)	Bueno
M3	Promielocítica	Células promielocíticas	t(15;17)	Bueno
M4	Mielomonocítica	Mielocitos diferenciados, monocitos y eosinófilos	Inv(16)	Intermedio
M5	Monocítica	Diferenciación monocítica	-----	Pobre
M6	Eritroleucemia	>50% de células nucleadas y eritroblastos	_____	Pobre
M7	Megacarioblástica	Antígenos plaquetarios	-----	Pobre

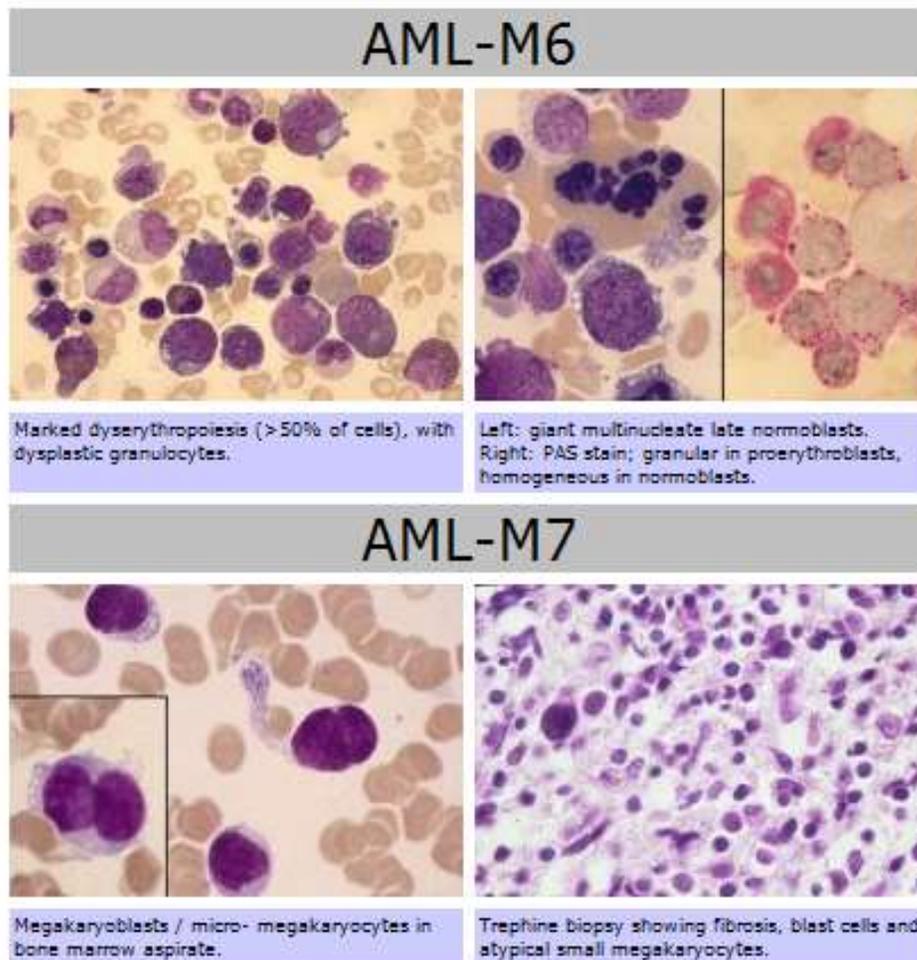
Tomado de: Bennett, et al. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med.*, 103, 620-625

Figura No. 2: Morfología de la LMA según clasificación FAB. Se observan frotos de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda de los subtipos AML M1 a AML-M5 [14]



Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

Figura No. 3: Morfología de la LMA según clasificación FAB. Se observan frotos de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda de los subtipos AML M6 y AML M7 [14]



Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

D. Genética de la Leucemia Mieloide Aguda:

Como fruto de la gran variedad de investigaciones que se han realizado mundialmente, se ha establecido las principales alteraciones citogenéticas y moleculares presentes en la leucemia mieloide aguda (LMA), y de estas se han seleccionado algunas que poseen mayor interés clínico, debido a que brindan información sobre pronóstico y en algunos casos sobre tratamiento.

Las alteraciones frecuentemente encontradas en LMA son de tres tipos: alteraciones citogenéticas, mutaciones en genes y sobreexpresión de genes.

En la Tabla No. 2, se listan las principales alteraciones citogenéticas que se han reportado en la literatura; en donde se puede observar que aproximadamente un 40% de la LMA tienen cariotipo normal; y las alteraciones en cariotipo más frecuentes son: t(8;21)(q22;q22); t(15;17)(q22;q11.2.12) y la Inv(16)(p13q22); que confieren un pronóstico favorable; en la misma tabla se puede observar en un 10-20% la monosomía en el cromosoma 7, la cual confiere un pronóstico muy pobre y por lo tanto orienta a esquemas de quimioterapia más agresivos e inclusive trasplante de médula ósea [15-19].

Tabla No. 2: Alteraciones citogenéticas más frecuentes en LMA

ALTERACION	MRC	CALGB	SWOG/ECOG
	Grimwade et al, 1998 N= 1612 (%)	Byrd et a, 2002 N= 1213 (%)	Slovak et al, 2000 N= 609 (%)
Normal	680 (42%)	582 (48 %)	244(40%)
t(8;21)(q22;q22)	122(8%)	81 (7%)	50 (8%)
t(15;17)(q22;q11.2.12)	198 (12%)	18 (2%)	27 (4%)
Inv(16)(p13q22) ó t(16;16)(p13q22)	57 (4%)	96 (8%)	53 (9%)
Alteraciones en 11q23	60 (4%)	54 (5%)	42 (7%)
Trisomía 8	48 (3%)	41 (3%)	25 (4%)
t(6;9)(p23;q34)	-----	8 (0.7%)	11 (2%)
t(9;22)(q34;q11)	-----	-----	7 (1%)
Alteraciones en 3q	40 (3%)	12 (1%)	12 (2%)
Alto riesgo: cariotipo complejo, del5q, 7q, monosomía 5 y 7	163 (10%)	248 (22%)	106 (20 %)

Tomado de: Santamaría, C. (2009). *Estudio de marcadores moleculares para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Médicas. Universidad de Salamanca.

Por otro lado se ha establecido en diversos estudios el pronóstico asociado a las principales alteraciones citogenéticas; las cuales se resumen en la Tabla No. 3; en donde se clasifican como alteraciones de riesgo favorable, intermedio y desfavorable [5-23].

Tabla No. 3: Pronóstico de las principales alteraciones citogenéticas en LMA [15, 19]

GRUPOS DE RIESGO	TIPO ALTERACIÓN	DESCRIPCIÓN
FAVORABLE	Estructural balanceada	t(8;21)(q22;q22)
		t(15;17)(q22;q11.2.12) Inv(16)(p13q22) ó t(16;16)(p13q22)
INTERMEDIO		Cariotipo normal
	Estructural balanceada	t(9;11)(p22;q23)
	Estructural no balanceada	del(7q) del(9q) del(11q)
	Numérica	-Y +8 +11 +13+21+22
DESFAVORABLE		Cariotipo complejo*
	Estructural Balanceada	Inv(3)(q21;q26)
		t(3;3)(q21;q26)
		t(6;11)(q27;q23)
		t(11;19)(q23;p13)
t(9;22)(q34;q11)		
(t(6;9)(p23;q34)		
Estructural no balanceada	del(5q) del(7q) alt. En 3q	
Numérica	-5 -7	

* Más de 3 anomalías, excluyendo la inv(16), t(16;16), t(8;21), t(15;17) ó t(9;11)

Tomado de: Santamaría, C. (2009). *Estudio de marcadores moleculares para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Médicas. Universidad de Salamanca.

También, se han encontrado mutaciones en genes que tiene relación con pronóstico; y que es importante estudiar principalmente en el grupo de pacientes que poseen un cariotipo normal; en la Tabla No.4, se muestran los principales genes asociados a LMA. De los cuales los de mayor porcentaje son el gen FLT3, que confiere mal pronóstico; y el gen NPM1 que confiere buen pronóstico [5-23].

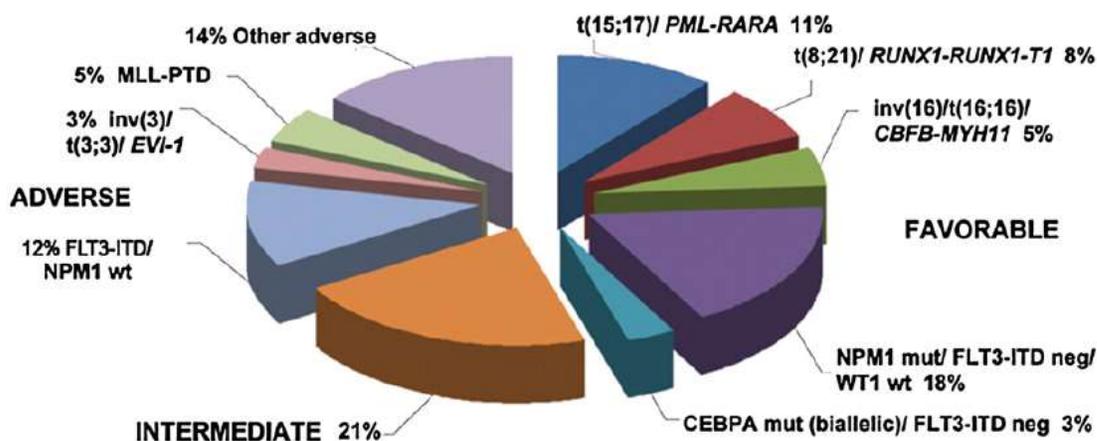
Tabla No. 4: Genes mutados con mayor frecuencia en Leucemia Mieloide Aguda [15-19]

MUTACIONES				
Símbolo gen	Localización Cromosómica	Incidencia en LMA	Incidencia en LMA-cariotipo normal	Impacto pronóstico
FLT3	13q12	31 %	45-54%	Adverso
NPM1	5q35	30-35%	46-62%	Favorable
MLL	11q23	5%	8-11%	Adverso
CEBPA	19q13.1	12%	15-19%	Favorable
N-RAS	1p13.2	10%	9%	Incierto
KIT	4q11-q12	1-2%	6-10% en t(8;21)	Adverso

Tomado de: Santamaría, C. (2009). *Estudio de marcadores moleculares para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Médicas. Universidad de Salamanca.

Por último existen algunos genes que pueden encontrarse sobreexpresados en LMA, y que además brindan información de pronóstico (Tabla No. 5) y en la figura No. 4 se observa una gráfica que incluye las principales alteraciones genéticas en LMA junto con la información sobre pronóstico.

Figura No. 4: Alteraciones citogenéticas y moleculares más frecuentes en LMA. Estas alteraciones son las que definen los diferentes grupos de riesgo



Tomado de: American Society of Hematology –ASH– [15-19]

Tabla No.5: Algunos genes que se encuentran sobreexpresados en LMA [5,19]

SOBREEXPRESION				
Símbolo	Localización Cromosómica	Incidencia en LMA	Incidencia en LMA-CN	Impacto Pronóstico
BAALC	8q22.3		65%	Adverso
ERG	21q22.3			Adverso
EVII	3q26	14%		Adverso
MN1	22q11-12.1			Adverso
PRAME	22q11.22	30-64%		Favorable
RHAMM	5q33.2	70%		-----
WT1	11p13	80-93%		Adverso

Tomado de: Santamaría, C. (2009). *Estudio de marcadores moleculares para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Médicas. Universidad de Salamanca.

E. Transcrito PML-RAR α :

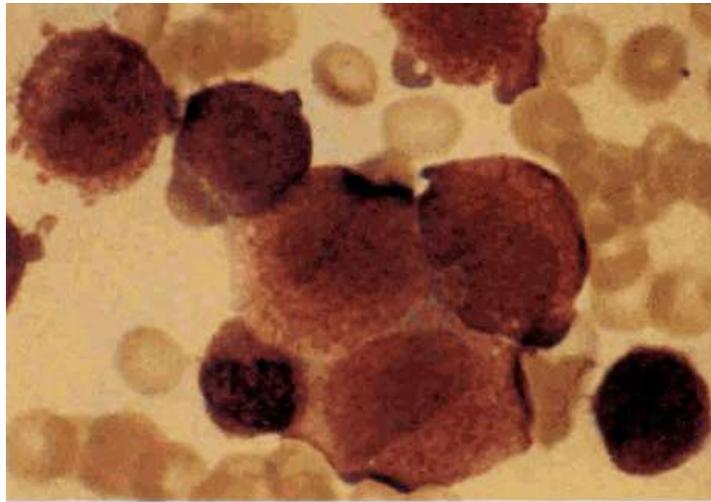
1. Características generales y clínicas:

La translocación t(15,17)(q22;q12) se encuentra frecuentemente en la leucemia llamada promielocítica (LPA) aguda AML-M3, en donde las células que predominan son los promielocitos. La LPA comprende el 8% de todos los casos de LMA y ocurre predominantemente en adultos con una media de edad de 40 años [20].

Las características morfológicas típicas de LPA son: núcleos en forma de riñón o bilobulados, citoplasma densamente poblado con gránulos grandes (rosa brillante, rojo o púrpura en tinciones de Romanowsky), fascículos de bastones de Auer dentro del citoplasma (células en haz), bastones de Auer más grandes que en otros tipos de LMA, reacción intensamente positiva a la mieloperoxidasa (MPO) en todos los promielocitos leucémicos y promielocitos leucémicos en la sangre ocasionalmente (Ver Figura No. 5) [20].

Esta alteración ha despertado gran interés en hematología, debido a que los pacientes que tienen esta translocación responden muy bien al tratamiento con ácido retinoico, el cual actúa induciendo la diferenciación celular [21].

Figura No. 5: Células tumorales en médula ósea, con la alteración t(15;17).

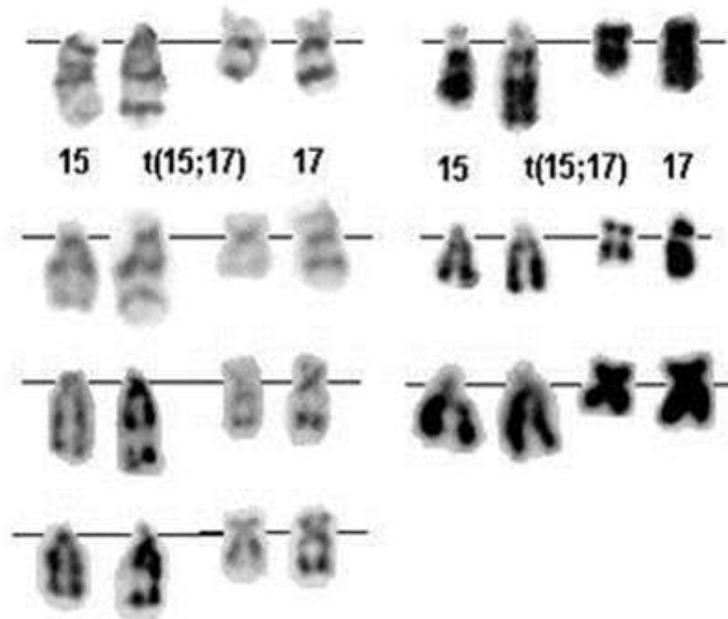


Tomado de: Grignani F, et al. (1994). Acute Promyelocytic Leukemia: From Genetics to Treatment. *Blood*, 83, 10-25.

En la LPA, el gen α receptor del ácido retinoico (RAR α) en 17q12 se fusiona con un factor de regulación nuclear en 15q22 (gen de la leucemia promielocítica o PML) que da como resultado un transcripto de la fusión de los genes LPM/RAR α . La proteína anormal que resulta de esta fusión juega un papel crucial en la leukemogénesis promielocítica [20].

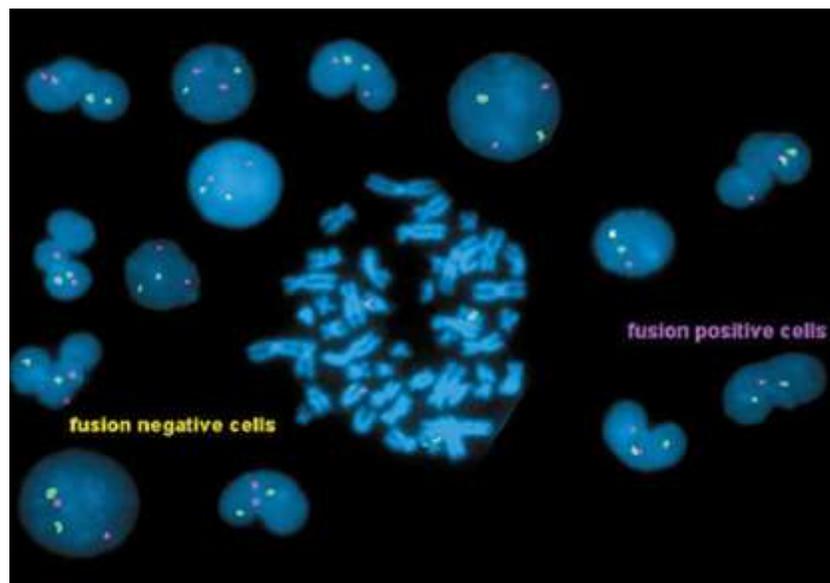
Los puntos exactos de rotura se encuentran en 15q22-q24 y 17 q11-q21. La expresión de este gen está estrictamente asociado a promielocitos neoplásicos. La translocación 15; 17 se puede observar al cariotipo, por FISH y por molecular (Ver Figura No. 6 y 7) [21].

Figura No. 6: Translocación entre cromosoma 15 y 17. En cariotipo se observan los dos cromosomas anormales formados como resultado de la unión anormal de los dos cromosomas.



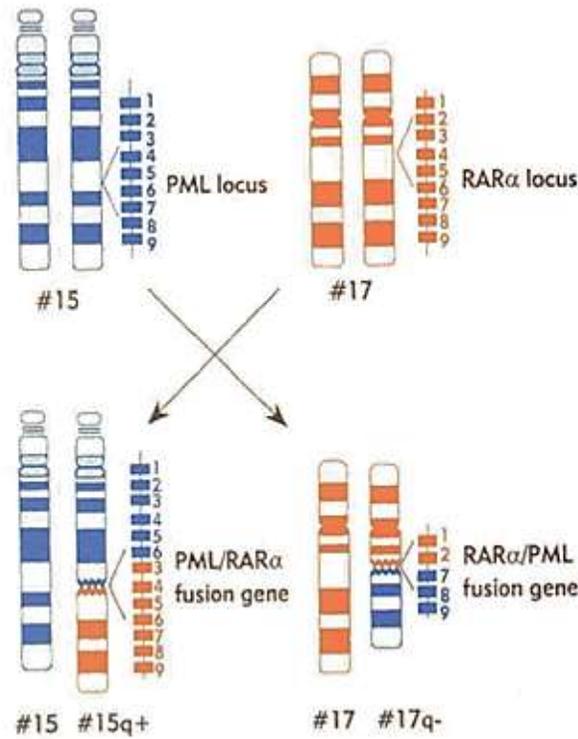
Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

Figura No. 7: Translocación entre cromosoma 15 y 17 por FISH. En la figura se observan las señales de fluorescencia (roja y verde) que demuestran la fusión anormal de los dos cromosomas.



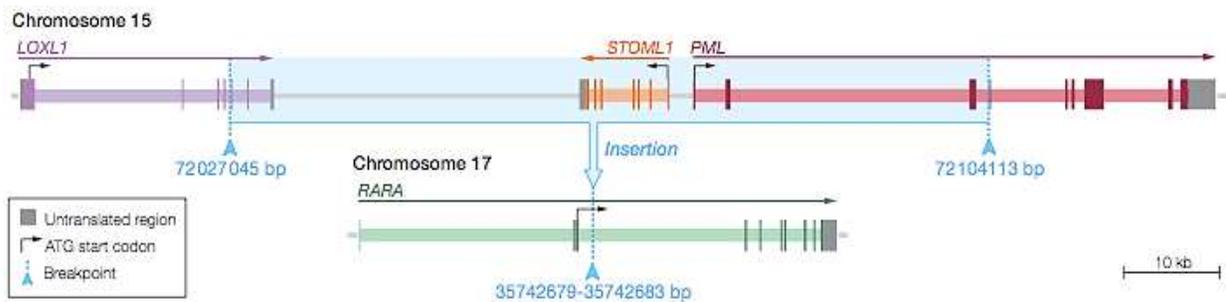
Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

Figura No. 8: Producción de t(15;17). En la figura se observan los puntos de ruptura de los genes PML y RAR α , que forman la translocación



Tomado de: Grignani F, et al. (1994). Acute Promyelocytic Leukemia: From Genetics to Treatment. *Blood*, 83, 10-25.

Figura No. 9: Transcrito de fusión PML- RAR α . La translocación entre los cromosomas 15 17 provoca la formación del transcrito quimérico.



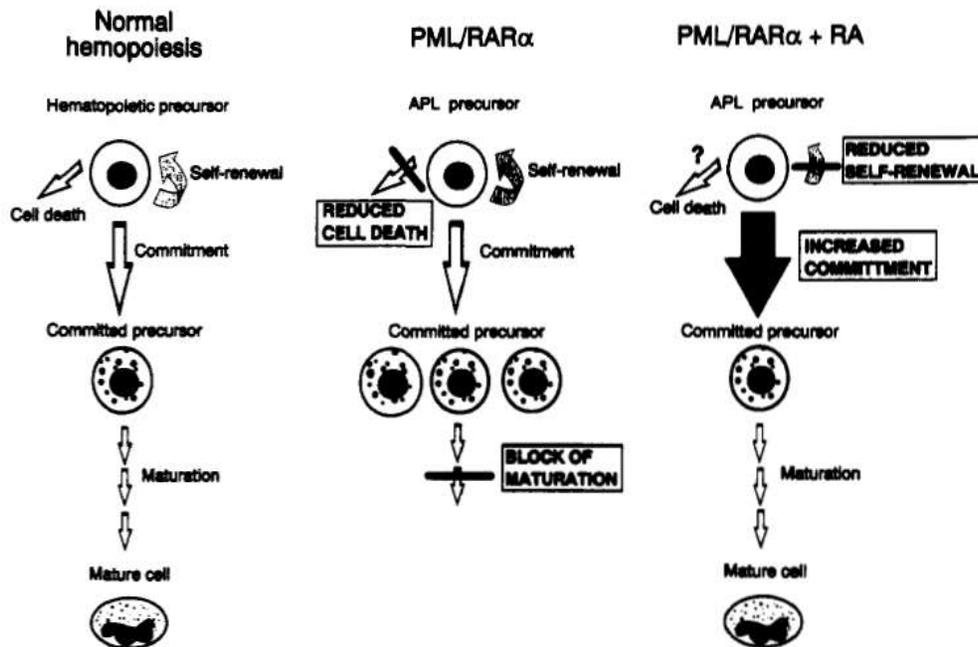
Tomado de: Welch *et al.* (2011). Use of Whole-genome Sequencing to Diagnose a Cryptic Fusion Oncogene. *JAMA*, 305, 1577-1584.

En el gen PML los puntos de rotura pueden encontrarse en el intrón 3, intron 6 y exón 6. En el gen RAR α suele darse el punto de rotura en el intrón 2. Se pueden obtener tres transcritos de tamaño variable: Una forma corta llamada S, en la que se fusionan los exones 3 de ambos genes; una forma larga llamada L, en la que se fusionan el exón 6 de PML con el exón 3 de RAR α ; y por último una forma variable que se llama V, en la que hay una fusión de sólo una parte del exón 6 de PML con el exón 3 de RAR α (Ver figura No. 8 y 9) [20,21]

2. Papel del transcrito PML-RAR α en la hematopoyesis:

Este transcrito tiene un efecto predominante en la diferenciación de promielocitos. Se ha comprobado que en líneas celulares U937 que expresan PML-RAR α , se produce un fallo en la diferenciación. Este efecto se bloquea cuando estas células se someten a altas dosis de ácido retinoico. Todo esto sugiere que este transcrito actúa bloqueando la maduración (ver figura No. 10) [21].

Figura No. 10: Papel de PML-RAR α en la hematopoyesis. Se puede observar de izquierda a derecha una hematopoyesis normal; la hematopoyesis con PML-RAR α (se bloquea la maduración y la apoptosis) y en la que se supera este bloque mediante el tratamiento con ácido retinoico.



Tomado de: Shigeseda K, et al. (2004). Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBF β /PEBP2B-MHY11. *Oncogene*. 23, 4297–4307.

Otro aspecto que se comprobó es que las líneas celulares U937 que expresan el transcrito se escapan de la muerte programada, por lo tanto se observa que estas células poseen mayor sobrevivencia que las células normales. Parece ser que el transcrito PML-RAR α , actúa interfiriendo con la función normal y vías que dependen del gen PML y del RAR α [21].

3. Tratamiento con ácido transretinoico:

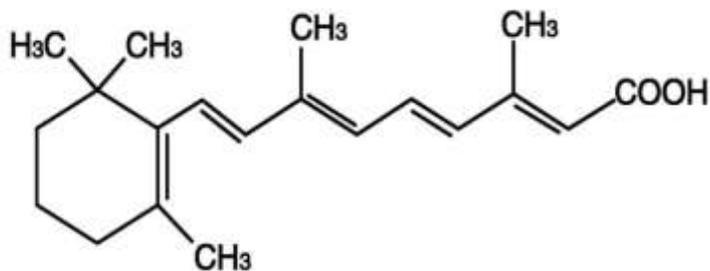
Como se mencionó anteriormente esta leucemia es específicamente sensible al tratamiento con ácido holo *trans*-retinoico (ATRA, tretinoína), que actúa como fármaco diferenciador. Las altas tasas de remisión completas en la leucemia promielocítica se obtienen combinando el tratamiento a base de ATRA con la quimioterapia [20,21].

La leucemia promielocítica aguda (LPA) es el subtipo M3 de AML. Los pacientes con APL se encuentran entre los pacientes que se curan con más frecuencia. En la LPA, las células que se acumulan en la médula se pueden identificar como promielocitos, el precursor de las células sanguíneas posterior a los mieloblastos [20,21].

El ácido holo-*trans*-retinoico (ATRA, por sus siglas en inglés), un derivado de la vitamina A, es un componente estándar de la terapia de inducción para la LPA. El ATRA también se conoce como tretinoína (Vesanoid®). El ácido retinoico es capaz de inducir el desarrollo de los promielocitos leucémicos, para que se conviertan en células maduras (neutrófilos) (Ver figura 11) [20,21].

Causa una disminución notable en la concentración de las células blásticas leucémicas en la médula ósea, y por lo general posteriormente se da una remisión. Usando solo, el ATRA puede inducir una remisión a corto plazo en al menos el 80 por ciento de los pacientes. El tratamiento con ATRA debe seguirse con quimioterapia, o se debe administrar en forma conjunta con ésta, a fin de que la remisión sea duradera. El ATRA a menudo minimiza los efectos secundarios de la quimioterapia [20,21].

Figura No. 11: Estructura química del ácido trans-retinoico. Se observa la estructura del ácido transretinoico.



Tomado de: Grignani F, et al. (1994). Acute Promyelocytic Leukemia: From Genetics to Treatment. *Blood*, 83, 10-25.

La tasa de remisión de los pacientes con LPA tratados con ATRA y una antraciclina, tal como la idarrubicina, se encuentra entre el 70 y el 80 por ciento aproximadamente.

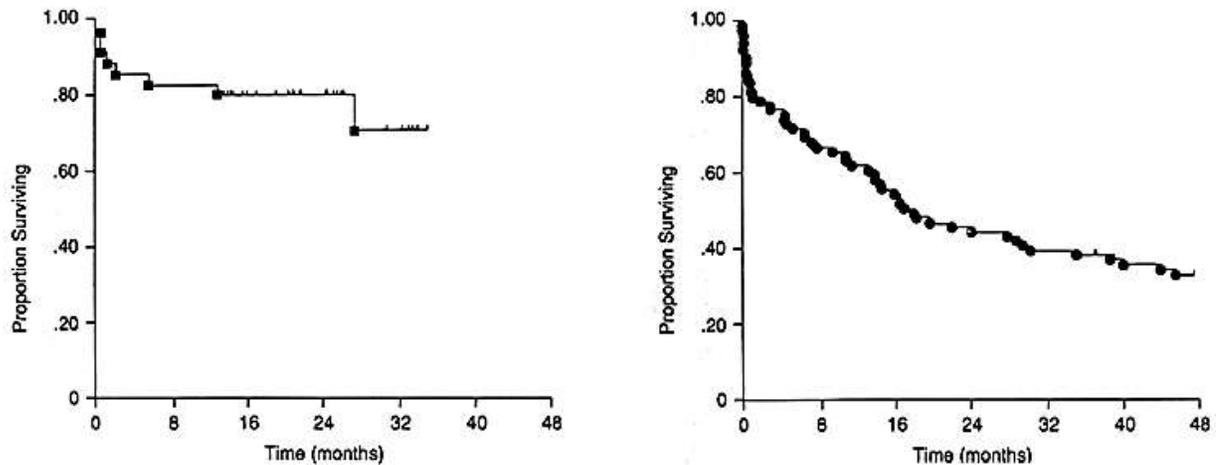
Sin embargo, ocurren problemas de hemorragias durante las fases iniciales del tratamiento, resistencia al tratamiento y recaídas en un porcentaje de los pacientes, tal como sucede en algunos pacientes con otros tipos de AML. Por lo tanto, es necesario realizar seguimiento médico a largo plazo a los pacientes en remisión, para identificar quiénes están curados y quiénes necesitan recibir más terapia [20,21].

También se está investigando la duración ideal del tratamiento de mantenimiento. Actualmente, consiste en 2 años de tratamiento con 6-mercaptopurina (6-MP), metotrexato y ATRA [20,21].

Una pequeña cantidad de pacientes con LPA presentan una forma persistente de la enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés) al final de la terapia de consolidación. Puede que estos pacientes se beneficien del tratamiento con trióxido de arsénico (Trisenox®), seguido de un alotrasplante de células madre, si hay disponible un donante con HLA compatible [20,21].

En la Figura 12, se observa al inicio la curva de supervivencia de pacientes tratados con ATRA, y abajo los pacientes tratados únicamente con quimioterapia, en estas curvas se puede observar claramente la mayor supervivencia de los pacientes tratados con ATRA.

Figura No. 12: Gráfica de supervivencia de pacientes tratados con ATRA. En estas se observa la supervivencia de los pacientes tratados con ATRA es mejor a la observada sin esta terapia.



Tomado de: Stanley, R.; *et al.* (1994). All-trans Retinoic Acid for Acute Promyelocytic Leukemia: Results of the New York Study. *Annals of Internal Medicine*. 120(4):278-286.

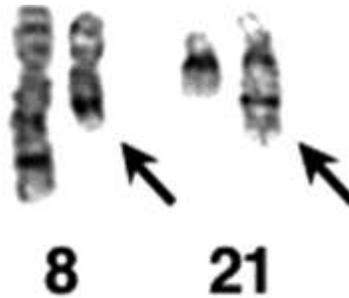
F. Transcrito AML-ETO:

1. Características generales y clínicas:

La $t(8;21)(q22;q22)$ fue descrita por primera vez en 1973 por la Dra. Janet Rowley; y es una translocación balanceada que se da entre el cromosoma 8 y el cromosoma 21; produciendo como resultado la fusión del gen AML1, localizado en la región 21q22 y el gen ETO localizado en el gen 8q22. (Ver Figura No. 13). El nuevo transcrito quimérico AML1-ETO formado en el cromosoma 8 derivado, codifica para una proteína que pertenece a la familia de CBF α 2 core-binding-factor heterodímero. Entre las funciones normales del CBF α 2 se encuentran la regulación de la diferenciación hematopoyética, y también coopera con otros factores de transcripción que activan genes relacionados con la hematopoyesis.

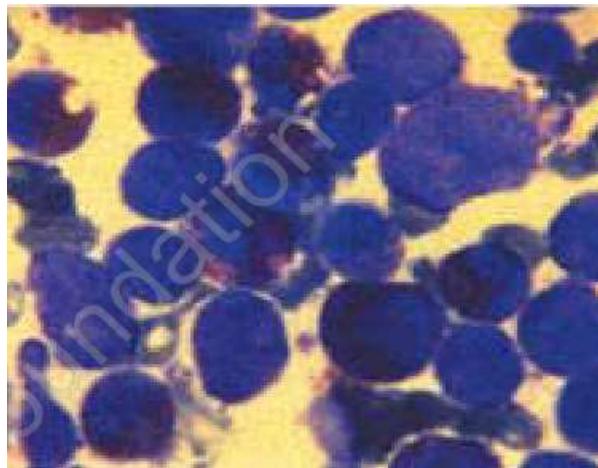
El transcrito quimérico AML1-ETO carece de estas funciones, dando como consecuencia silenciamiento de genes que controlan el crecimiento y diferenciación celular de células mieloides [22, 23].

Figura No. 13: Cariotipo de la translocación 8;21 que da lugar al transcrito AML1-ETO. Se puede observar en los cromosomas 8 y 21 la pérdida o ganancia de un fragmento que se une al otro cromosoma implicado en la translocación.



Tomado de: Peterson, L.; *et al.* (2007) The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Blood*, 110, 799-805.

Figura No. 14: Morfología típica de LMA con la translocación t(8;21). Se observa eosinofilia además de las células leucémicas.



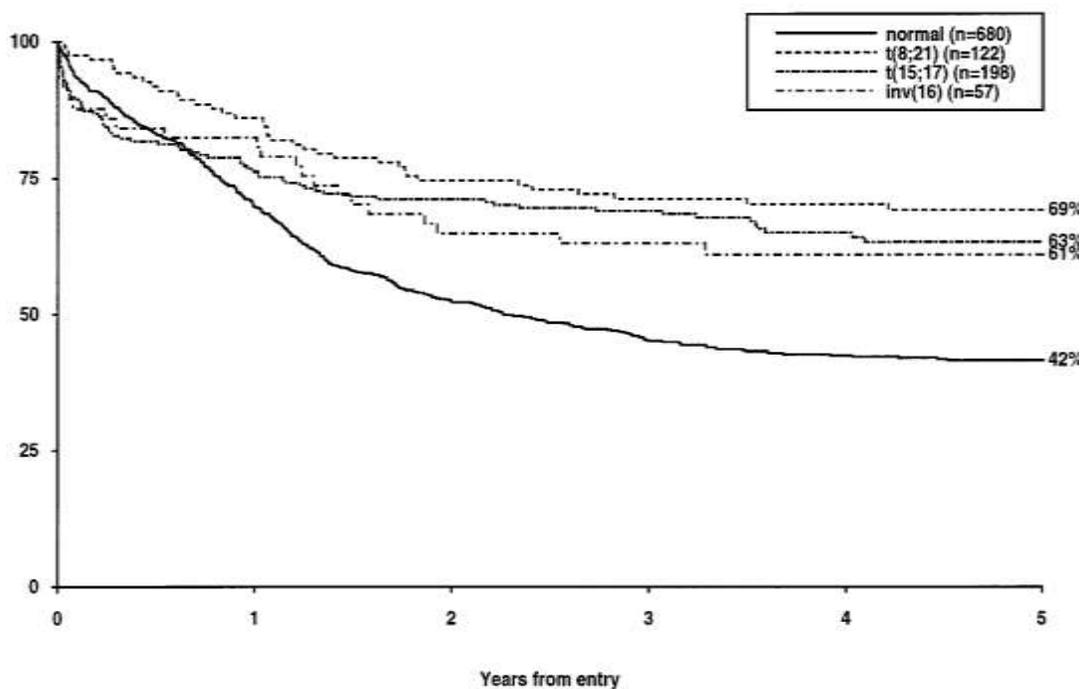
Fuente: Peterson L. and Dong-Er Z. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 23, 4255–4262

Esta translocación se ha asociado predominantemente a leucemia mieloide aguda M2, y en algunos casos a M1 y M4; y generalmente presentan características clínicas como eosinofilia (más de 5%) (Ver figura No 14), granulopoyesis anormal que se define como presencia de mielocitos y metamielocitos con gránulos salmón y

basofilia; y mieloperoxidasa positivo. Inmunofenotípicamente, estos pacientes presentan CD34 y DR, y CD19 y CD56 [24, 28].

Es una alteración que se encuentra más frecuente en pacientes mayores de 60 años, y se encuentra asociada a buen pronóstico. (Figura No. 15).

Figura No. 15: Curvas de supervivencia de pacientes con LMA y t(8;21). En 5 años, el 69 % de los pacientes con LMA y t(8;21) continúan con vida, un mayor % comparado con el 42% de los pacientes con LMA y sin la translocación.

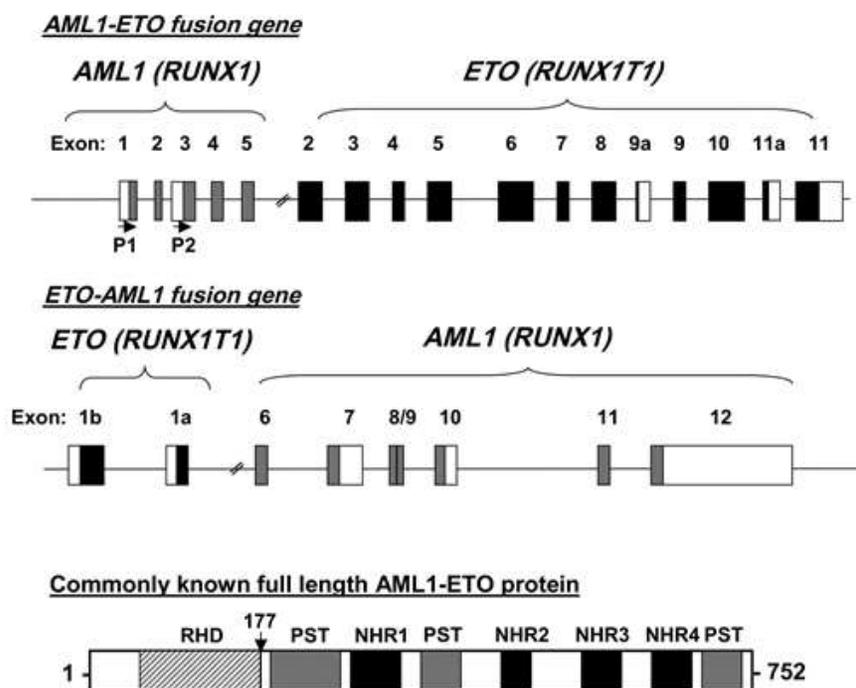


Fuente: (Grimwade D, et al. (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98, 1312-1320.

El gen AML1 que se encuentra en el cromosoma 21 consiste en 9 exones que produce por lo menos tres proteínas distintas, y la expresión de este gen está regulada por dos promotores independientes. El gen ETO que se encuentra en el cromosoma 8 consiste en 13 exones. Los puntos de rotura en el gen AML1 se encuentran dentro del Intrón 5; y se han descrito tres puntos de rotura distintos. Por otro lado los puntos de

rotura en el gen ETO se producen en dos intrones; uno en el intrón 1a y tres en el intrón 1b (Ver figura No. 16) [28].

Figura No. 16: Puntos de ruptura y fusión de t(8;21). Se observa las regiones en los genes AML1 y ETO en donde se dan los puntos de rotura, luego los exones que conforman el transcrito de fusión.



Tomado de: Peterson L. and Dong-Er Z. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 23, 4255–4262

2. Papel del transcrito AML-ETO en la hematopoyesis:

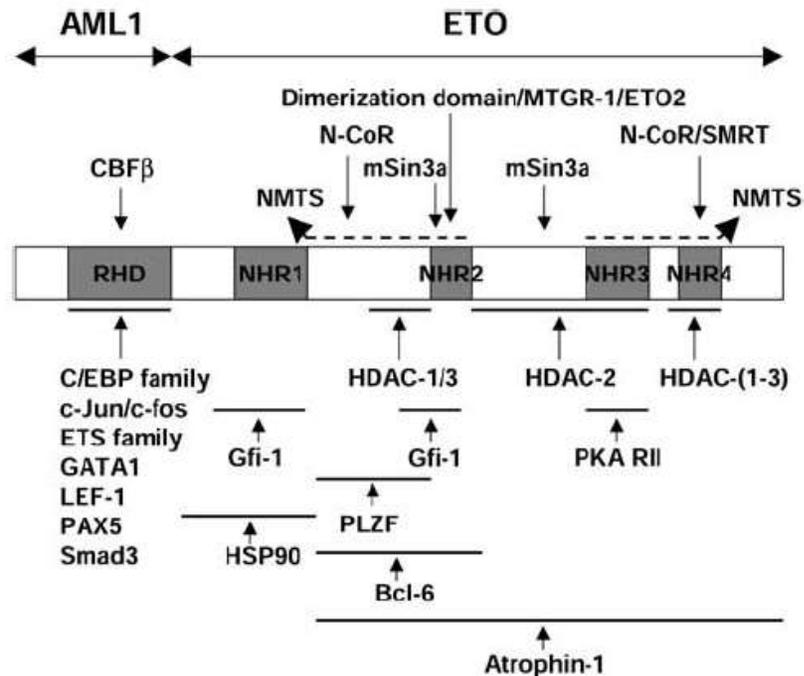
El gen AML1 es un factor de transcripción que juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de las células hematopoyéticas. El transcrito AML1-ETO codifica para una proteína de 752 aminoácidos, que se produce como fusión del extremo N-terminal de la proteína AML1 (177 aminoácidos) con el resto de la proteína ETO (575 aminoácidos).

La proteína AML-ETO1 tiene dos características claves para el desarrollo de leucemia, la primera es que parece ser que se une más fuertemente con el factor

CBFBeta, haciendo un dímero más estable que el formado con AML1; y esto se traduce en una fuerte unión con sus promotores blanco; y por otro lado recluta más eficientemente represores de la transcripción. Estos cambios hacen que AML1-ETO retrase la diferenciación en células murinas, y además se ha demostrado en ensayos hechos en la línea celular 32Dcl3 que detiene la maduración granulocítica [27, 28]

AML-1 es miembro de la familia de genes RUNX; las cuales forman heterodímeros con el factor CBFβ. En la figura No. 9 se muestran las interacciones que se dan en la proteína AML1-ETO; en la parte que corresponde al gen AML1, se mantiene la interacción con el factor CBFbeta; regulando así otros genes importantes en la hematopoyesis como el PAX5, Smad 3 y GATA1. Y en la región ETO también tiene capacidad de interactuar con algunas histonas desacetilasas, y otros factores como BCL6 y Gfi-1.

Figura No. 17: El transcrito de fusión AML1-ETO y su función en la hematopoyesis. Se observan todas las regiones de la proteína oncogénica AML-ETO y los factores con que interactúa cada una de ellas en la hematopoyesis.



Tomado de: Stephen, D. and Malcolm, M. (2004). Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene*, 23, 4249–4254.

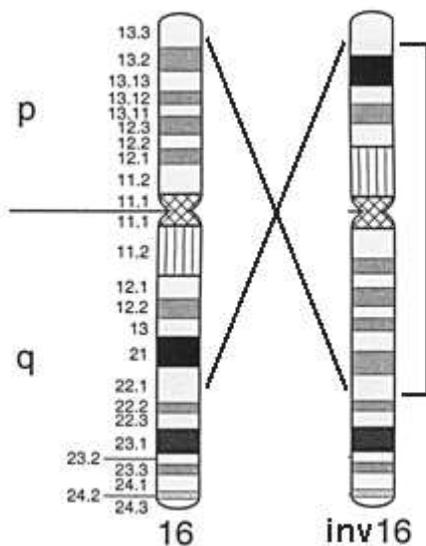
Se han hecho varios estudios in-vitro con el fin de determinar el mecanismo por el cual AML1-ETO participa en la leukemogenesis; por ejemplo estudio en líneas celulares que expresan esta proteína son K562, L-G y 32D, se ha demostrado que bloquea la diferenciación mieloide y eritroide. Y en otros estudios en donde se ha transfectado AML1-ETO a líneas celulares se ha visto que actúa como inhibidor de la vía C-jun, promoviendo así la apoptosis; y también se ha visto que afecta directamente el ciclo celular. Con todo esto se puede demostrar que AML1-ETO tiene un efecto en los programas celulares relacionados con la proliferación, diferenciación y apoptosis (Ver figura 17) [22, 28].

G. Transcrito MYH11-CBFB Inv(16):

1. Características generales y clínicas:

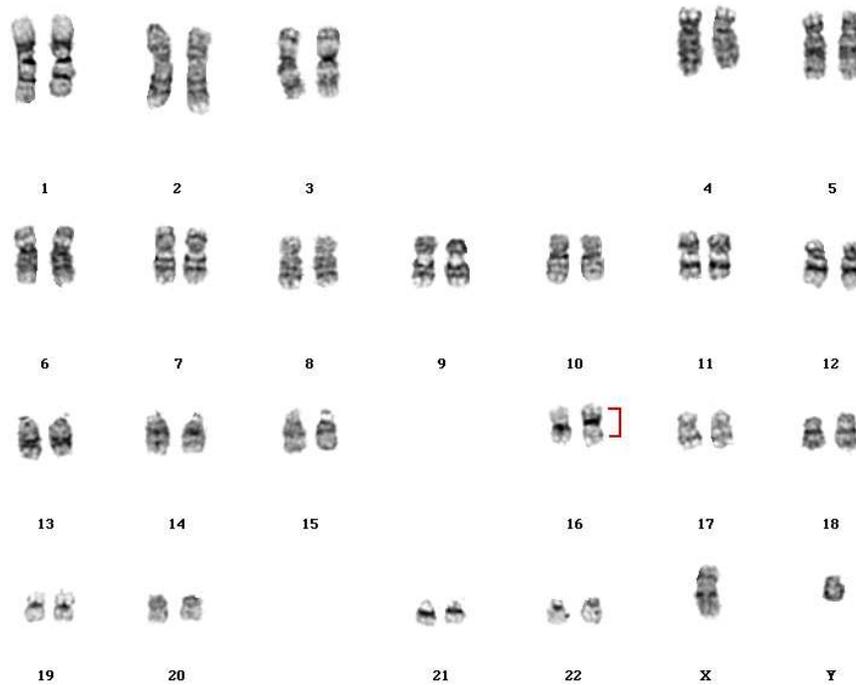
En 1983 Bloomfield, fue el primero en reportar la asociación entre alteraciones en el cromosoma 16 y la presencia de eosinofilia anormal; posteriormente Le Beau en el mismo año demostró la asociación entre inv16 y AML M4e. En 10 a 12% de todos los casos de LMA, se suelen encontrar las alteraciones: inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22)(Ver figura No. 18 y 19) [29,30].

Figura No. 18: Ideograma de la Inversión del Cromosoma 16 en leucemia mieloide aguda.



Tomado de: Mondira K, Pu L. (2001). Function of the inv(16) fusion gene CBFB-MYH1. *Hematol*, 8, 201–205.

Figura No. 19: Cariotipo de LMA Inv(16). Se observa el cariotipo de una persona con leucemia mieloide aguda cuyo cromosoma 16 presenta la una inversión.

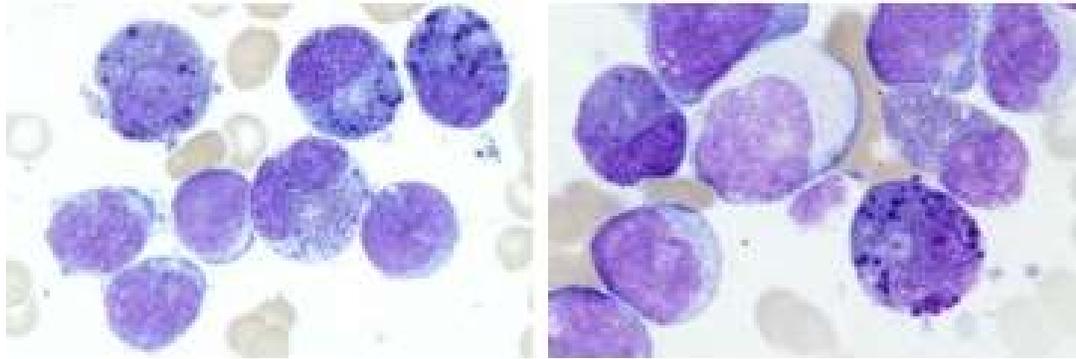


Tomado de: Wisconsin State Laboratory of Hygiene (s. f.). Recuperado de: www.slh.wisc.edu/cytogenetics/cases/oct1998/karyo.dot

Desde el punto de vista morfológico, este tipo de LMA está relacionado con la leucemia mielomonocítica aguda (clasificación FAB M4) y eosinófilos anómalos (LMMA Eo).

Entre las características morfológicas comunes asociadas a este tipo de leucemia se pueden mencionar: Diferenciación monocítica y granulocítica, eosinófilos característicamente anormales con gránulos, de color violáceo púrpura, inmaduros que oscurecen la morfología celular si están presente en números altos, Bastones de Auer en los mieloblastos y disminución de los neutrófilos en la médula ósea (Ver figura 20).

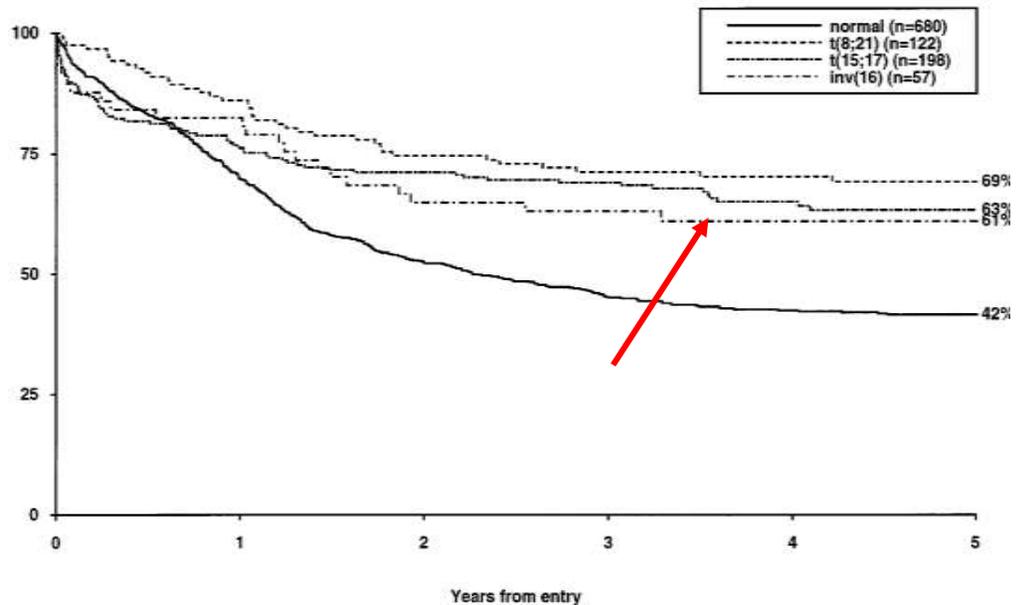
Figura No.20: Médula ósea de paciente con LMA, Inv (16). Se observa eosinobasofilia en LMA acompañada de los blastos anormales.



Tomado de: Kantarjian, H., Wolff, R., Koller, C. MD Anderson Manual of Medical Oncology. Recuperado de: www.accessmedicine.com

Se han realizado en diversos países estudios de supervivencia, y todos concluyen en que esta alteración conlleva a un buen pronóstico (Ver figura 21) [31-33].

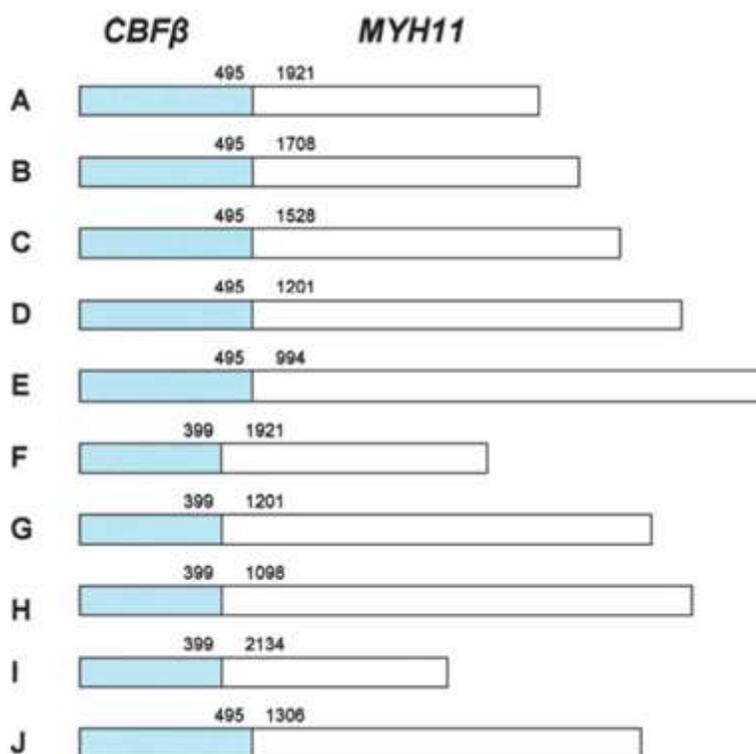
Figura No. 21: Curva de supervivencia de paciente LMA Inv(16). Se observa el buen pronóstico de Inv (16) con relación a pacientes con cariotipo normal.



Tomado de: Grimwade D, et al. (2001). The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): Analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98, 1312-1320.

El gen $CBF\beta$ se encuentra en el cromosoma 16q22 y codifica para la subunidad beta del factor de unión core; y el gen $MYH11$ se encuentra en la región 16q13 codifica para la proteína SMMHC. El gen quimérico obtenido tiene tamaño variable, y resulta de la incorporación de los primeros 4 ó 5 exones del $CBF\beta$ a distintos transcritos de $MYH11$. En la figura No. 22, se observan todos los transcritos reportados, derivadas de esta fusión [29].

Figura No. 22: Diferentes transcritos originados por $Inv(16)$. Se observa un esquema de los 10 transcritos reportados de la fusión de ambos genes.



Tomado de: Blackwell Publishing Ltd. (2004). *British Journal of Haematology*, 128, 18-34.

2. Papel del transcrito $MYH11-CBF\beta$ en la hematopoyesis:

En cuanto al papel de este transcrito en la hematopoyesis, se tiene evidencia de que la proteína codificada por el transcrito $CBF\beta-MYH11$, causa supresión de los efectos normales producidos por el factor $CBF\beta$; por lo tanto se ha visto que se inhibe

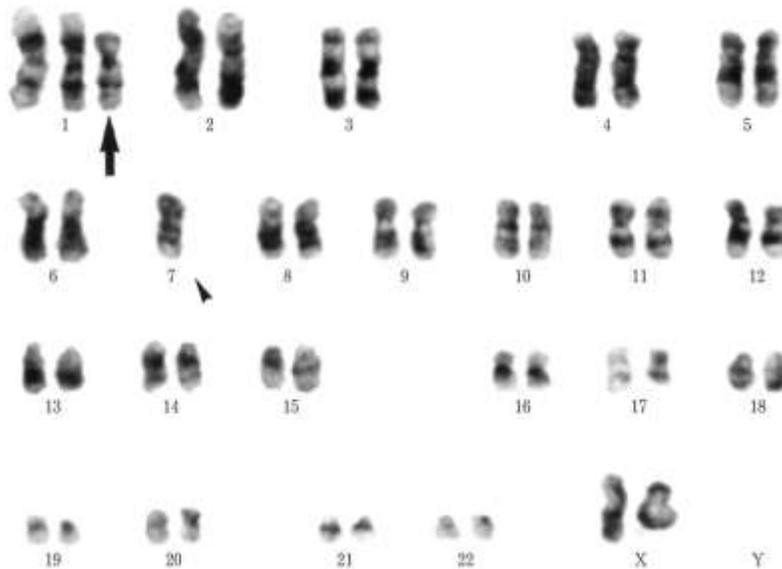
la generación de células progenitoras hematopoyéticas, y además bloquea la maduración de células progenitoras mieloides y linfoides [33].

Se introdujo esta alteración en animales y se pudo observar que sólo este transcrito produce tumores linfoides, después de un año; este efecto fue la primera evidencia de que este gen de fusión puede predisponer al desarrollo de leucemia. También se ha demostrado la asociación que existe entre este transcrito y la leucemia M4Eo [33].

H. Monosomía del Cromosoma 7 y Cromosoma 5:

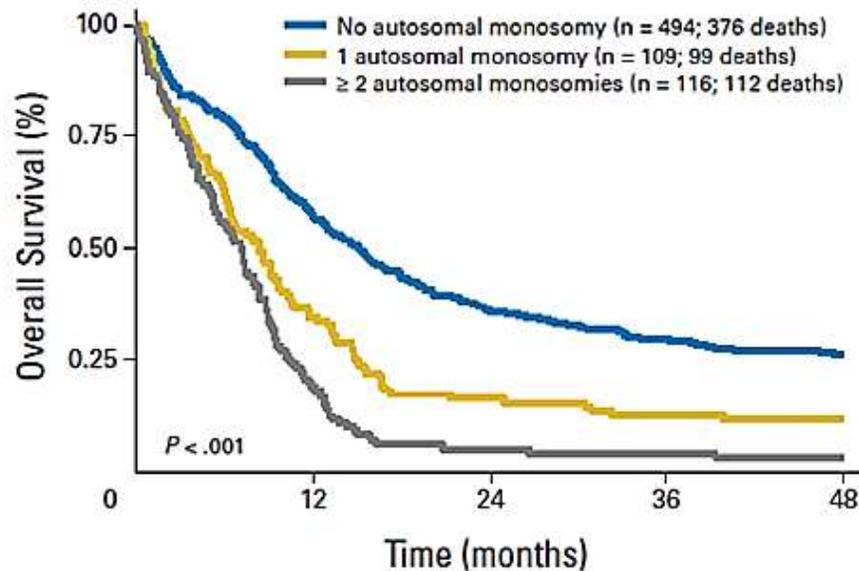
Entre las alteraciones al cariotipo que son de mal pronóstico, se pueden mencionar las monosomías en el cromosoma 7 y en el cromosoma 5; en la Figura No. 23, se puede observar un cariotipo de un paciente con leucemia mieloide aguda y monosomía 7. Estas alteraciones requieren del uso de quimioterapias más intensas, y su promedio de supervivencia es muy bajo (Ver Figura No. 24).

Figura No. 23: Cariotipo de un paciente con monosomía 7.



Tomado de: Litchmann Atlas of Haematology, www.accessmedicine.net

Figura No. 24: Supervivencia de los diferentes grupos de riesgo en LMA. La gráfica muestra claramente como la tasa de supervivencia desciende en presencia de monosomías, con un promedio de supervivencia menor que otras alteraciones genéticas.



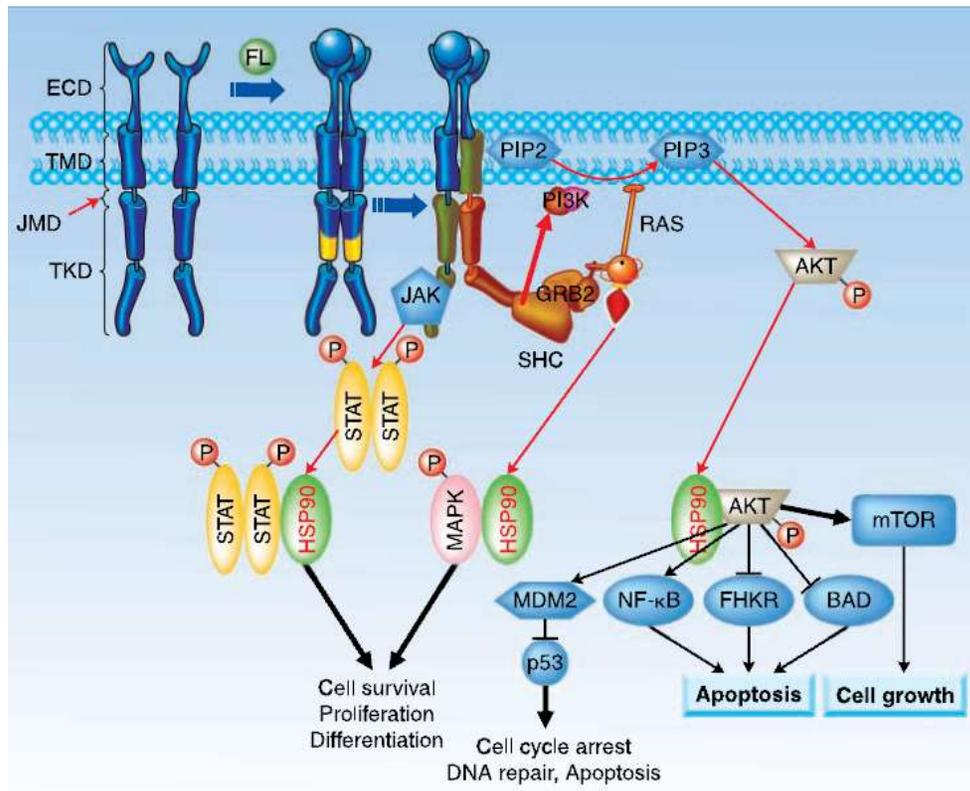
Tomado de: J Johnson, F. E. Cotter. (1997). State of the art: Monosomy 7 and 7q- associated with myeloid malignancy. *Blood Reviews*, 11,46-55.

I. Mutaciones en gen FLT3:

El gen FLT3 codifica para una proteína de membrana que pertenece a la familia RTK Clase III, que participa en la regulación, diferenciación y apoptosis de células progenitoras hematopoyéticas. Las duplicaciones internas en tándem (ITD) del gen FLT3 (representan un 28-33% en LMA con cariotipo normal), ocurren en el exón 14 y 15; y promueven una proliferación y supervivencia aberrante en células leucémicas [34-38].

Por otro lado del 5-14% de LMA con cariotipo normal tienen mutaciones sin sentido en el exón 20, dentro del dominio tirosin kinasa (FLT3-TKD), el cual promueve la fosforilación constitutiva de la proteína FLT3 y por consiguiente una disrupción en la hematopoyesis normal. Estas mutaciones se han asociado a un pronóstico desfavorable (Ver Figura No. 25) [34-38].

Figura No. 25: Estructura del receptor FLT3, y las rutas que se regulan mediante este receptor.



Tomado de: Mrózek, K and Bloomfield, D. (2006). Chromosome Aberrations, Gene Mutations and Expression Changes, and Prognosis in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*, 169-177.

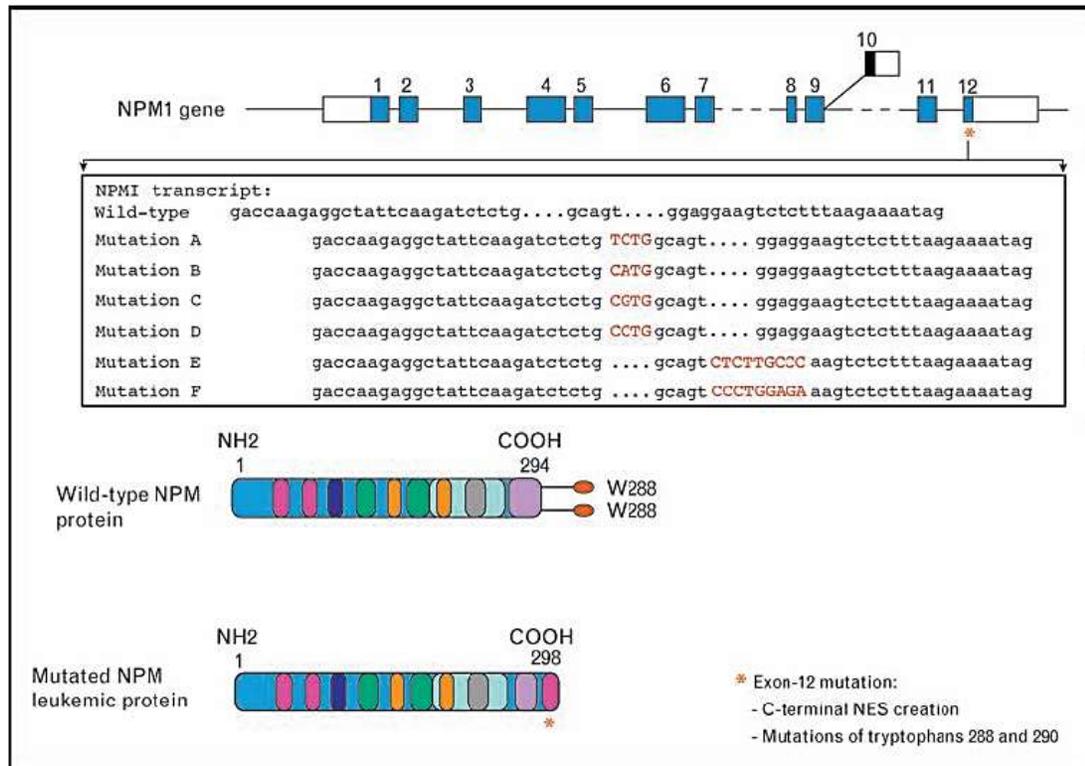
J. Mutaciones en gen NPM1:

El gen NPM1 codifica para la nucleophosmina, que es una proteína nuclear y plasmática, que tiene funciones de prevenir la agregación de proteínas nucleares, de regulación del ensamble de proteínas en los ribosomas, y de transportar proteínas del núcleo al citoplasma o viceversa [39].

Su rol exacto en oncogénesis es controversial, se sabe que la nucleophosmina se encuentra en concentraciones mayores en el núcleo, pero en personas con mutación en este gen, se encuentra predominantemente en el citoplasma, lo que altera sus funciones normales [39].

Las mutaciones en el gen NPM1 se encuentran en 45-64% de pacientes con leucemia mieloide aguda y cariotipo normal. Y se han asociado a buen pronóstico, usualmente responden bien a la inducción con quimioterapia; en la cual del 75-80% alcanzan remisión (Ver figura No. 26) [39].

Figura No. 26: Se observan las principales mutaciones encontradas en el gen NPM1.



Tomado de: Brunangelo F, Sportoletti P, Martelli P. (2001). Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol*, 21, 573–581.

K. Mutaciones en gen WT1:

El gen WT1 codifica para una proteína con dedos de zinc que se une al DNA, que puede actuar como activador o represor, dependiendo del contexto celular. Su rol en hematopoyesis y leukemogenesis no ha sido muy bien establecida, pero se sugiere que una proteína WT1 anormal se traduce en promover la proliferación celular y bloquear la diferenciación.

Se ha encontrado en un 10% de pacientes con cariotipo normal, y se ha asociado a un pronóstico favorable [40].

L. Mutaciones en gen C-KIT:

Estudios recientes han demostrado que mutaciones en el gen KIT, que codifica para un receptor tirosin kinasa tipo III (RTK), es indicativo de mal pronóstico en pacientes con alteración del gen CBF. Las mutaciones se han encontrado en el exón 8 y en el exón 17.

Las mutaciones en KIT se han reportado en 20-45% de pacientes con alteraciones en el gen CBF; ya sea la alteración t(8;21) o la Inv(16), que individualmente son consideradas de buen pronóstico [40].

En un próximo estudio, se determinarán las mutaciones presentes en los genes anteriormente expuestos; esto con el fin de orientar a pronóstico y tratamiento principalmente a los pacientes con cariotipo normal.

PARTE III

III.1 RESULTADOS

Para determinar la presencia del transcrito PML-RAR α por RT-PCR en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, se estandarizó previamente la técnica utilizando un control positivo. (Ver Anexo 3). En este estudio participaron 84 pacientes con Leucemia Mieloide Aguda referidos de cuatro hospitales nacionales: Hospital General San Juan de Dios – HGSJDD – (21.43%), Hospital Roosevelt (13.09%), Instituto Guatemalteco de Seguridad Social – IGSS – (1.19 %), Unidad Nacional de Oncología Pediátrica – UNOP – (56 %) y clínicas privadas (8.29%) con programas de atención de Hematología y Oncología (Ver Anexo 4).

Tabla No. 6: Características sociodemográficas de los pacientes con LMA analizados

Variable	Frecuencia (%) N=84	Variable	Frecuencia (%) N=84
Sexo		Grupo de edad	
Hombre	41 (48.8 %)	Adulto	37 (44.05 %)
Mujer	43 (51.2 %)	Niño-adolescente	47 (55.95%)
Región de origen*			
Región I	21 (25.0 %)	Región V	6 (7.1 %)
Región II	2 (2.3 %)	Región VI	16 (19.0 %)
Región II	10 (11.9 %)	Región VII	9 (10.7 %)
Región IV	8 (9.5 %)	Región VII	2 (2.3 %)
Centro de referencia			
Roosevelt	11 (13.09%)		
HGSJDD	18 (21.43 %)		
UNOP	47 (56.0 %)		
Otros**	8 (9.52 %)		

*El 11.9 % no refirió lugar de origen. ** Otros (incluye IGSS y Clínicas Privadas)

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

El 48.8 % de los pacientes analizados fueron varones y el 51.2 % mujeres (M/F: 0.95). La mediana de la edad fue de 16 años (RQ 8.7 – 36.5 años); con 47 (55.95 %) personas menores de 19 años (niños-adolescentes) y 37 (44.5 %) adultos. La región metropolitana y la región sur

occidental del país concentraron a la mayoría de los pacientes diagnosticados con LMA; siendo muy similar en las otras áreas geográficas. A excepción de las áreas nororiental y Petén que refirieron el 2.3 %. Además, en el 11.9 % no se refirió la información respecto al lugar de procedencia (Tabla No. 6).

Tabla No. 7. Características hematológicas de los pacientes con LMA analizados

Variable	Mediana N=84	Mínimo	Máximo
Recuentos celulares			
Glóbulos blancos (células/ μ L)	8,050	210	269,350
Plaquetas (células/ μ L)	33,000	6,200	577,600
Glóbulos rojos (millones/ μ L)	2.97	1.33	8.88
Hemoglobina (g/dL)	9.32	2.7	17.3
Hematocrito (%)	25.55	8.1	47.7
Clasificación FAB		No. (%)	
Subtipo M0	1 (1.2 %)		
Subtipo M1	2 (2.4 %)		
Subtipo M2	11 (13.1 %)		
Subtipo M3	17 (20.2 %)		
Subtipo M4	3 (3.6%)		
Subtipo M5	2 (2.4 %)		
Sin clasificación	45 (53.6 %)		
Secundaria o SDM [†]	3 (3.6 %)		
Presencia de t(15;17) (q22;q21)		No. (%)	
Presencia	15 (17.85 %)		
Ausencia	69 (82.15 %)		

*Incluye t(8;21) †SDM: Síndrome Mielodisplásico

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

En cuanto a las características hematológicas encontradas en todos los pacientes incluidos, la mediana para el recuento de leucocitos fue de 8,050 células/ μ L (RQ 2,840 – 40,540), 33,000 células/ μ L (RQ 16,700 – 68,000) para plaquetas, 2.97 x 10⁶/ μ L de glóbulos rojos (RQ 2.59 – 3.60), 9.32 g/dL para hemoglobina (RQ 7.84 – 10.59) y 25.55 % (RQ 22.36 – 30.82) para el

hematocrito. El 53.6 % de las muestras fueron referidas sin la sub clasificación FAB previa, 3.6 % presentó una LMA secundaria o un SDM; y del 42.8 % restante la mayor parte correspondía al tipo M3 o promielocítica (20.2 %) (Tabla No. 7).

El transcrito PML-RAR α fue detectado en 17.85 % (15/84) de los pacientes diagnosticados con Leucemia Mieloide Aguda (Ver Figuras 27 – 29). De éstos 15 casos, el 53.33 % presentó la isoforma corta o S de 289 pb correspondiente a bcr3 y el 46.67 % restante presentó el transcrito largo o L de 214 pb (bcr1).

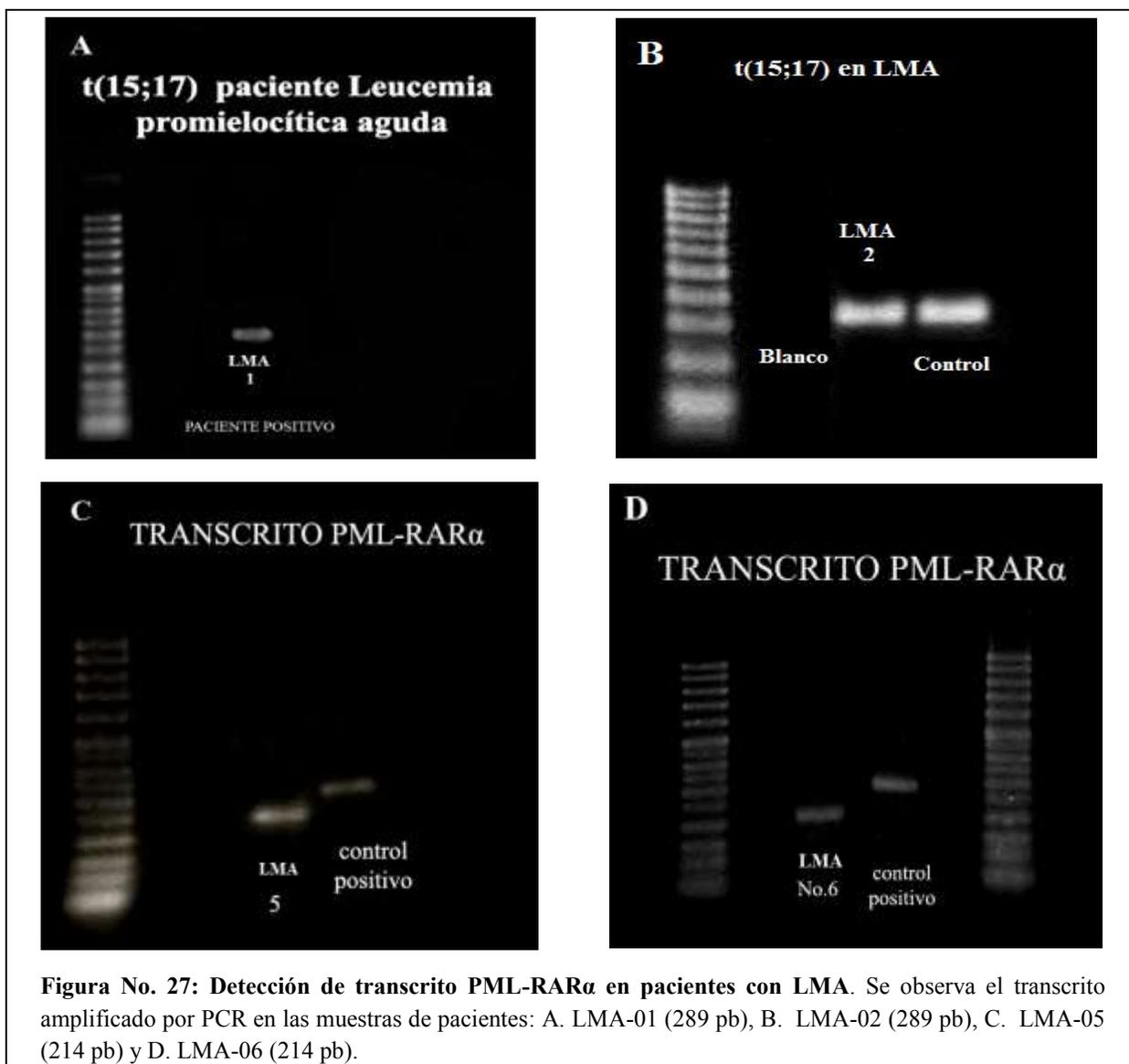
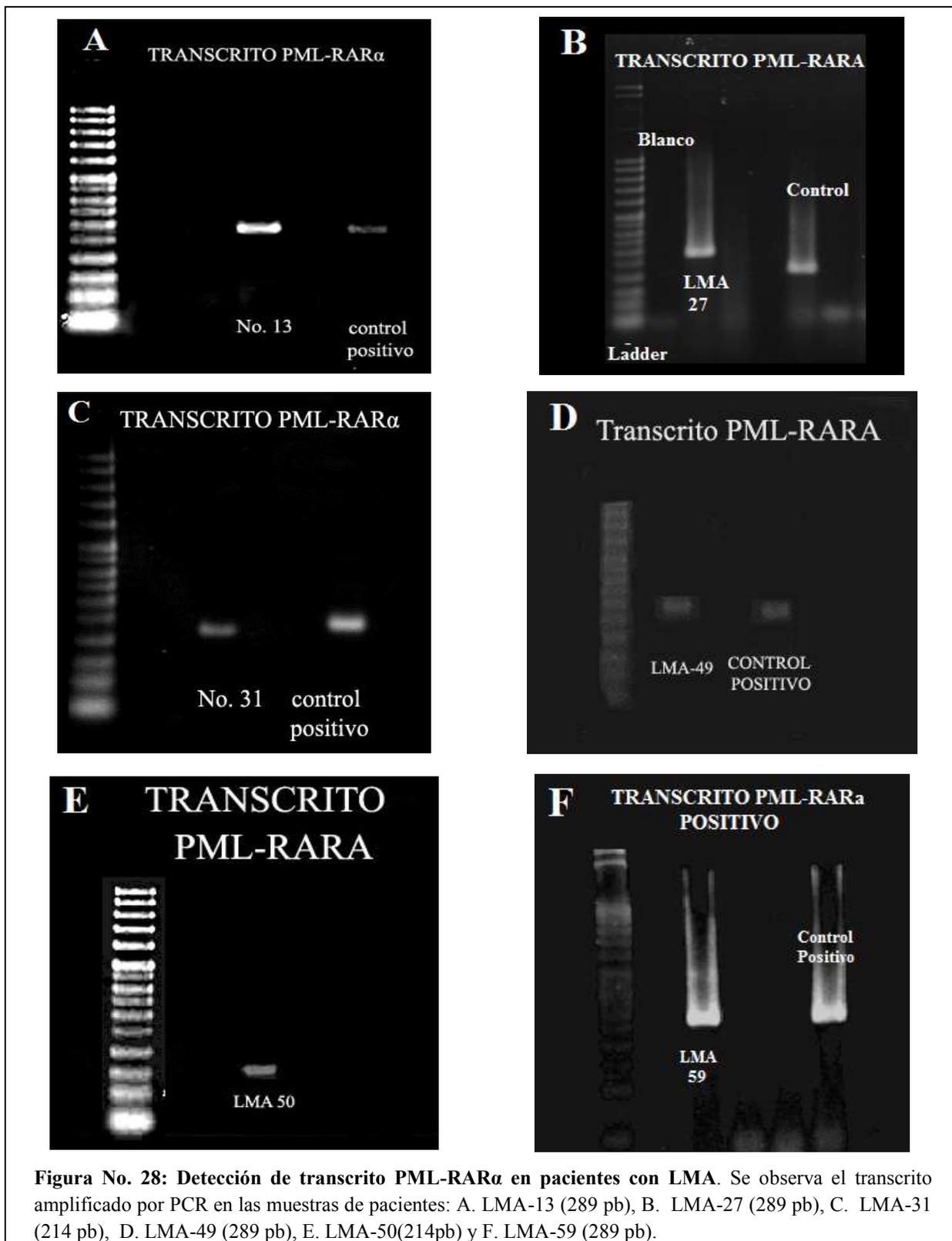


Figura No. 27: Detección de transcrito PML-RAR α en pacientes con LMA. Se observa el transcrito amplificado por PCR en las muestras de pacientes: A. LMA-01 (289 pb), B. LMA-02 (289 pb), C. LMA-05 (214 pb) y D. LMA-06 (214 pb).

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012



Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

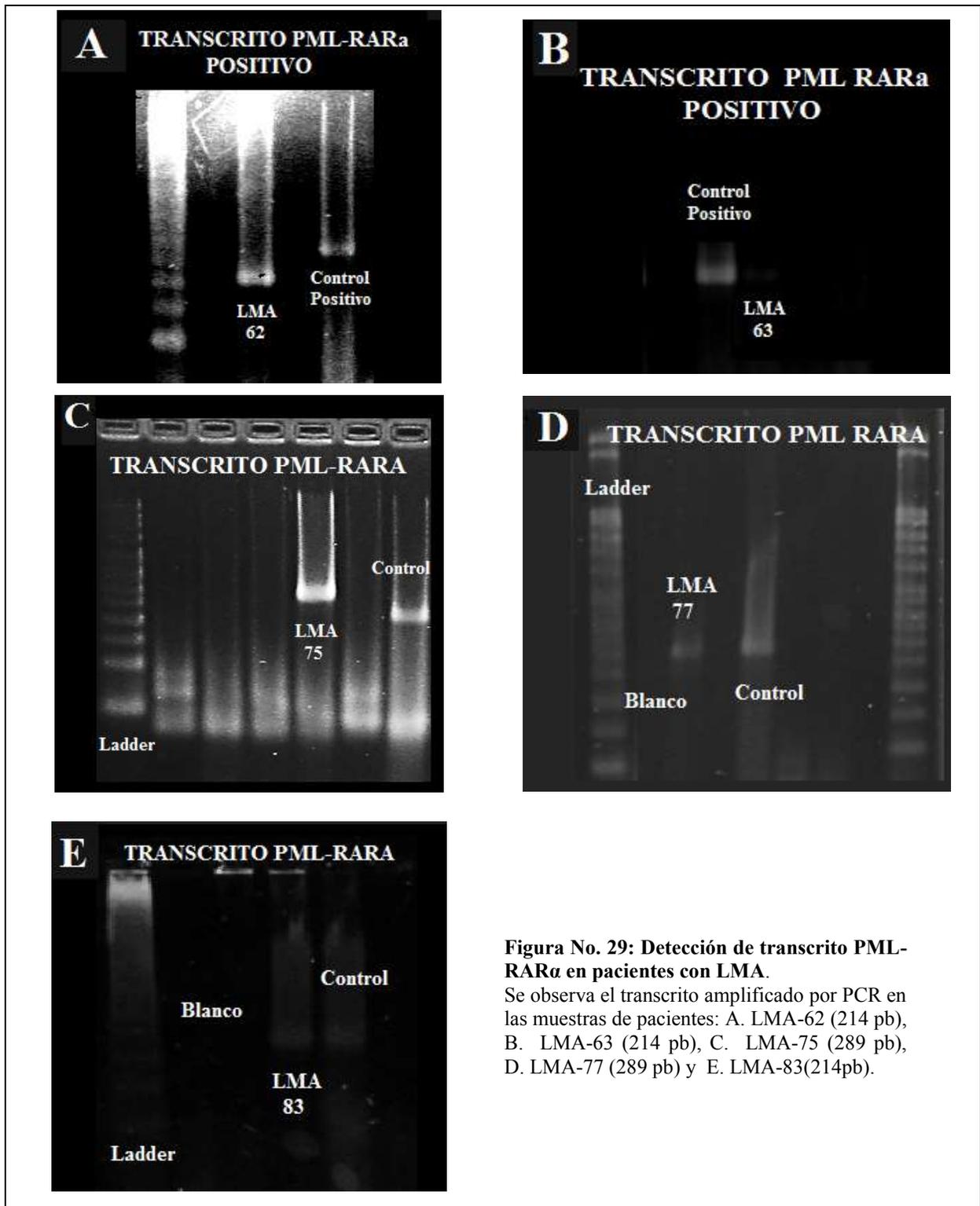


Figura No. 29: Detección de transcrito PML-RAR α en pacientes con LMA.

Se observa el transcrito amplificado por PCR en las muestras de pacientes: A. LMA-62 (214 pb), B. LMA-63 (214 pb), C. LMA-75 (289 pb), D. LMA-77 (289 pb) y E. LMA-83(214pb).

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

La mediana de los valores hematológicos en el hemograma los pacientes que presentaron la translocación fue: $3.0 \times 10^6/\mu\text{L}$ de eritrocitos (RQ 2.62 – 3.60), 7,520 leucocitos/ μL (RQ 2,700 – 31,100), 33,500 plaquetas / μL (RQ 16,275 – 68,575), 9.34 g/dL de hemoglobina (RQ 7.9 – 10.63) y 25.61 % de hematocrito (RQ 22.47 – 30.85).

El 86.67 % de los casos positivos para la $t(15;17)(q22;q21)$ fueron del subgrupo clasificado como M3 o Promielocítica. Mientras que el 13.33 % de los pacientes positivos no tenían una clasificación FAB al momento de ser ingresada la muestra para su análisis. El transcrito estuvo presente en el 76.47 % de las leucemias promielocíticas.

En los 69 pacientes con LMA que resultaron negativos para la presencia del transcrito de fusión PML- $\text{PAR}\alpha$ (Ver Anexo 5); se detectó la presencia de otra alteración de buen pronóstico (AML-ETO) solamente en el 5.95% (5/84). Y en tres de los pacientes positivos para PML- $\text{RAR}\alpha$ se determinó de forma conjunta duplicaciones en tándem del gen FLT3, marcador genético que modifica el pronóstico favorable de $t(15;17)$ en la LMA con mayores tasas de recaídas.

III.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA) es un desorden clonal genéticamente heterogéneo y caracterizado por la acumulación de alteraciones genéticas somáticas adquiridas en los progenitores de las células hematopoyéticas que afectan el funcionamiento normal de los mecanismos de proliferación y diferenciación celular. Actualmente, las técnicas de biología molecular y citogenética emplean estos cambios del genoma de las células leucémicas como los principales marcadores de pronóstico que permiten la estratificación de los pacientes con LMA según su riesgo y la estrategia terapéutica más adecuada. Es por ello, que en este estudio se evaluó la presencia del transcrito PML-RAR α , originado por t(15;17)(q22;q21) por medio de RT-PCR en 84 pacientes con LMA referidos de Hospitales Nacionales y otros centros de atención hemato-oncológica. Pues se ha reportado que esta alteración es de buen pronóstico alcanzando tasas de supervivencia de hasta 90% cuando se usa ácido trans-retinoico y quimioterapia combinada.

Según reportes internacionales, la LMA se diagnostica mayormente en adultos con una edad media de 64 años con una incidencia de 3-12/100,000 al año que se incrementa con la edad. Y por el contrario, la enfermedad es poco frecuente niños y adolescentes con una incidencia de 0.3 casos/millón en menores de 15 años [8, 12]. Sin embargo, en nuestro estudio la mayoría de los participantes (55.95 %) fueron niños-adolescentes (menores de 19 años) y la mediana de la edad al diagnóstico fue 16 años. Esta frecuencia elevada en el grupo de adolescentes y niños representa un hallazgo interesante en cuanto la cinética y comportamiento de la enfermedad en Guatemala, y sugiere un proceso de leucemogénesis en una etapa muy temprana del desarrollo y crecimiento pues solamente 3.57 % de los pacientes tenían una edad por encima de la media internacional descrita (Ver Anexo 4, Tabla No.8). Lo que desvela la importancia de realizar más estudios con un mayor número de pacientes para confirmar este hecho, y de hacerlo, se deben evaluar los factores de riesgo que pueden asociarse a la aparición de ésta enfermedad a una corta edad.

En cuanto a la frecuencia por sexo se obtuvo un mayor porcentaje de mujeres afectadas (51.2 %) lo cual, difiere a los reportes internacionales publicados que señalan un número de casos en el género masculino. En Guatemala, datos obtenidos en el proyecto FODECYT 28-2012 a mediados del 2014 con pacientes con LMA mostraron una mayor frecuencia de casos en varones; por lo que

deben analizarse los factores que provocaron el cambio en la tendencia de la enfermedad según el sexo.

Respecto a la distribución por regiones territoriales, la mayoría de casos con LMA se concentraron en la región metropolitana (25.0 %) y la región suroccidental (19.0 %). Seguidos de las regiones noroccidental, nororiental y suroriental que muestran un porcentaje similar (Ver tabla 6). Estos datos son de gran importancia epidemiológica, cuando se comparan con los descritos anteriormente en otros proyectos relacionados a leucemias agudas, como el FODECYT 48-2009 que reporta 42 % de casos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) en occidente y un 45 % en la región central [40]. Por tal motivo, deben realizarse estudios de mayor número de participantes que permitan estimar con mayor exactitud la frecuencia de la enfermedad según el lugar de origen y tomando en cuenta el número de habitantes en cada región, ya que esto puede significar una posible asociación entre el lugar de procedencia y las leucemias agudas; y provocando con ello una discusión sobre los diferentes factores de riesgo ambientales (químicos, físicos) y/o genéticos (polimorfismos, marcadores ancestrales, etc.) implicados en el incremento de las enfermedades oncológicas en las regiones antes mencionadas y la necesidad de su identificación para la prevención de las neoplasias hematológicas.

Respecto a los recuentos celulares del hemograma referidos para los pacientes analizados (Tabla No. 10), los resultados de hemoglobina encontrados (mediana 9.32 g/dL obtenida) coinciden con los descritos en pacientes con esta enfermedad que no son superiores a 12 g/dL [8]. En cuanto al recuento leucocitario, la literatura refiere un intervalo amplio de valores en extremo bajos o altos, lo cual dificulta la comparación de los resultados. Sin embargo, el valor encontrado en los pacientes de este estudio (mediana 8,050 leucocitos/ μ L) es un tanto menor a algunos reportes en poblaciones similares que reportan medianas de 9,400 - 15,600 leucocitos/ μ L, por lo que importante determinar si éstos valores son debidos a la agresividad de la LMA o a factores ambientales que afectan los recuentos leucocitarios en la población guatemalteca como la desnutrición [7].

Diversos estudios reportan que la leucemia promielocítica aguda o M3 constituye aproximadamente un 15 % de todos los casos de leucemias mieloides agudas, con incidencias de

20 – 30 % en los países mediterráneos y en América Latina. En nuestro estudio, el subtipo M3 fue el más frecuente con un 20.2 %, correlacionando con la literatura correspondiente [41 -43]. Solamente el 3.6 % de las leucemias fueron reportadas como secundarias a síndromes mielodisplásicos (SDM), es decir que los casos restantes son patologías *in novo* (primarias) en pacientes jóvenes y niños, y por ende el desarrollo de la malignidad ocurre a temprana edad.

La presencia del transcrito de fusión PML-RAR α originado por t(15;17) se determinó en el 17.85 % de los pacientes (15/84). Este dato es mayor al reportado en estudios multicéntricos de pacientes con LMA (ver Tabla No.2) que reportan frecuencias de 2 – 12 %; sin embargo nuestros resultados están relacionados con el mayor número de casos de leucemia promielocítica aguda, en la que este transcrito es exclusivo, que se reporta en poblaciones de Latinoamérica [43].

El transcrito en PML-RAR α se detectó en el 76.47 % (13/17) de las leucemias promielocíticas referidas, coincidiendo con la frecuencia reportada a nivel mundial de 70- 90 %. Cabe mencionar que la t(15;17) se ha asociado directamente al proceso de patogénesis de la enfermedad debido a que se ha reportado exclusivamente en las leucemias promielocíticas; la frecuencia de su detección varía, ya que entre el 1-5 % presentan otras variantes moleculares, que afectan tanto al gen RAR α como al gen PML pero con puntos de rotura diferentes de los clásicos o bien otro gen distinto como por ejemplo el gen PLZF (promyelocytic zinc finger) o la nucleofosmina (NPM1) [19, 45-47].

En diferentes estudios de caracterización genética de la LMA se han descrito varias características asociadas con un pronóstico menos favorable; aún en presencia de la t(15;17)(q22;q21) como por ejemplo edad avanzada , el sexo masculino, la isoforma V o S del PML-RAR α , mutaciones en el gen FLT-3, el marcador de membrana como el CD56, recuentos leucocitarios >10,000/ μ L y trombopenia (< 40,000/ μ L) [48 -55]. En el presente estudio se encontraron algunos de éstas factores como una mediana de 33, 500/mm³ para plaquetas, mayor frecuencia de la isoforma corta (S) de PML-RAR α y mutaciones en el gen FLT3.

La distribución y frecuencia de las diferentes variables genéticas de la proteína PML-RAR α varían; pero se estima que la isoforma L es la más frecuente, expresándose en el 55%, mientras que las isoformas S y V se expresan aproximadamente en el 35% y 8% de los pacientes,

respectivamente [7, 9, 51]. En los pacientes positivos para el transcrito, se determinó que la isoforma corta (S) del transcrito (bcr3) correspondía al 53.33%; siendo más frecuente que la isoforma larga (L) que se encontró solamente en el 46.67 % (bcr1). En estos pacientes se encontró además un mayor recuento celular; lo cual representa una característica desfavorable aunada a la presencia de la isoforma corta.

Adicionalmente el 3.57 % de los pacientes (3/84) presentaron duplicaciones en tándem del gen FLT3, un marcador de pronóstico adverso para LMA. En dos de los pacientes con mutaciones en FLT3 se presentó la variante S de y recuentos celulares mayores a 10,000/ μ L; lo cual concuerda con los reportes internacionales relacionados a este gen [33-34, 44, 50, 52].

PARTE IV

IV. 1 CONCLUSIONES

- IV.1.1. La frecuencia del transcrito PML-RAR α producido por t(15;17) (q22;q21) fue 17.85 % en los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda analizados en este estudio por medio de la técnica RT-PCR.
- IV.1.2. La detección del transcrito PML-RAR α brindó información importante a los médicos tratantes sobre el pronóstico de la enfermedad y orientó al uso combinado de ácido transretinoico con quimioterapia como régimen terapéutico de elección en los pacientes que presentaron esta alteración.
- IV.1.3. Los datos encontrados en este estudio revelaron que la Leucemia Mieloide Aguda es más frecuente en mujeres. Y se presentó, en su mayoría en niños y adolescentes menores de 19 años. Así mismo, los lugares de origen más frecuentes de los pacientes fueron las regiones metropolitana y suroccidental del país.
- IV.1.4. La determinación de las diferentes isoformas del transcrito PML-RAR α en el 17.85 % de los pacientes con LMA; y la aparición conjunta de mutaciones en el gen FLT3 en 3.54 % de los pacientes positivos son los primeros hallazgos de caracterización genética de la enfermedad en el país.
- IV.1.5. El análisis de las características hematológicas mostró que los pacientes guatemaltecos con Leucemia Mieloide Aguda incluidos presentan un menor recuento leucocitario que los reportes internacionales; lo cual puede asociarse al comportamiento de la enfermedad o a factores étnicos y sociales. Por el contrario, los valores de hemoglobina y plaquetas coinciden con los descritos en pacientes con esta enfermedad.
- IV.1.6. La divulgación del presente estudio se ha realizado medios escritos que brindaron información a los médicos, pacientes y familiares de los distintos hospitales nacionales.

IV. 2 RECOMENDACIONES

- IV.2.1. Caracterizar genéticamente los casos de Leucemia Mieloide Aguda en un grupo de mayor representatividad a nivel nacional, para comprobar los hallazgos obtenidos en este estudio y determinar el comportamiento de la enfermedad en toda la población Guatemalteca.
- IV.2.2. Evaluar la presencia de otros marcadores moleculares de pronóstico y tratamiento para Leucemia Mieloide Aguda, que permitan realizar una clasificación adecuada de los casos según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y mejoren la información médica necesaria para la toma de decisiones en el manejo y tratamiento de la enfermedad.
- IV.2.3. Implementar un sistema de monitoreo de pacientes positivos para el transcrito PML-RAR α ; que permita detectar a los pacientes con riesgo de recaída y que corresponde a un 15 – 20 % de los pacientes con t(15;17).
- IV.2.4. Fomentar sistemas de inter comunicación con los Hospitales Nacionales que refieren las muestras de trabajo para eliminar las desviaciones debidas a los sesgos de información y memoria; y dar un mayor seguimiento a los pacientes analizados.

IV. 3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mejía-Aranguré J, et al. (1996). Incidence trends of acute leukemia among the children of Mexico City: 1982- 1991. *Arch Med Res*, 27,223-227.
2. Campbell L, et al. (1995). Prognostic implications of karyotypes in 159 newly diagnosed adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Rev. Blood*, 86, 678.
3. Carranza C. (2007) Caracterización genética de pacientes con neoplasias mieloides y alteraciones del brazo largo del cromosoma 3. Mecanismo de sobreexpresión y análisis funcional del promotor del gen EVI1. Memoria de investigación. Suficiencia Investigadora (programa de doctorado en biología molecular y celular). Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada. –CIMA- Pamplona, España. Septiembre.
4. Santamaría-Quesada C, et al. (2009). Molecular and epidemiologic findings of childhood acute leukemia in Costa Rica. *J Pediatr Hematol Oncol*. Feb, 31,131-5.
5. Costello, R.; et al. (1997). Detection of CBF β /MYH11 fusion transcripts in acute myeloid leukemia: heterogeneity of cytological and molecular characteristics. *Leukemia*, 11, 644–650.
6. Dongen J Van, et al. (2002). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia*. *Leukemia*, 16, 1176–1181.
7. Santamaria, C. (2009). Estudio de marcadores moleculares para estudio de marcadores moleculares para enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia mieloblástica aguda. Tesis, universidad de salamanca, departamento de medicina hematologica, salamanca. 150 pp.

8. Gallagher R, et al. (1997). Association of PML-RAR α Fusion mRNA Type With Pretreatment Hematologic Characteristics But Not Treatment Outcome in Acute Promyelocytic Leukemia: An Intergroup Molecular Study. *Blood*, 90, 1656-1663.
9. Hasan S, et al. (2010). Analysis of t(15;17) Chromosomal Breakpoint Sequences in Therapy-Related Versus De Novo Acute Promyelocytic Leukemia: Association of DNA Breaks with Specific DNA Motifs at PML and RARA Loci. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 49, 726–732.
10. Claxton DF, et al. (1994). Detection of Fusion Transcripts Generated by the Inversion 16 Chromosome in Acute Myelogenous Leukemia Detection of the Chromosome 16 CBFP-MYH11 Fusion Transcript in Myelomonocytic Leukemias. *Blood*, 83, 1750-1756.
11. Calasanz M. (2002) Técnicas de Diagnóstico Genético en Neoplasias Hematológicas y Tumores Sólidos. *Rev. ASOVANSA*.
12. Hagop M, et al. (2011). The MD Anderson Manual of Medical Oncology, Second Edition McGraw-Hill. China. (Versión on-line).
13. ACSU Scholar. (2002). Incidencia del Cáncer en Guatemala. *American Society of Cancer*.
14. Quesada C. (2009). Estudio de Marcadores Moleculares para el pronóstico y seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda. *Tesis Doctoral*. Universidad de Salamanca.
15. Elihu E. (2010). High Cytogenetic or Molecular Genetic Risk Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*, 474-480.
16. Wheatley K, et al. (2001). United Kingdom Medical Research Council AML11 trial with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the The predictive value of hierarchical cytogenetic. *Leukemia*, 98: 1312-1320.

17. Rees J, et al. (2010). The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial Analysis. *Leukemia*, 92, 2322-2333.
18. Rowe J. (2010). The evolving paradigm of prognostic factors in AML: Introduction to the Acute Leukemia Forum 2010. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 23, 453–456.
19. Mrózek K, Bloomfield C. (2006). Chromosome Aberrations, Gene Mutations and Expression Changes, and Prognosis in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*, 169-177.
20. Grignani F, et al. (1994). Acute Promyelocytic Leukemia: From Genetics to Treatment. *Blood*, 83, 10-25.
21. Stephen D, Malcolm M. (2004). Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene*, 23, 4249–4254.
22. Yamagata J, et al. (2005). Runx1/AML1 in Normal and Abnormal Hematopoiesis. *International Journal of Hematology*, 82,1-8.
23. Peterson L, Dong-Er Z. (2004). The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*, 23, 4255–4262.
24. Kamaleldin, E. & Goldfarb, A. (2007). Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: Multifaceted manipulation of marrow maturation. *Cancer Letters*, 25, 179–186.
25. Ferrara F, Vecchio L. (2002). Acute myeloid leukemia with t(8;21)/AML1/ETO: a distinct biological and clinical entity. *Haematologica*, 87, 306-319.

26. Licht J. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 20, 5660 -5679.
27. Dowling J. (1999). The AML1-ETO Chimaeric Transcription Factor in Acute Myeloid Leukaemia: Biology and Clinical Significance. *British Journal of Haematology*, 106, 299-308.
28. Liu P, et al. (1995). Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eosubtype of acute myeloid leukemia. *Blood*, 85, 2289-2302.
29. Mondira K, Pu L. (2001). Function of the inv(16) fusion gene *CBFB-MYH1*. *Hematol*, 8, 201–205.
30. Pabst T, Mueller B. (2009). Complexity of CEBPA Dysregulation in Human Acute Myeloid Leukemia *Clin Cancer Res*, 15, 5303-5307.
31. Reilly J. (1997). Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *British Journal of Haematology*, 128, 18–34.
32. Shigeseda K, et al. (2004). Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene *CBFB/PEBP2B-MHY11*. *Oncogene*. 23, 4297–4307.
33. Takahashi, S. (2011). Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implication. *Journal of Hematology & Oncology*, 4, 13.
34. Meshinchi, S. (2009). Structural and Functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*, 15, 4263-4269.

35. Parcels, B. et al. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stemcells*, 24, 1174–1184.
36. Donald S. (2006). FLT3 Mutations: Biology and Treatment Hematology. *Blood*, 1, 178–184.
37. Naoe T, kiyoi H. (2004). Normal and oncogenic FLT3. *Cell. Mol. Life Sci*, 61, 2932–2938.
38. Brunangelo F, Sportoletti P, Martelli P. (2001). Acute myeloid leukemia with mutated NPM1: diagnosis, prognosis and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol*, 21, 573–581.
39. Renneville, A.(2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, 22, 915–931.
40. Carranza, C. (2011). Detección por PCR multiplex de los transcritos quiméricos BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, ETV6-AML1; y su utilidad como factor pronóstico en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda. Proyecto FODECYT 48-2009. Guatemala: Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología.
41. Avvisati, G., et al. (1991) Epidemiology of acute promyelocytic leukemia in Italy. APL Collaborating Group. *Ann.Oncol.*, 2, 405-408
42. Chillon,C. et al. (2001) Molecular characterization of acute myeloblastic leukemia according to the new WHO classification: a different distribution in Central-West Spain. *Haematologica*, 86, 162-166.
43. Douer, D., et al. (1996) High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. *Blood*, 87, 308-313

44. Chillon, M. et al. (2004) FLT3-activating mutations are associated with poor prognostic features in AML at diagnosis but they are not an independent prognostic factor. *Hematol.J.*, 5, 239-246.
45. Chillon, M., et al. (2000). Two new 3' PML breakpoints in t(15;17)(q22;q21) positive acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer*, 27, 35-43.
46. Grimwade, D., et al. (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*, 98, 1312-1320.
47. Grimwade, D., et al. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, 92, 2322-2333.
48. Gonzalez, M., et al. (2001) Pretreatment characteristics and clinical outcome of acute promyelocytic leukaemia patients according to the PML-RAR alpha isoforms: a study of the PETHEMA group. *Br.J.Haematol.*, 114, 99-103
49. Sanz, M.A. (2006). Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am.Soc.Hematol.Educ.Program.*, 147-155.
50. Yoo, J., et al. (2006). Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene. *Leuk.Lymphoma*, 47, 1788-1793.
51. Jurcic, J., et al. (2001) Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 98, 2651-2656.

52. Gale, R., et al. (2005). Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 106, 3768-3776.
53. Asou, N., et al. (1998). Analysis of prognostic factors in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. Japan Adult Leukemia Study Group. *J.Clin.Oncol.*, 16, 78-85.
54. Ades, L., et al. (2008). Treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL): a comparison of French-Belgian-Swiss and PETHEMA results. *Blood*, 111, 1078-1084.
55. Grimwade, D., et al. (1996). Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. *Br.J.Haematol.*, 94, 557-573.

IV. 5 ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado



Consentimiento Informado para Pruebas Genéticas

1. Título de los proyectos

“DETECCIÓN Y EVALUACIÓN POR RT-PCR DEL TRANSCRITO PML-RARA PRODUCIDO POR LA t(15;17)(q22;q21), EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”

(Este estudio se basará en el análisis de ácidos nucleicos para evaluar la presencia de genes alterados en su enfermedad)

2. Investigador Principal

Dra. Claudia Carranza

3. Institución

INVEGEM

El presente documento es un consentimiento informado que le brindará a usted y su familia información importante sobre los estudios. Puede que el documento contenga palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al investigador encargado o a cualquier personal del estudio para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente. Usted puede llevarse a su casa una copia de este consentimiento informado para pensar sobre este estudio o para discutir con su familia o amigos antes de tomar la decisión de participar en él.

INTRODUCCIÓN

Usted ha sido invitado a participar en esta investigación. Antes de que usted decida participar en el estudio por favor lea este documento cuidadosamente. Haga todas las preguntas que usted tenga, para asegurarse de que entienda los procedimientos del estudio, incluyendo los riesgos y los beneficios.

PROPOSITO DEL ESTUDIO

El propósito del presente estudio una caracterización genética de la leucemia mieloide aguda, es decir detectar la presencia de genes que se encuentran alterados en leucemia, lo que permitirá un mejor manejo de su enfermedad ya que le servirán a su médico para conocer el pronóstico de su enfermedad; y por lo tanto elegir con mayor exactitud el tratamiento más adecuado para usted.

Además se estudiarán otros genes que ayuden a conocer mejor la genética de la leucemia mieloide aguda; por lo que se obtendrá información que permita conocer mejor los mecanismos de producción del cáncer y así facilitar la cura del mismo.

Fuente: INVEGEM/Rozas Botrán ONG



PARTICIPANTES

Las personas que podrán participar en este estudio deben de tener un diagnóstico confirmado de leucemia mieloide aguda, y además seguir según los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión

- Pacientes de 0-99 años
- Diagnóstico confirmado de leucemia mieloide aguda
- Sin tratamiento previo
- Pacientes con recaídas.

Criterios de exclusión:

- Paciente que presente otras formas de leucemia
- Pacientes que ya se encuentren en tratamiento
- Pacientes con recaídas

Con el fin de identificar la existencia de estos cuatro marcadores genéticos, el presente estudio requiere su participación, ya que reúne los criterios de inclusión para colaborar con el estudio. **Su participación es completamente voluntaria y puede abandonar el estudio en cualquier momento sin ser penalizado.**

PROCEDIMIENTOS

El cumplimiento de uno o más de los criterios de inclusión indican que su médico sospecha que usted tiene leucemia mieloide aguda, y por lo tanto se procede a la extracción de sangre periférica o médula ósea. La extracción de sangre periférica se llevará a cabo por venopunción (extracción de sangre de una vena) y la de médula ósea por punción al interior del hueso; la muestra extraída será enviada en dos tubos, uno con tapa morada (EDTA) y otro con tapa verde (heparina) al laboratorio de biología molecular y citogenética de INVEGEM, para su respectivo análisis.

RIESGOS

Los riesgos de la venopunción son mínimos y generalmente se relacionan a hematomas (moretes que se quitan con el tiempo) en el lugar de punción, los cuales no representan un riesgo para su salud y desaparecen en pocos días, sin necesidad de tratamiento. Además puede causar dolor, mareos y en raras ocasiones infecciones. Los riesgos de la extracción de médula ósea también son mínimos, pueden encontrarse en algunas ocasiones sangrado o infecciones, hematomas y dolor.

Fuente: INVEGEM/Rozas Botrán ONG



COSTOS

La presente prueba tiene un costo elevado, sin embargo por ser parte de este estudio se le realizará de forma gratuita.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Si usted elige participar en este estudio, el investigador del estudio conseguirá información personal sobre usted. Esto puede que incluya la información que puede identificarle. También puede conseguir información sobre su salud incluyendo, expedientes médicos actuales y del pasado que pueden incluir resultados de laboratorios, placas o exámenes físicos

Los resultados de esta investigación pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en las reuniones médicas, pero **su identidad no será divulgada. La información de su salud será mantenida confidencialmente bajo la ley.** Esta autorización servirá hasta el final del estudio, a menos que usted la cancele antes. Usted puede cancelar esta autorización en cualquier momento enviando un aviso escrito al Investigador Principal: Dra. Claudia Carranza Coordinadora de Laboratorios INVEGEM Tel. 40507444 Correo electrónico: ccarranza@invegem.org

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará su información personal ni de su salud. La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria.

UTILIZACIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS

La muestra de médula ósea o sangre obtenida de usted será utilizada para el presente estudio; y el análisis se realizará en INVEGEM. Se podrá almacenar su muestra para futuros estudios dentro de las instalaciones de INVEGEM, y se podrá utilizar para otros estudios que ayuden al conocimiento de la genética de leucemia mieloide aguda.

PREGUNTAS

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio o sobre su participación usted puede contactar a:

- Dra. Claudia Carranza, Coordinadora de Laboratorios INVEGEM
Tel. 40507444 Correo electrónico: ccarranza@invegem.org .

OTROS ASPECTOS DE INTERÉS:

- Si existiera información de relevancia en el presente estudio, se le dará conocimiento del mismo.
- No se dará ningún tipo de compensación para la participación, su participación es totalmente voluntaria.
- Siempre se respetará la opinión de cada participante
- No existe ningún conflicto de interés con respecto al patrocinio del proyecto ni en el equipo investigador.

No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer preguntas y recibir contestaciones satisfactorias.

Si usted firma, aceptando su participación en este estudio, recibirá una copia del consentimiento con su firma, el sello de aprobación de INVEGEM y la fecha.



DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores
Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas – INVEGEM –
Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología – SENACYT –

Yo, _____ (nombre y apellidos) de ____ años edad y con cédula de vecindad o DPI _____ he sido informado/a sobre la participación de mi o de mi hijo _____ en el proyecto “DETECCIÓN Y EVALUACIÓN POR RT-PCR DEL TRANSCRITO PML-RARA PRODUCIDO POR LA t(15;17)(q22;q21), EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA”; en el que se tomará una muestra de sangre periférica o médula ósea para la realización de las pruebas necesarias. El resultado de la prueba de brindará información a mi médico sobre el pronóstico de mi enfermedad o la de mi hijo.

El procedimiento de extracción de sangre periférica o médula ósea constituye un procedimiento seguro para mi salud y sin complicaciones importantes o que afecten mi integridad física.

Autorizo el uso de la muestra de sangre periférica o médula ósea para la presente investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el comportamiento y tratamiento de la enfermedad. Y otorgo mi consentimiento para la extracción de sangre periférica o médula ósea y uso del resultado de mi prueba para la presente investigación. Comprendo que mis datos pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero mi identidad no será divulgada.

Fecha: _____

Firma del Paciente o huella digital: _____

Firma del médico/persona que realizó la extracción: _____



Anexo 2: Ficha de Recolección de datos

		
DATOS GENERALES DEL PACIENTE		INFORMACION HEMATOLÓGICA
NOMBRE: _____ EDAD: _____ FECHA DE NACIMIENTO: ____/____/____ LUGAR DE ORIGEN: _____ TELÉFONO: _____ DIRECCIÓN: _____ _____		FECHA: ____/____/____ RECUENTO ERITROCITARIO: _____ RECUENTO LEUCOCITARIO: _____ RECUENTO PLAQUETARIO: _____ HEMOGLOBINA: _____ HEMATOCRITO: _____ % BLASTOS: _____
INFORMACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE		OTRAS PRUEBAS
HOSPITAL DE REFERENCIA: <input type="checkbox"/> ROOSEVELT <input type="checkbox"/> IGSS <input type="checkbox"/> UNOP <input type="checkbox"/> GENERAL SAN JUAN DE DIOS <input type="checkbox"/> OTRO (especifique): _____ MEDICO QUE REFIERE: _____ TELÉFONO: _____ IMPRESIÓN CLÍNICA: <input type="checkbox"/> LMA ¹ SUBTIPO LMA: _____ EVENTOS TROMBÓTICOS PREVIOS: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI No. DE EVENTOS: _____ ESPLENOMEGALIA: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI GRADO: _____ OTROS HALLAZGOS RELACIONADOS A LA ENFERMEDAD: _____ _____		FECHA: ____/____/____ CARIOTIPO/FISH: _____ _____ FECHA: ____/____/____ INMUNOFENOTIPO*: _____ _____ FECHA: ____/____/____ OTRA DE INTERÉS: _____ _____
		PACIENTES EN TRATAMIENTO
		FECHA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____ FECHA DE INICIO TRATAMIENTO: ____/____/____ TRATAMIENTO Y DOSIS: _____ RECAIDA: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI
INFORMACIÓN DE LA MUESTRA		
FECHA DE RECOLECCIÓN: ____/____/____ TIPO DE MUESTRA: <input type="checkbox"/> SANGRE PERIFÉRICA <input type="checkbox"/> MÉDULA ÓSEA		
PRUEBA	TUBO DE RECOLECCIÓN	TIPO DE MUESTRA
ANÁLISIS CUALITATIVO DEL TRANSCRITO, PLM-RARα t(15;17) EN PACIENTES CON LMA	1 TUBO CON EDTA (MORADO)	MÉDULA ÓSEA*
* Utilizar sangre periférica en recuentos >100,000 leucocitos/mm ³ y un porcentaje de blastos >90		

Fuente: INVEGEM/Rozas Botrán ONG

Anexo 3: Procedimiento de Estandarización de la prueba

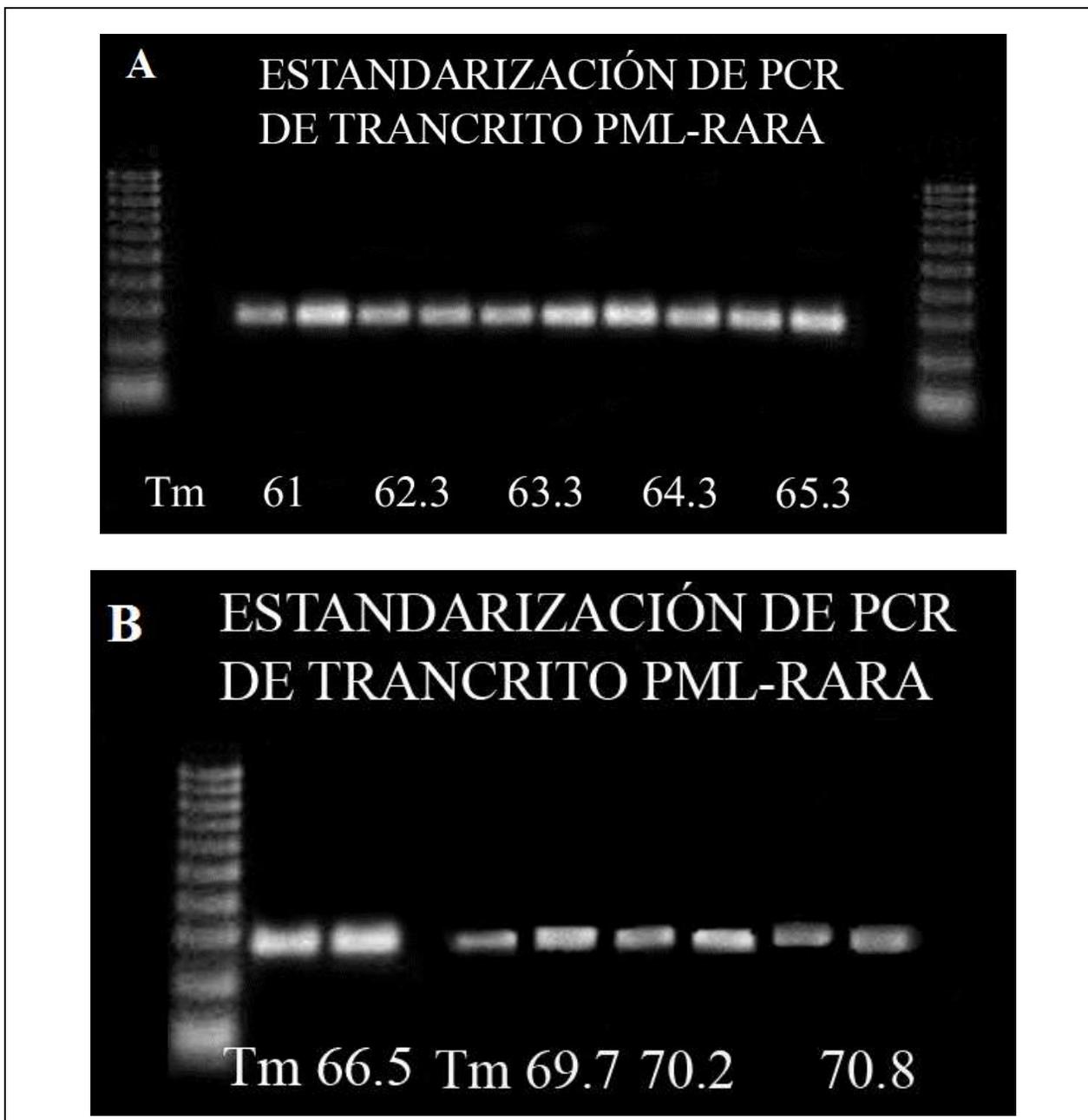


Figura No. 30: Estandarización de RT-PCR para t(15;17) (q22;q21). Los paneles A y B muestran las diferentes temperaturas de annealing a las cuales se probó la reacción de PCR para la amplificación de las diferentes isoformas del transcrito PML-RAR α . En todas las temperaturas se amplificó el fragmento de 289 pb, seleccionando la temperatura de 65 °C como la óptima.

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

Anexo 4: Listado de pacientes incluidos en el estudio

Tabla No.8: Pacientes y resultados obtenidos

Código Proyecto	Edad (años)	Sexo	Lugar de origen	Glóbulos Rojos (10 ⁶ /uL)	Glóbulos Blancos (células/uL)	Plaquetas (células/uL)	Hb* (mg/dL)	Ht† %	t(15;17)(q22;21) PML-RAR α
LMA-01	5	M	Guatemala	NR	28,500	46,000	10.8	NR	Positivo
LMA-02	6	M	Jutiapa	NR	40,540	57,000	13.8	NR	Positivo
LMA-03	32	F	Jalapa	3.1	201,000	11,200	9.7	25.5	Negativo
LMA-04	13	M	Petén	NR	14,810	8,000	10.0	NR	Negativo
LMA-05	15	M	San Marcos	NR	1,230	32,000	10.7	NR	Positivo
LMA-06	24	F	Izabal	4.4	6,130	10,600	13.3	36.9	Positivo
LMA-07	18	M	Guatemala	3.2	1,790	308,900	9.1	28.4	Negativo
LMA-08	58	M	San Marcos	2.7	16,200	9,000	8.0	23.1	Negativo
LMA-09	23	F	Quetzaltenango	NR	2,180	163,000	12.9	NR	Negativo
LMA-10	14	M	Guatemala	2.6	4,200	33,000	8.6	24.1	Negativo
LMA-11	13	F	Escuintla	2.2	820	115,000	6.4	18.9	Negativo
LMA-12	3	M	Izabal	4.2	4,680	38,000	11.8	34.6	Negativo
LMA-13	2	M	Quiché	2.5	720	9,000	7.3	20.5	Positivo
LMA-14	2	M	Guatemala	5.3	5,030	95,000	16.4	45.7	Negativo
LMA-15	9	M	Quiché	3.4	1,320	17,000	10.2	29.0	Negativo
LMA-16	16	M	Huehuetenango	NR	269,350	28,700	2.7	8.5	Negativo
LMA-17	11	M	San Marcos	3.6	9,330	321,000	10.4	30.8	Negativo
LMA-18	32	F	Zacapa	2.4	20,380	577,600	10.4	28.2	Negativo
LMA-19	4	M	Guatemala	2.1	4,860	291,000	5.8	17.3	Negativo
LMA-20	77	M	Jalapa	1.8	15,370	9,000	6.0	17.1	Negativo
LMA-21	8	M	El Progreso	2.1	17,830	13,000	7.2	20.0	Negativo
LMA-22	4	F	Quetzaltenango	4.1	4,650	14,000	12.2	36.5	Negativo
LMA-23	58	F	Sololá	2.2	132,490	44,000	7.0	20.2	Negativo
LMA-24	NR	M	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Negativo
LMA-25	2	F	Huehuetenango	3.1	2,700	40,000	9.3	27.8	Negativo
LMA-26	49	F	NR	2.3	1,240	18,400	7.2	19.4	Negativo
LMA-27	9	F	Quetzaltenango	3.2	17,500	14,000	9.6	27.2	Positivo
LMA-28	58	F	Guatemala	NR	40,760	26,000	8.3	23.6	Negativo
LMA-29	21	F	Izabal	2.7	5,720	70,300	7.6	22.0	Negativo
LMA-30	14	F	Quiché	NR	2,440	45,000	10.5	30.9	Negativo
LMA-31	20	F	NR	3.6	350	50,280	11.6	32.2	Positivo
LMA-32	16	F	NR	2.9	162,630	40,000	9.4	28.0	Negativo

Fuente: Proyecto FODECYT 70-2012

Continuación Tabla No. 8

Código Proyecto	Edad (años)	Sexo	Lugar de origen	Glóbulos Rojos (10 ⁶ /uL)	Glóbulos Blancos (células/uL)	Plaquetas (células/uL)	Hb* (mg/dL)	Ht† %	t(15;17)(q22;21) PML-RAR α
LMA-33	NR	F	NR	4.0	1,500	80,000	10.0	30.0	Negativo
LMA-34	3	M	Guatemala	2.0	21,930	38,000	6.2	18.0	Negativo
LMA-35	43	F	Jutiapa	3.3	22,800	19,500	8.6	25.2	Negativo
LMA-36	3	F	Quiché	2.6	8,580	37,000	7.3	21.6	Negativo
LMA-37	9	M	Guatemala	3.3	210	23,000	9.5	27.0	Negativo
LMA-38	1	F	Huehuetenango	NR	4,680	38,000	12.5	35.8	Negativo
LMA-39	38	F	NR	NR	540	48,000	7.3	19.0	Negativo
LMA-40	43	F	Guatemala	2.6	79,800	429,100	7.8	22.1	Negativo
LMA-41	8	M	Huehuetenango	2.5	5,405	11,000	7.8	22.1	Negativo
LMA-42	8	F	Chimaltenango	2.1	108,910	7,000	6.4	22.5	Negativo
LMA-43	30	M	Zacapa	2.9	122,000	63,000	7.7	25.8	Negativo
LMA-44	13	M	Escuintla	3.1	4,830	505,000	9.5	25.3	Negativo
LMA-45	17	M	Retalhuleu	3.9	135,000	29,500	14.0	38.7	Negativo
LMA-46	69	M	Guatemala	NR	6,000	NR	12.3	37.3	Negativo
LMA-47	6	M	Jutiapa	4.2	2,300	6,200	10.6	30.3	Negativo
LMA-48	12	M	Guatemala	3.2	5,330	52,770	9.6	26.0	Negativo
LMA-49	15	M	San Marcos	2.4	6,250	34,000	8.2	20.0	Positivo
LMA-50	11	M	Petén	2.7	560	14,000	8.2	22.4	Positivo
LMA-51	20	F	Chimaltenango	NR	13,900	25,000	8.3	25.1	Negativo
LMA-52	16	M	Guatemala	2.7	880	79,270	9.0	23.6	Negativo
LMA-53	36	F	NR	3.9	15,300	35,600	11.0	31.9	Negativo
LMA-54	60	F	Guatemala	2.9	7,520	27,300	8.1	23.8	Negativo
LMA-55	15	M	Baja Verapaz	8.9	9,120	19,000	8.8	23.0	Negativo
LMA-56	56	M	Escuintla	2.67	47,800	24,400	7.82	23.3	Negativo
LMA-57	44	F	Guatemala	4.29	3,790	178,000	13.4	39.2	Negativo
LMA-58	71	M	NR	NR	2,180	28,000	10.9	31	Negativo
LMA-59	15	M	Izabal	3.13	78,700	23,000	9.4	28.30	Positivo
LMA-60	27	M	Jutiapa	2.92	8,960	6,460	9.3	24.00	Negativo
LMA-61	24	M	Guatemala	5.69	15,990	13,000	17.3	47.70	Negativo
LMA-62	35	F	Alta Verapaz	2.80	26,500	6,600	8.2	22.80	Positivo
LMA-63	10	M	Chiquimula	2.95	130,900	24,650	9.3	24.58	Positivo
LMA-64	11	F	Totonicapán	3.12	1,870	243,100	10.3	29.25	Negativo
LMA-65	19	F	Totonicapán	4.80	6,270	14,000	10.2	31.70	Negativo
LMA-66	42	F	Santa Rosa	3.17	111,110	17,000	9.5	28.90	Negativo
LMA-67	8	F	San Marcos	2.72	2,510	78,100	8.5	23.43	Negativo
LMA-68	1	F	Retalhuleu	2.92	9,840	87,480	8.4	25.61	Negativo
LMA-69	26	F	San Marcos	3.29	3,360	20,700	10.8	28.50	Negativo

Fuente: Proyecto FODECYT 70-2012

Continuación Tabla No. 8

Código Proyecto	Edad	Sexo	Lugar de origen	Glóbulos Rojos (10 ⁶ /uL)	Glóbulos Blancos (células/uL)	Plaquetas (células/uL)	Hb* (mg/dL)	Ht† %	t(15;17)(q22;21) PML-RAR α
LMA-70	20	F	Guatemala	NR	NR	NR	NR	NR	Negativo
LMA-71	15	F	Suchitepéquez	2.03	23,160	6,370	6.1	17.88	Negativo
LMA-72	55	M	Guatemala	2.81	6,380	68,000	7.9	24.20	Negativo
LMA-73	69	M	NR	NR	48,400	6,840	7.8	NR	Negativo
LMA-74	10	F	Izabal	3.83	151,700	16,700	11.5	31.90	Negativo
LMA-75	28	F	NR	3.35	42,600	80,000	10.2	28.00	Positivo
LMA-76	3	M	Guatemala	4.09	47,750	21,480	8.8	27.63	Negativo
LMA-77	17	F	Chimaltenango	2.80	520	40,700	9.0	23.35	Positivo
LMA-78	55	F	Guatemala	5.47	3,260	332,000	14.9	45.00	Negativo
LMA-79	47	F	Guatemala	1.33	31,100	36,200	4.5	14.00	Negativo
LMA-80	42	F	Guatemala	3.43	41,100	99,700	9.5	30.80	Negativo
LMA-81	8	M	Santa Rosa	2.56	130,500	40,350	8.1	23.60	Negativo
LMA-82	12	M	Izabal	4.56	5,650	105,000	12.6	36.94	Negativo
LMA-83	62	F	San Marcos	3.00	1,076	15,000	10.5	20.80	Positivo
LMA-84	5	M	Huehuetenango	2.29	60,200	17,780	6.3	18.00	Negativo

*Hb: Hemoglobina †Ht: Hematocrito M: Masculino F: Femenino NR: Información No Referida

Fuente: Proyecto FODECYT 70-2012

Anexo 5: Muestras de pacientes analizadas, negativas para t(15;17)(q22;q21)

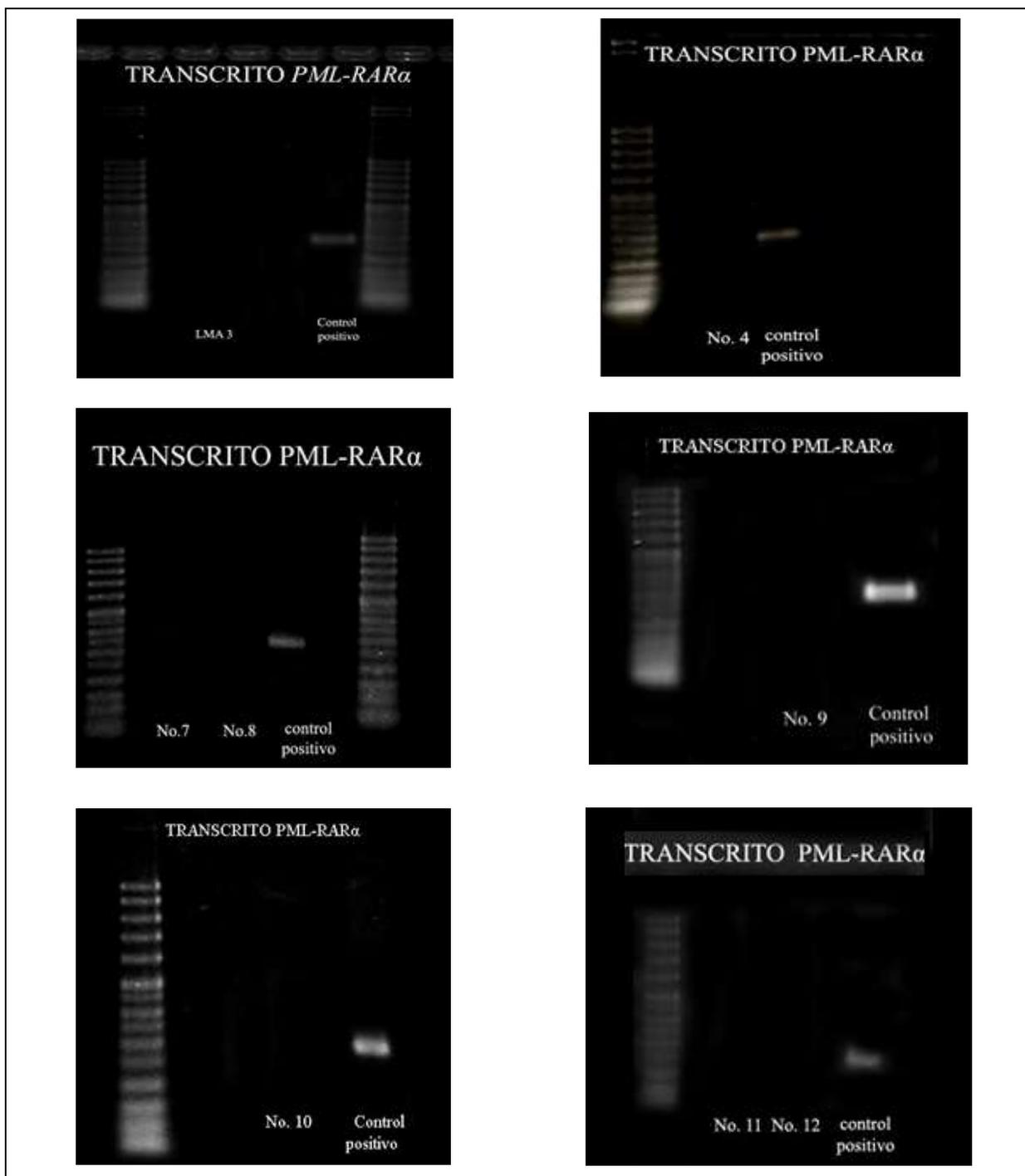


Figura No. 31: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras LMA-03, LMA-04, LMA-07, LMA-08, LMA-10, LMA-11 y LMA-12. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

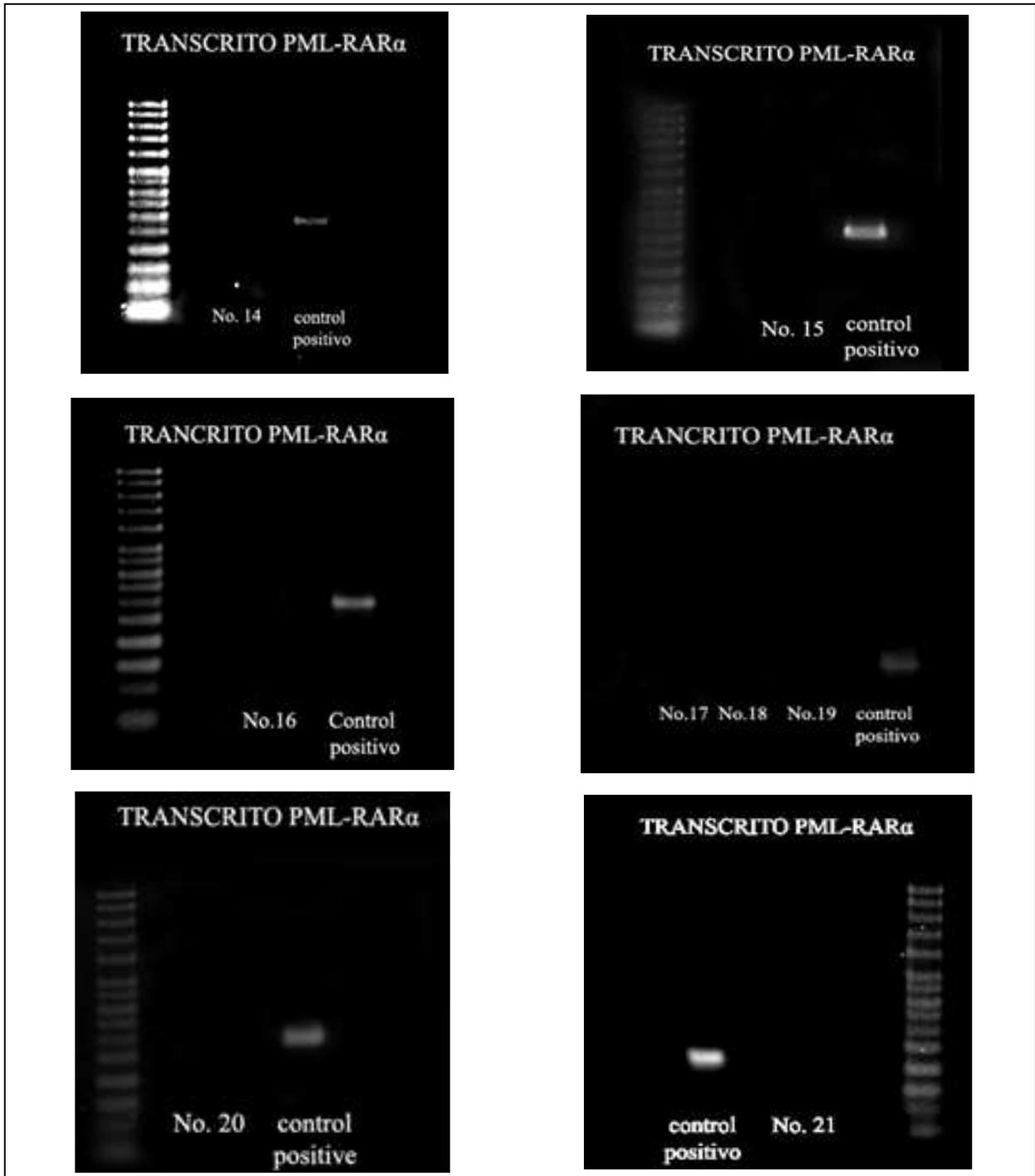


Figura No. 32: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras LMA-14, LMA-15, LMA-16, LMA-17, LMA-18, LMA-19, LMA-20 y LMA-21. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

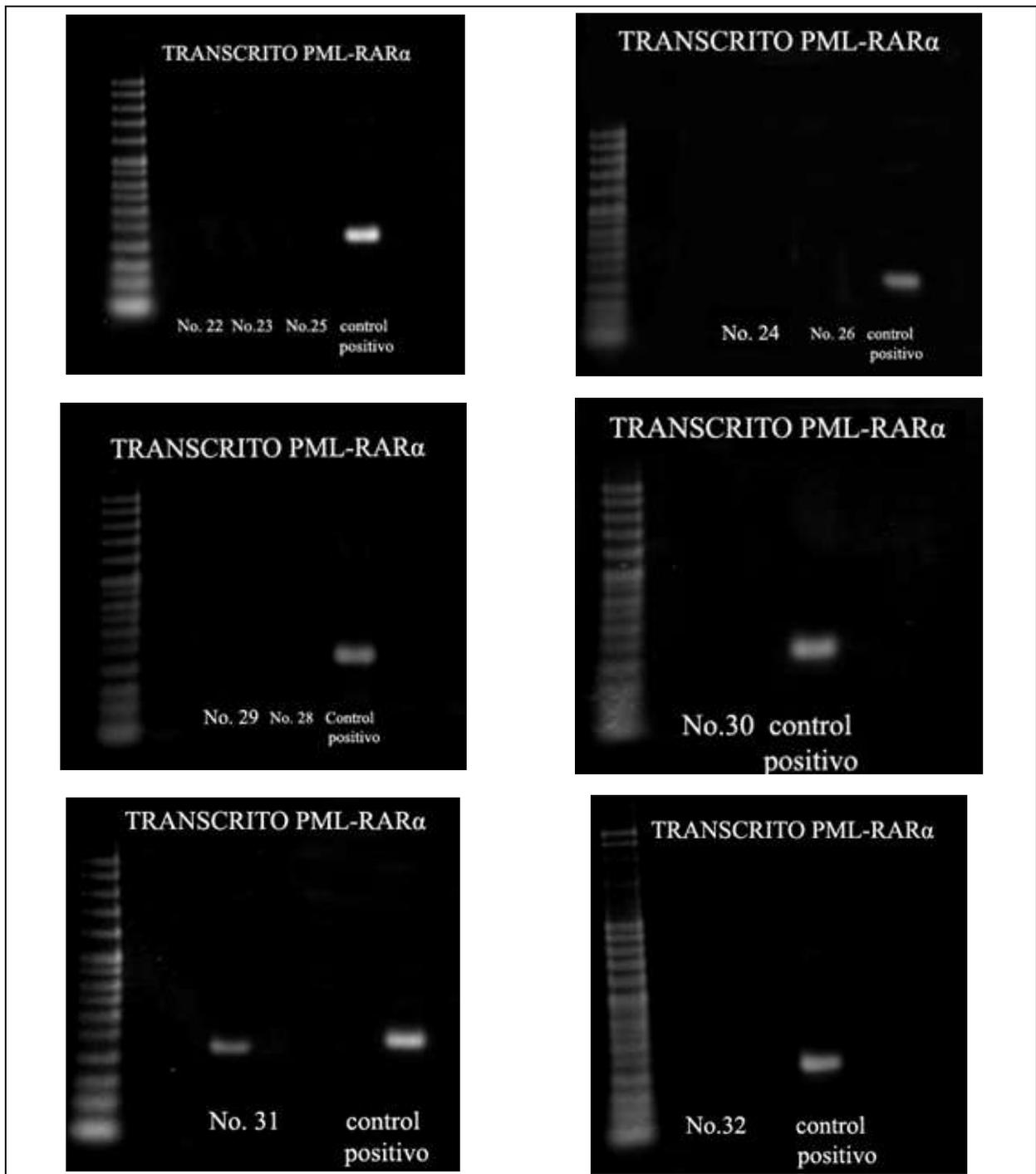


Figura No. 33: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras LMA-22, LMA-23, LMA-24, LMA-25, LMA-26, LMA-28, LMA-29, LMA-30, LMA-31 y LMA-32. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

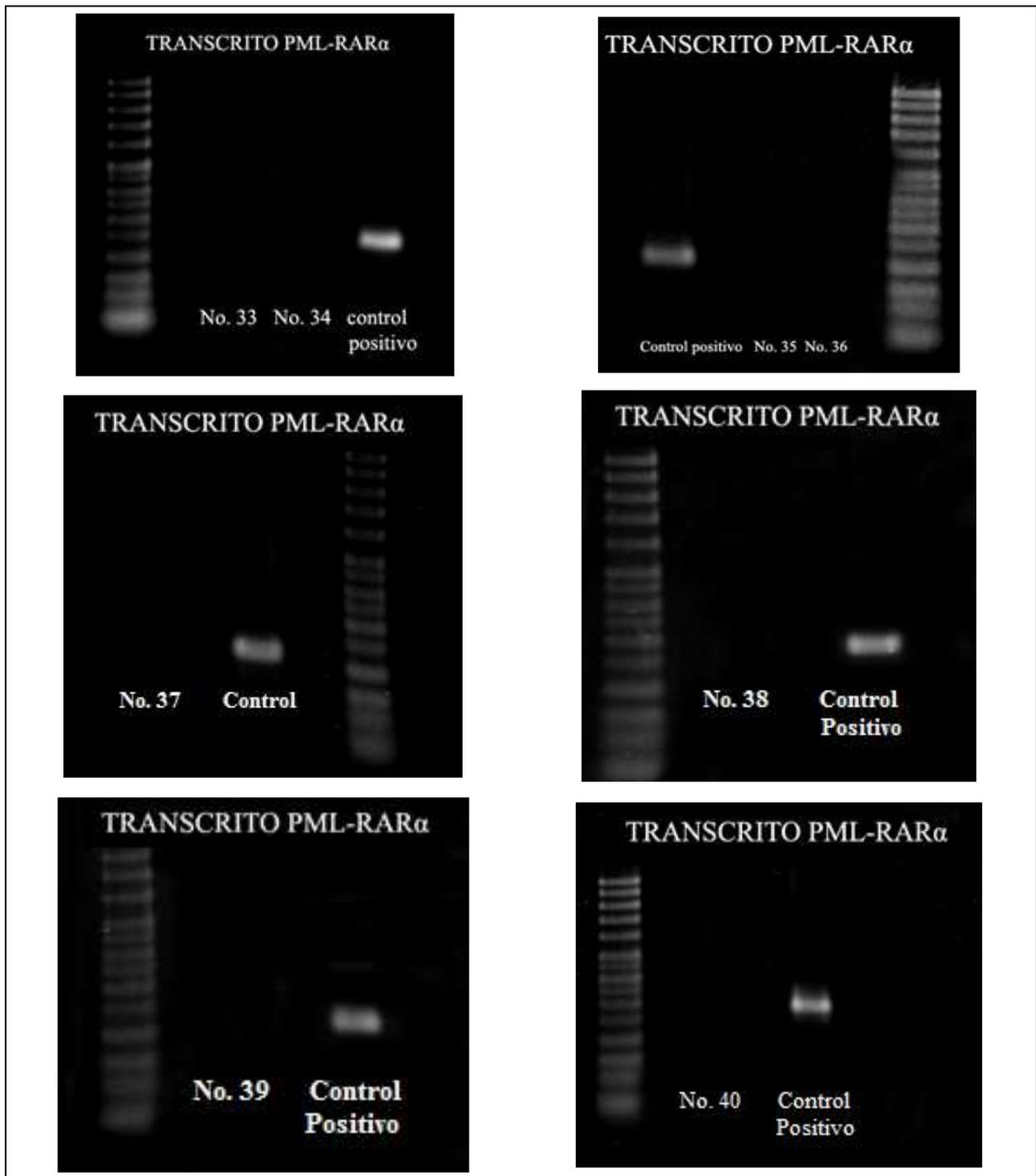


Figura No. 34: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras desde LMA-33 hasta LMA-40. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

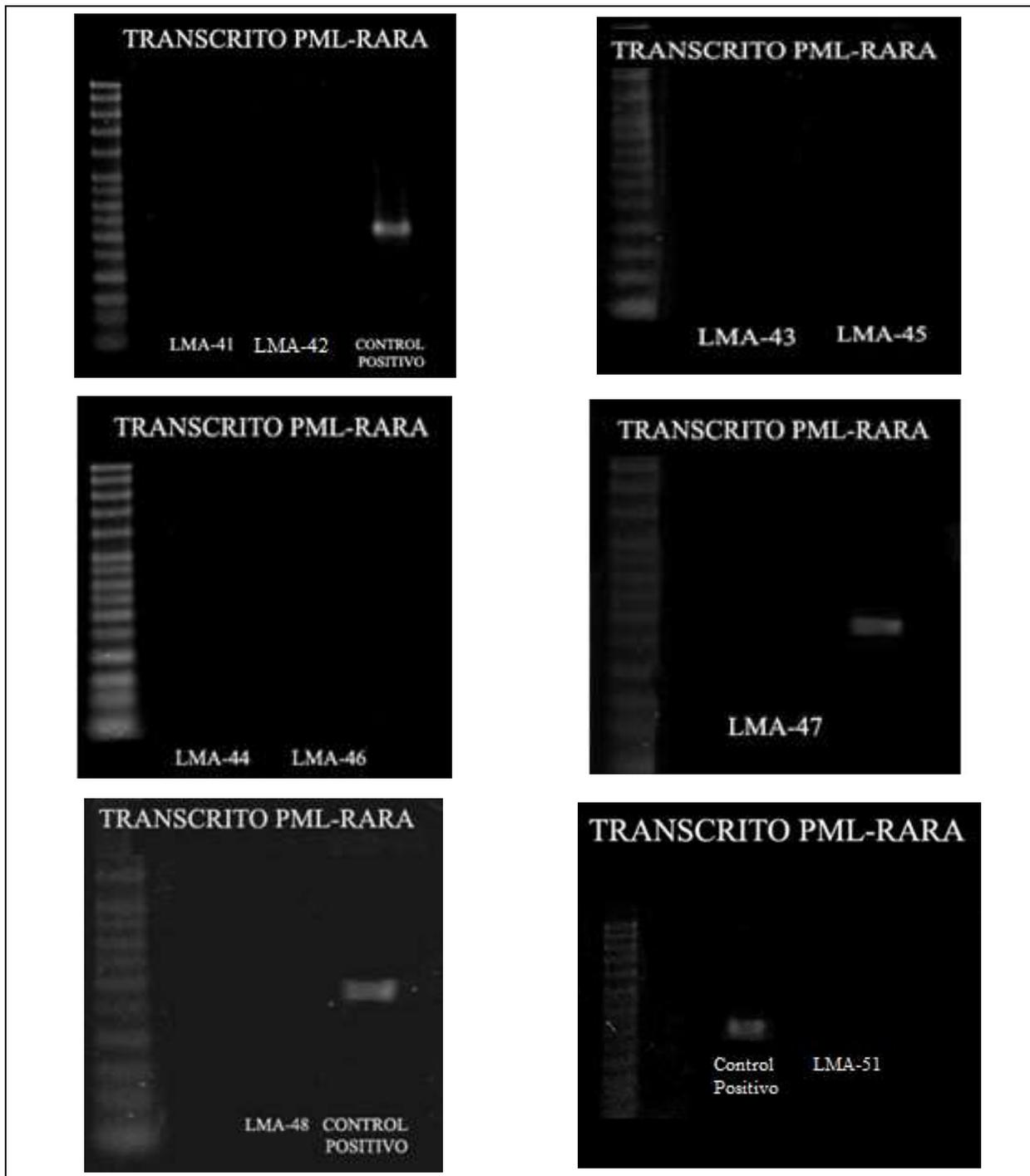


Figura No. 35: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras de LMA-41 hasta LMA-48 y LMA-51. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

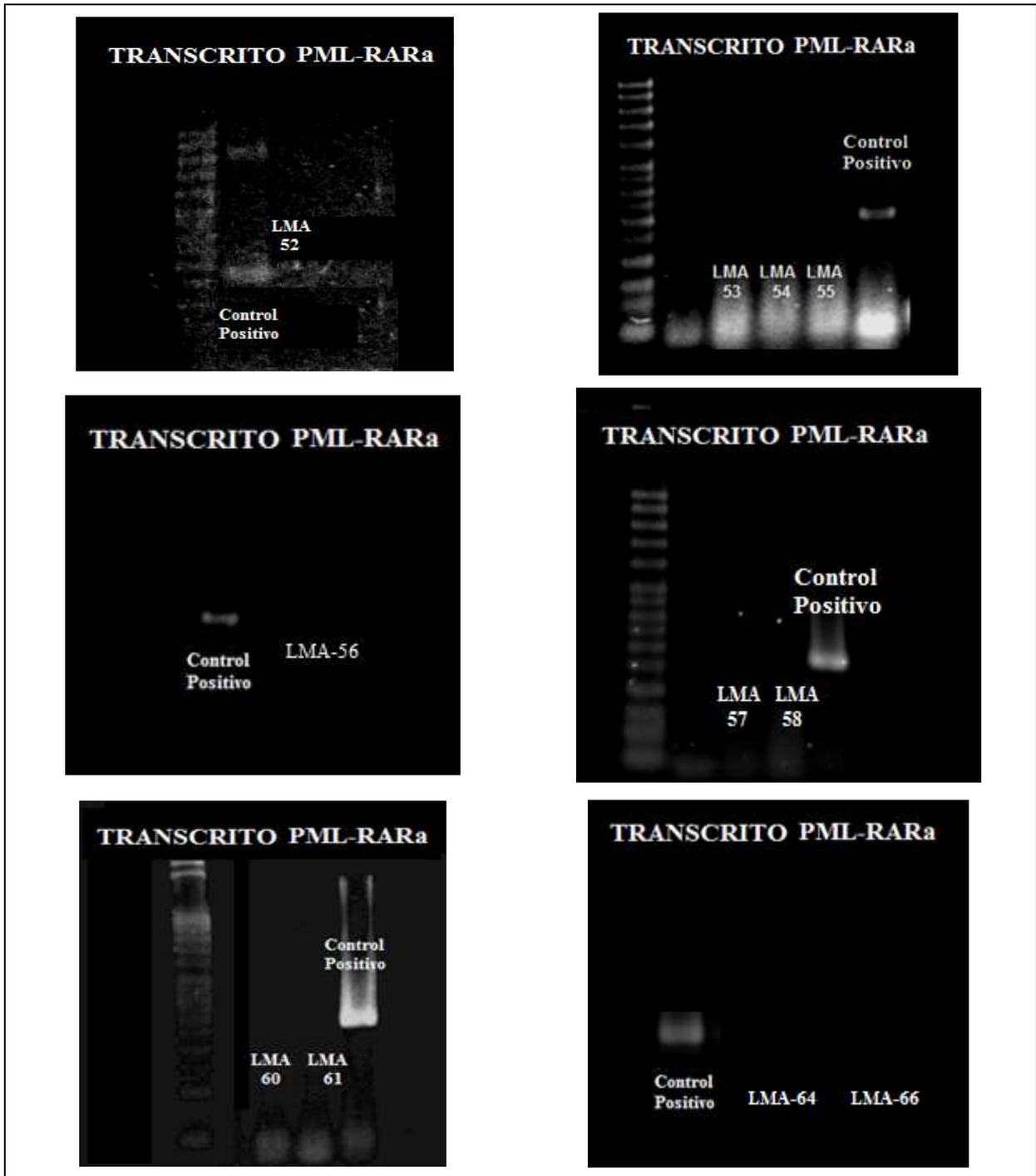


Figura No. 36: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras de LMA-52 hasta LMA-61 y LMA-64 y LMA-66. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

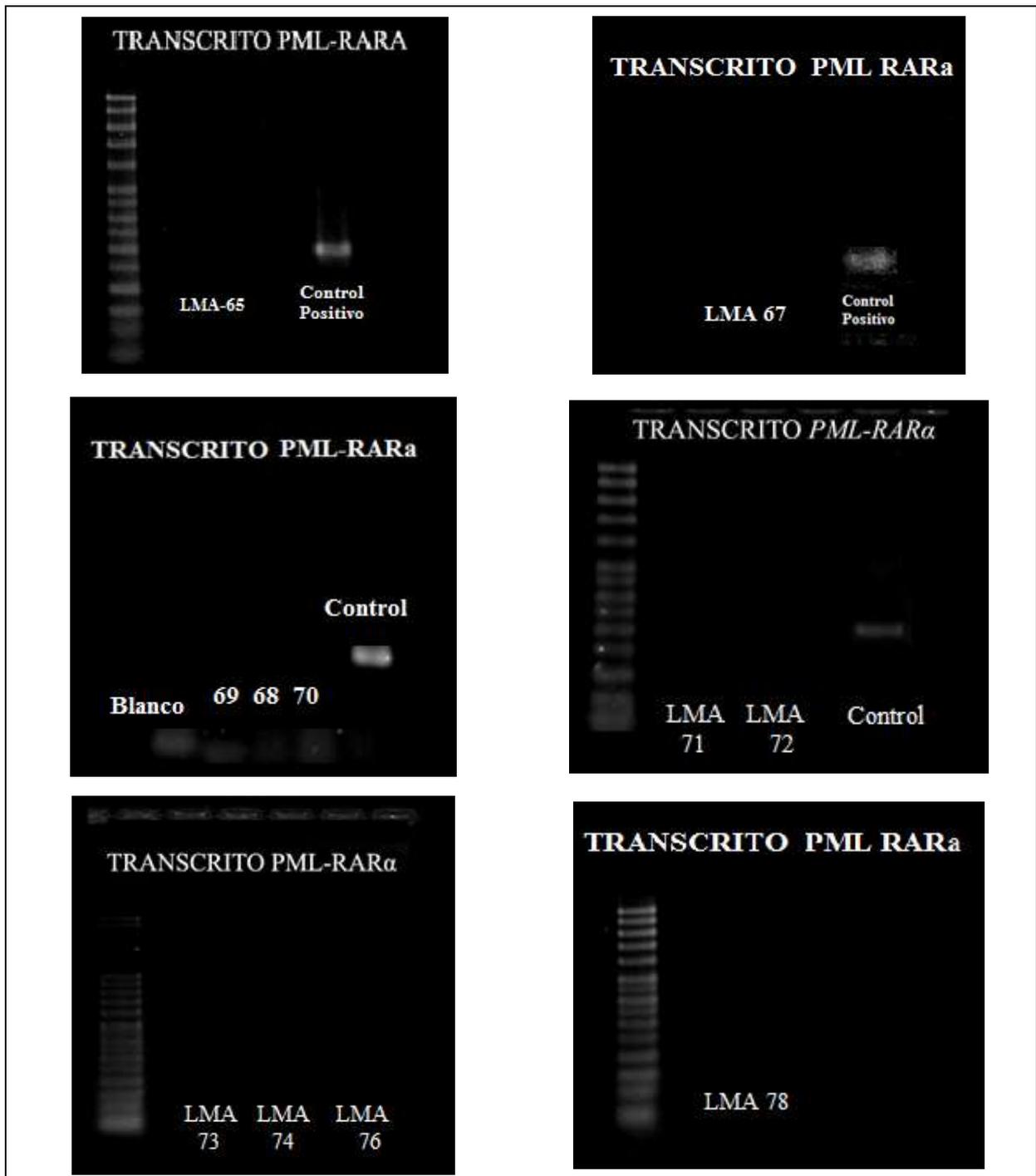


Figura No. 37: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras LMA-65, LMA-67, LMA-68 hasta LMA-74, LMA-76 y LMA-78. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

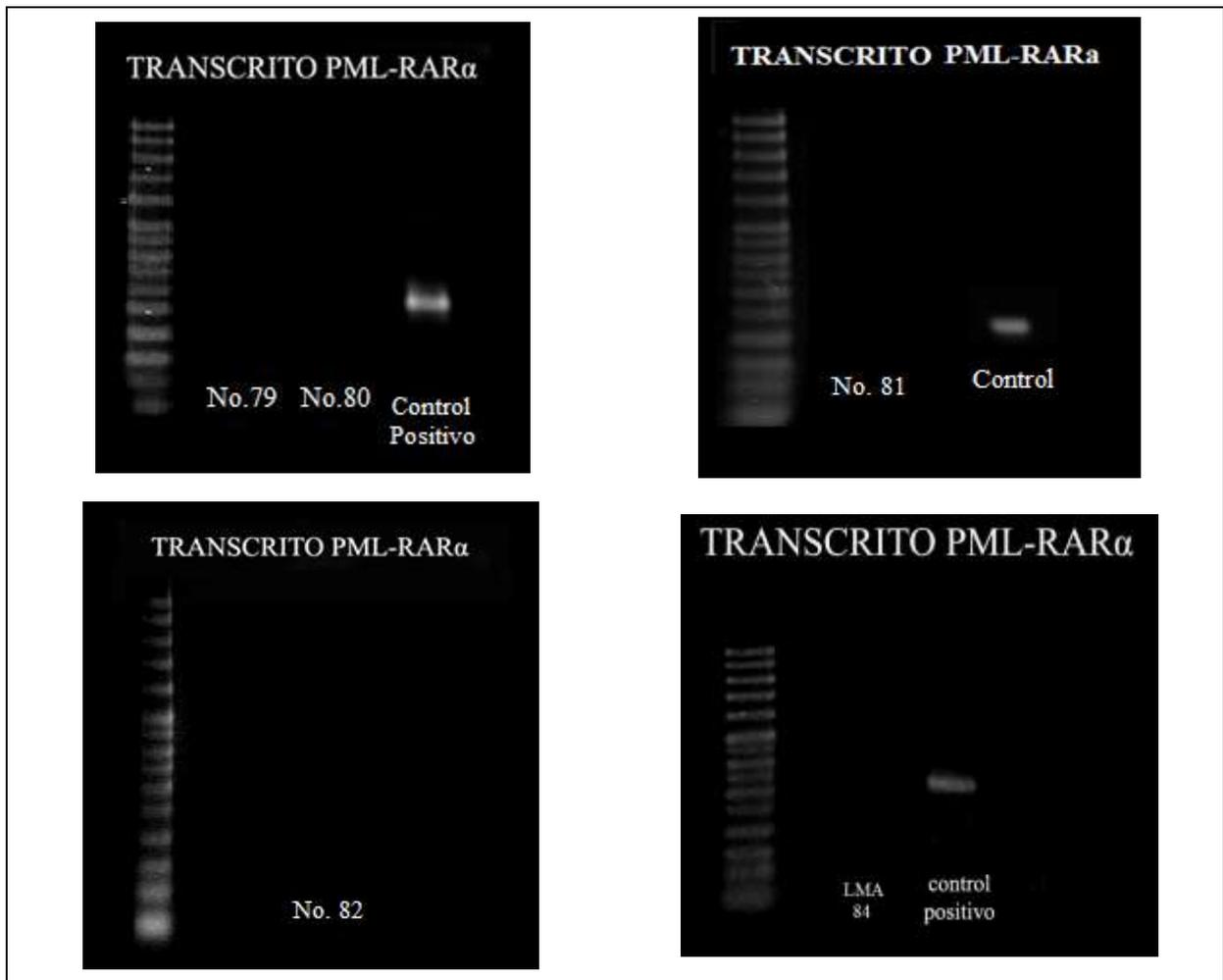


Figura No. 38: Análisis de muestras negativas t(15;17) (q22;q21). Las imágenes muestra la electroforesis de las muestras LMA-79, LMA-80, LMA-81, LMA-82 y LMA-84. Las muestras fueron negativas para el transcrito PML-RAR α .

Fuente: Datos experimentales proyecto FODECYT 70-2012

PARTE V
V.1 INFORME FINANCIERO

								AD-R-0013
FICHA DE EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA								
LINEA:								
FODECYT								
Nombre del Proyecto:				"Detección y evaluación por RT-PCR del transcrito PML-RARa producido por la t((15;17)(q22;q21), en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda"				
Numero del Proyecto:				070-2012				
Investigador Principal y/o Responsable del Proyecto:				DRA. CLAUDIA LORENA CARRANZA MELÉNDEZ				
Monto Autorizado:				Q353,650.00	Orden de Inicio (y/o Fecha primer pag		02/01/2013	
Plazo en meses				24 meses				
Fecha de Inicio y Finalización:				02/01/2013 al 31/12/2014				
Grupo	Renglon	Nombre del Gasto	Asignacion Presupuestaria	TRANSFERENCIA		Ejecutado	Pendiente de Ejecutar	
				Menos (-)	Mas (+)			
1		SERVICIOS NO PERSONALES						
	121	Divulgación e información	Q 2,000.00				Q 2,000.00	
	122	Impresión, encuadernación y reproducción	Q 2,000.00				Q 2,000.00	
	181	Estudios, investigaciones y proyectos de factibilidad	Q 160,400.00			Q 148,700.00	Q 11,700.00	
	189	Otros estudios y/o servicios: evaluación extena de impacto	Q 8,000.00				Q 8,000.00	
2		MATERIALES Y SUMINISTROS						
	241	Papel de escritorio	Q 500.00			Q 339.90	Q 160.10	
	242	Papeles comerciales, cartones y otros				Q 159.50		
	243	Productos de papel o cartón	Q 2,500.00			Q 950.00	Q 1,550.00	
	244	Productos de artes gráficas	Q 250.00			Q 246.60	Q 3.40	
	261	Elementos y compuestos químicos	Q 100,000.00			Q 99,748.31	Q 251.69	
	295	Útiles menores, médico-quirúrgicos y de laboratorio	Q 18,000.00			Q 17,430.40	Q 569.60	
3		PROPIEDAD, PLANTA, EQUIPO E INTANGIBLES						
	323	Equipo médico-sanitario y de laboratorio	Q 60,000.00			Q 58,879.68	Q 1,120.32	
		GASTOS DE ADMÓN. (10%)						
			Q 353,650.00			Q 326,454.39	Q 27,195.61	
		MONTO AUTORIZADO	Q 353,650.00			Disponibilidad	Q 27,195.61	
		(-) EJECUTADO	Q 326,454.39		-			
		SUBTOTAL	Q 27,195.61					
		(-) CAJA CHICA						
		TOTAL POR EJECUTAR	Q 27,195.61					

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Duración en meses																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Cotización y compra de reactivos	X	X	X	X											X	X	X							
Estandarización de técnicas				X	X	X																		
Vínculos con hospitales					X	X																		
Determinación de marcadores genéticos de LMA							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Informar sobre pronóstico							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Orientar a tratamiento							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Divulgar resultados																						X	X	X