



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LEUCEMIA
AGUDA EN
NIÑOS EN CENTROS HOSPITALARIOS
DE GUERRERO Y MORELOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :
MONICA VIRGINIA SAAVEDRA HERRERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2007.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la Ciudad de Chilpancingo Gro., y en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Unidad Académica de Medicina de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la Ciudad de Acapulco, Gro, México.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

y la asesoría de

Dr. Guillermo Ruiz Argüelles
Dra. Berenice Illades Aguiar
Dra. Adakatia Armenta Solís
Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Dr. Saúl López Silva

Con la colaboración de

Instituto Estatal de Cancerología “Arturo Beltrán Ortega”
Dr. Marco Antonio Terán Porcayo
Dra. Ana Bertha Rivera

Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla
Laboratorios Clínicos de Puebla
Dr. Alejandro Ruiz Argüelles
Dr. Javier Garcés Eissele
MC. Virginia Reyes Núñez
MC. Beatriz Pérez Romano
QFB. Adriana González Flores

Hospital del Niño Morelense
Dr. José de Jesús Figueroa Carbajal
Dr. Euler Chargoy Vivaldo

Esta investigación se desarrolló en parte con financiamiento de la “Fundación Javier Ibáñez Sandoval” y del C. Javier Ibáñez Reyes.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Mónica Virginia Saavedra Herrera, recibió beca del CONACYT.

INDICE	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS	33

Abreviaturas

ABL	Tirocina de Abelson
AKT	Proteincinasa B, cinasa serina/ treonina
AML1	Oncogen de la leucemia mieloide aguda 1
BCR	Breakpoint cluster region
BCR-ABL	Gen quimérico (Breakpoint cluster region/Abelson)
BD	Becton and Dickson
CBF α	Factor de unión al core alfa
CBF β	Factor de unión al core beta
CD	Designación de grupo
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CHMIP	Centro de hematología y medicina interna de Puebla
CI	Control interno
E2A	Factor de transcripción 3, E2A Immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47
E2A-PBX1	Gen quimérico
ETO	Ocho veintiuno, gen relacionado a la ciclina D
FAB	Franco Americano Británico
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
FL1	Fluorescencia de tipo 1
FL2	Fluorescencia de tipo 2
FL3	Fluorescencia de tipo 3
FSC	Tamaño celular
HAT	Acetil transferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
HNM	Hospital del Niño Morelense
HOX	Genes Homeobox
IEC-ABO	Instituto Estatal de Cancerología "Arturo Beltrán Ortega"
Inv16	Inversión del cromosoma 16
ISNC	Infiltración al sistema nervioso central
JUN	Oncogén JUN
KD	Kilodaltones
LA	Leucemia Aguda
LANL	Leucemia aguda no linfoblástica
LCP	Laboratorios clínicos de Puebla
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLAB	Leucemia linfoblástica aguda de células B
LLAT1	Leucemia linfoblástica aguda de células T

LMA	Leucemia mieloblástica aguda
M4Eo	Leucemia mieloblástica aguda con eosinofilia tipo M4
M-bcr	Región mayor del bcr
m-bcr	Región menor del bcr
MLL	Leucemia de linaje mixto
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
MYC	Virus de la mielocitomatosis
MYH11	Gen de la cadena pesada de la miosina
Pb	Pares de bases
PBX1	Factor de transcripción de la leucemia de células pre-B 1
PcG	Proteínas del grupo polycomb
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinato de clorofila
RAF	Oncogén viral de la leucemia murina
RAS	Oncogén del virus del sarcoma murino
RNA	Acido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Complejidad celular
STAT	Activador de la transcripción y transducción de señales
TEL	Translocation ets leukemia
TEL-AML1	Gen quimérico (translocation ets leucemia/ Oncogen de la leucemia mieloide aguda 1)

Figuras

Página

Figura 1. Transformación de las células hematopoyéticas en la LLA	4
Figura 2. Transducción de señales por la proteína quimérica BCR-ABL	6
Figura 3. Proteínas de fusión BCR-ABL	7
Figura 4. Inhibición de la transcripción por TEL-AML1	8
Figura 5. Interacción de la proteína quimérica CBF β MYH11 con el DNA	9
Figura 6. Regulación de la transcripción por AML1	10
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos de PCR para detectar la translocación t(9,22)	20
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos de PCR para detectar la translocación t(8,21)	21
Figura 9. Fenotipo inmunológico por citometría de flujo de un paciente con LAM	25
Figura 9.1. Histograma biparamétrico de la distribución de la población en base al tamaño y complejidad celular	25
Figura 9.2. Histograma biparamétrico de la expresión de CD45 y complejidad celular	25
Figura 9.3. Histograma biparamétrico de la expresión de los antígenos mieloides CD13 y CD33	25
Figura 9.4. Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración CD34 y del CD45	25
Figura 10. Fenotipo inmunológico por citometría de flujo de un paciente con LAL-B	26
Figura 10.1. Histograma biparamétrico de la distribución de la población en base al tamaño y complejidad celular	26
Figura 10.2. Histograma biparamétrico de la expresión de CD45 y complejidad celular	26
Figura 10.3. Histograma biparamétrico de la expresión de CD10 y complejidad celular	26
Figura 10.4. Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno CD19 y complejidad celular,	27
Figura 10.5. Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración HLA-DR y complejidad celular	27
Figura 10.6. Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración CD34 y complejidad celular	27

Tablas

Página

Tabla 1. Factores pronósticos actualmente conocidos en pacientes con leucemia aguda	3
Tabla 2. Clasificación FAB y anomalías genéticas asociadas en la LAM	5
Tabla 3. Fenotipo inmunológico y anomalías genéticas asociadas en la LLA	5
Tabla 4. Distribución de translocaciones reportadas en diversos estudios en México y su frecuencia	11
Tabla 5. Frecuencia de fenotipos reportados en diversos estudios en México	12
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados y condiciones de alineamiento, en el estudio sobre leucemia aguda. Acapulco, Guerrero, México, junio 2005 – Junio 2006	16
Tabla 7. Ocupación de los padres de los niños con LA participantes del estudio	17
Tabla 8. Escolaridad de los padres de los pacientes con LA participantes en el estudio	17
Tabla 9. Distribución geográfica de los casos de LA infantil en el estado de Guerrero de Junio de 2005 a Junio de 2006	18
Tabla 10. Distribución geográfica de los casos de LA provenientes del HNM	18
Tabla 11. Características clínicas y tipo de exposición de los pacientes participantes en el estudio sobre leucemia aguda en Guerrero y Morelos durante el periodo de Junio de 2005 a Junio de 2006	19
Tabla 12. Grupos de riesgo con base en los factores pronósticos observados en la población estudiada	20
Tabla 13. Resultado de la detección de translocaciones por RT-PCR en el grupo estudiado	21
Tabla 14. Fenotipos observados por citometría de flujo en la población en estudio	22
Tabla 15. Diagnóstico morfológico reportado en los pacientes estudiados	22
Tabla 16. Casos de discordancia entre el resultado del estudio morfológico y el fenotipo por citometría de flujo	22
Tabla 17. Grupos de riesgo con base en los factores pronósticos investigados en la población y la presencia de translocaciones.	23
Tabla 18. Factores de riesgo encontrados en los pacientes con LA agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia de translocación.	24

RESUMEN

Objetivo: Caracterizar inmunofenotípica y molecularmente los tipos de leucemia aguda (LA) infantil de los estados de Guerrero y Morelos, mediante la detección de las translocaciones t(9;22), t(8;21), t(12;21) e Inv (16), con el propósito de mejorar el diagnóstico y determinar si existe asociación entre la presencia de translocaciones y los factores de riesgo presentes en la población como son: exposición a agroindustriales, solventes, radiaciones, antecedentes familiares de leucemia, cáncer o defectos genéticos. **Métodos:** De Junio de 2005 a Junio de 2006 se captaron 40 pacientes provenientes del Instituto Estatal de Cancerología "Arturo Beltrán Ortega" y el Hospital del Niño Morelense con diagnóstico de Leucemia Aguda. Se buscaron las translocaciones t(9;22), t(8;21), t(12;21) e Inv (16) a partir de sangre periférica por RT-PCR, y por citometría de flujo se determinó el inmunofenotipo para conocer el linaje de la estirpe leucémica. Se aplicó una encuesta a los padres para conocer los factores de riesgo presentes en la población. **Resultados:** La región más afectada fue Acapulco (42.42%), la mayoría de los padres eran campesinos y las madres ama de casa, los pacientes en su mayoría provenían del medio rural y con condición socioeconómica baja. Se observó presencia de translocaciones en el 17.5% de los pacientes, las frecuencias fueron: 10% para t(9;22), 5% para t(8;21), 2.5% para t(12;21) y 0% para Inv (16). La mayoría de los pacientes que portaban translocación presentaban factores pronósticos adversos como: edad mayor de 10 y menor de un año (RM=3.3), desnutrición (RM=3.4), cuentas de leucocitos mayores a 50,000mm³ (RM=4.7), infiltración al sistema nervioso centra (ISNC) (RM=4.7) y fenotipos de células T y LAM (RM=9.3). En cuanto a los factores de exposición presentes en la población, el 20% de las familias reportaron antecedentes familiares de cáncer (RM=8), 5% reportó antecedentes familiares de defectos genéticos, 50% reportó exposición a agroindustriales (RM=1.6), 10% exposición a solventes (RM=4.7) y 2.5% exposición a radiaciones. Se encontró discordancia entre el resultado del estudio morfológico y la fenotipificación por citometría de flujo en el 23.3% de los casos, situación que sugirió un ajuste en la terapia. **Conclusiones:** Al caracterizar molecular e inmunofenotípicamente a los pacientes con LA, se logró el diagnóstico exacto del tipo de leucemia en el 23.3% de los casos, reasignándose a cada paciente al grupo de riesgo correspondiente, lo que conllevó un cambio en el esquema de terapia, con una recuperación inmediata del paciente en la mayoría de los casos, lo cual confirmó la utilidad del uso de nuevas tecnologías en el diagnóstico y tratamiento de las LA.

ABSTRACT

Objective: To characterize immunophenotype and molecularly the types of childhood AL in the state of Guerrero and Morelos, Mexico, by way of the detection of the translocations t(9;22), t(8;21), t(12;21) and Inv 16 with the purpose to improve the diagnosis and determine if an association exists between the presence of translocations and the risk factors present in the population which are: exposure to agroindustrials, solvents, radiation, family ancestry of leukemia, cancer or genetics defects. **Methods:** From June 2005 to June 2006, 40 patients coming from IECABO and HNM were observed with diagnosis of AL, they were given RT-PCR to detect the translocations t(9;22), t(8;21), t(12;21) and Inv 16, from blood averages taken from this showed the phenotification for citometric flow to detect lineage of a leukemic link and inquest with the parents to detect risk factors present in the population. **Results:** The region most affected was Acapulco (42.42%), the majority of the parents were farmers and the mothers house wives, the patients in the majority came from a rural background and a low socio-economic condition. The presense of translocations were observed in 17.5% of the patients, the frequency was 10% in the case of t(9;22), 5% for t (8;21), 2.5% for t(12;21) and 0% for Inv 16, the majority of the patients that showed translocation presented adverse prognosis factors like age (OR=3.3), undernurishment (OR=3.4), lucosyt counts greater than 50,000mm³ (OR=4.7), ISNC (OR=4.7) and phenotypes of high risk (OR=9.3). The exposition factors present in the population were, 20% of the families report family ancestry of cancer (OR=8), 5% report family ancestry of genetic defects, 50% report agroindustrial exposure (OR=1.6), 10% exposure to solvents (OR=4.7) and 2.5% exposure to radiation. Discordance was found between the results of the morphological study and the phenotification for cytometry flor in 23.3% of cases, changing the diagnosis and reassigning the terapies. **Conclusion:** characterize immunophenotype and molecularly to the patients with AL it get the correct diagnosis from leukemia type in 23.3% of cases, reassigning the patients of the group of corresponding risk which accompany the change of the scheme of therapy with a patient recovery in most of cases that which confirm the utility from new technology in the diagnosis and treatment of AL.

INTRODUCCIÓN

La leucemia aguda (LA) es una patología en la que existe proliferación incontrolada de precursores hematopoyéticos, los eventos que favorecen esta proliferación alteran diferentes mecanismos reguladores del ciclo celular.^{1,2} Los avances en el campo de la biología molecular han permitido que el resultado en los tratamientos de esta patología se vean mejorados de una manera espectacular, de tal manera que si anteriormente era un sinónimo de muerte, actualmente sea lo contrario; la tasa de sobrevivencia a 5 años ha aumentado al 80%, debido al conocimiento actual de la patología molecular de la leucemia^{3,4}, lo que ha permitido comprender los mecanismos afectados por la enfermedad y las posibles maneras de corregir estas anomalías.

Existen factores pronósticos de las leucemias que permiten clasificar a los pacientes en dos grupos, los de riesgo estándar y los de riesgo alto⁵, situación que determina el tratamiento que se asignará a cada uno. El seguimiento del tratamiento en la finalización de cada una de las etapas es de gran ayuda para tomar decisiones terapéuticas, gracias a estas acciones la tasa de éxito del tratamiento se ha incrementado. La inmunofenotipificación es muy útil para caracterizar a las leucemias agudas pobremente diferenciadas y para definir las categorías pronósticas de los pacientes. (Tabla 1).

Tabla 1
Factores pronósticos actualmente conocidos en pacientes con LA ^{6, 7,8, 9,10}

Característica	Grupo de riesgo estándar	Grupo de riesgo alto
Edad	entre 1 y 9 años	menos de 1 y mas de 9 años
Cuenta inicial de glóbulos blancos	menos de 50,000/mm ³	igual o mayor a 50,000
Inmunofenotipo	precursor B	células T, células B maduras
Género	Femenino	masculino
Estado del SNC	SNC1 = 0 sin blastos en líquido cefalorraquídeo	SNC2 = menos de 5 blastos/ml de LCR SNC3 = más de 5 blastos/ml de LCR
Genética molecular	TEL-AML1	reordenamientos del gen MLL, t(4,11),t(9,22)

Los estudios citogenéticos y moleculares proveen información pronóstica y llegan a ser vitalmente importantes para definir el esquema más adecuado de tratamiento. La aplicación óptima de estas técnicas para el diagnóstico permite que las estrategias de tratamiento sean dirigidas con mayor especificidad y que el éxito de la terapia sea mayor ^{11,12}

Las alteraciones moleculares que conllevan a la transformación celular, implican activación o alteración de protooncogenes o la inactivación y pérdida de la función de genes supresores de tumor.¹³ Las translocaciones cromosómicas son las mejor caracterizadas, algunas son específicas de un determinado tipo de leucemia y pueden dar lugar a la activación oncogénica de un gen crítico en los

procesos celulares de supervivencia o ciclo celular (protooncogen) o por la generación de un gen híbrido¹³.

El desarrollo de una leucemia requiere que una célula hematopoyética totipotencial o que uno de sus progenitores comprometidos eludan los mecanismos normales de control homeostático que regulan la señalización de los factores de crecimiento, la diferenciación, la apoptosis o el autorenovamiento (Figura 1, panel A).

Una vía común marcada por los factores de transcripción quiméricos generados por las translocaciones como las proteínas de fusión MLL, TEL-AML1 y E2APBX1, es la cascada transcripcional mediada por los genes HOX (figura 1, panel B), el complejo AML1-CBF β es un factor de transcripción que funciona directa o indirectamente para regular la transcripción de miembros específicos de la familia de genes HOX. La proteína MLL es requerida para mantener esta transcripción, mientras que los miembros de la familia de proteínas del grupo polycomb reprime la transcripción de los genes HOX. Las proteínas HOX a su vez colaboran con cofactores, incluyendo a la proteína PBX1, para inducir la transcripción de genes blanco río abajo, cuyos productos influyen en la autorenovación, la proliferación y la diferenciación de las células totipotenciales hematopoyéticas y sus progenitores comprometidos¹³.

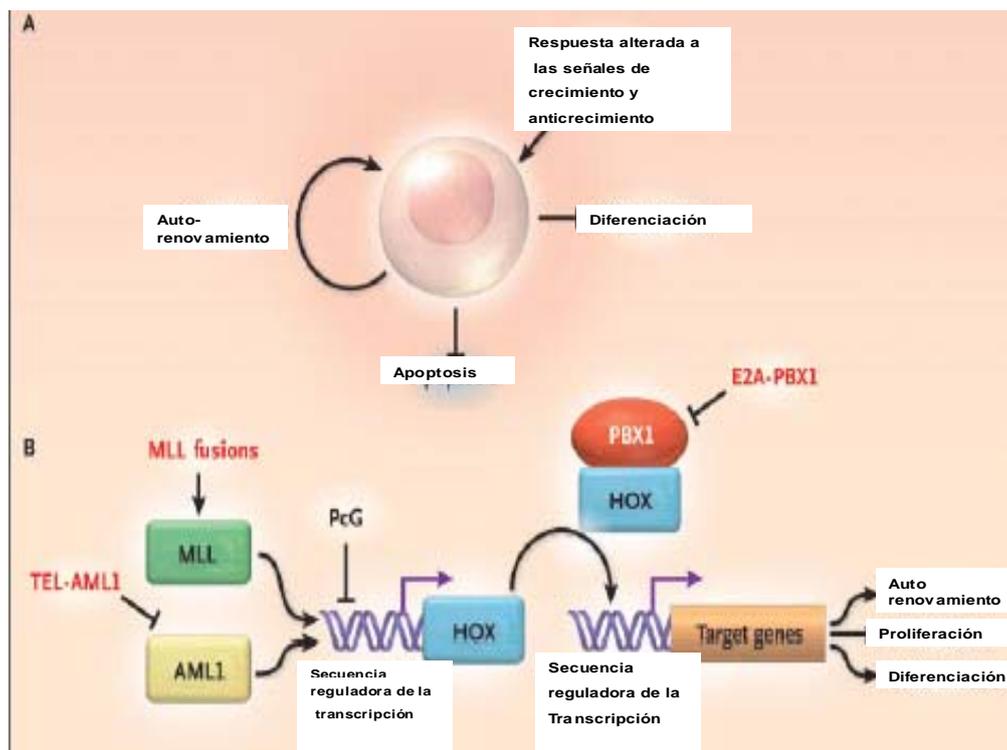


Figura 1. Transformación de las células hematopoyéticas en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Se muestra el efecto de las proteínas quiméricas E2A-PBX1, MLL y TEL-AML1 en la transcripción de los genes blanco.¹³

La clasificación morfológica mas utilizada es la Franco Americana Británica (FAB), la cual reconoce tres variedades de LLA y ocho variedades de LMA, algunas alteraciones moleculares han sido asociadas a estas variedades, como se muestra en las tablas 2 y 3.

Tabla 2
Clasificación FAB y anomalías genéticas asociadas en la LMA^{13,14}

Subtipo FAB	Nombre común (% de casos)	Translocaciones y reordenamientos asociados	% de casos	Genes involucrados	Tipo de riesgo
M0	LMA con diferenciación mínima (3%)	Inv(3q26) y t(3;3)	1	EVII	Estándar
M1	LMA sin maduración (15-20%)				Estándar
M2	LMA con maduración (25-30%)	t(8;21) t(6;9)	40 1	AML1-ETO DEK-CAN	Estándar
M3	Leucemia promielocítica aguda (5-10%)	t(15;17) t(11;17) t(5;17)	98 1 1	PML-RAR α PLZF-RAR α NPM-RAR α	Estándar
M4	Leucemia mielomonocítica aguda	11q23 Inv(3q26) t(3;3) t(6;9)	20 3 3 1	MLL, DEK-CAN, EVII	
M4Eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinófilos anormales (5-10%)	Inv(16), t(16;16)	80	CBF β -MYH11	Estándar
M5	Leucemia monocítica aguda (2-9%)	11q23 t(8;16)	20 2	MLL MOZ-CBP	Alto
M6	Eritroleucemia (3-5%)				
M7	Leucemia megacariocítica aguda (3-12%)	t(1;22)	5	desconocido	

Tabla 3
Fenotipo inmunológico y anomalías genéticas asociadas en la LLA^{13,14}

Fenotipo Inmunológico	Translocaciones y reordenamientos asociados	% de casos	Genes involucrados	Tipo de riesgo
LLA linaje T		15%		
	LLAT1	58%	TAL1	Alto
	Genes homeobox	27%	HOX	Alto
	LI derivada de secuencia 1	12%	LYL1	Alto
	Leucemia de linaje mixto	3%	MLL	Alto
LLA linaje B		85%		
	t(9;22)	3%	ABL-BCR	Alto
	t(1;19)	5%	E2A-PBX1	Estándar
	t(4;11)	5%	AF4-MLL	Alto
	t(12;21)	22%	TEL-AML1	Estándar
	Hiperdiploidia	25%		Estándar
	Otras	40%		Estándar

Las translocaciones de mayor significado médico son:

Translocación t(9;22):BCR-ABL. También conocida como cromosoma Filadelfia, es una translocación cromosomal recíproca que involucra los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, fusionando un segmento del gen *bcr* del cromosoma 9 a la región río arriba del segundo exón del gen *c-abl* en el cromosoma 22, este último codifica un receptor tirosinacinas que tiene una actividad finamente controlada en las células normales. En contraste, la proteína de fusión BCR-ABL, derivada de esta traslocación, tiene actividad catalítica constitutiva porque la secuencia de aminoácidos del segmento *abl* de BCR-ABL es idéntico al de *c-abl* (figura 2). La proteína quimérica altera las vías de señalización que controlan la proliferación, supervivencia y la autorenovación de las células madre hematopoyéticas^{15, 16}.

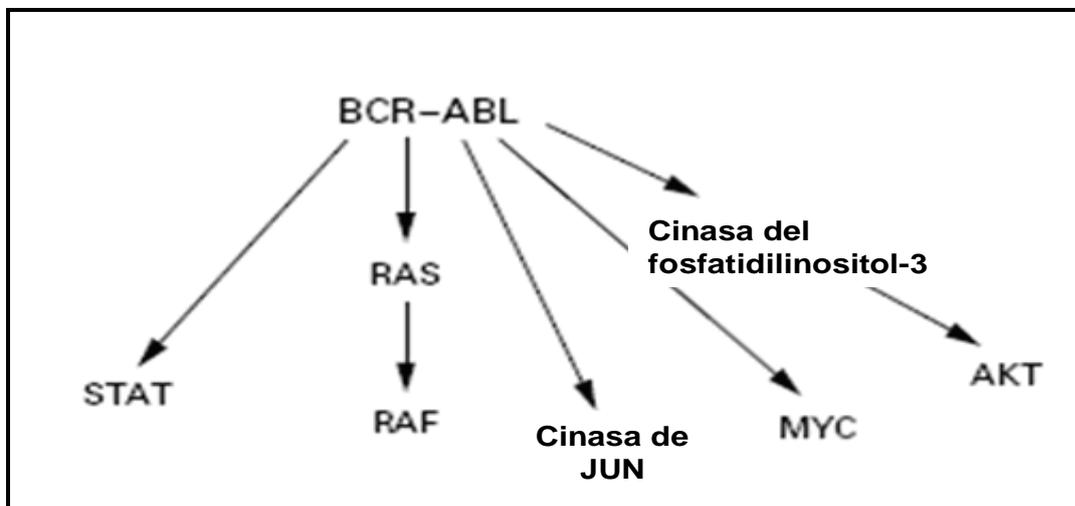


Figura 2. Transducción de señales por la proteína quimérica BCR-ABL. La activación constitutiva del dominio tirosina cinasa de la proteína BCR-ABL causa la activación de numerosas vías de transducción de señales citoplásmicas y nucleares que afectan el crecimiento y la supervivencia de las células hematopoyéticas¹⁵.

El mRNA quimérico traduce una proteína de 210 Kd llamada p210 BCR-ABL (figura 3), en algunos casos el rompimiento sobre el cromosoma 22 sucede en el extremo 5' del *M-bcr* dentro de un largo segmento de un intrón que separa el exón alternativo e2' del e2 llamado *bcr* menor (*m-bcr*). El splicing de los exones e1 y e2 crea una unión e1-a2 en el transcrito BCR-ABL, traducándose en una proteína de fusión mas pequeña llamada p190^{BCR-ABL} de 190 kD, la cual funciona principalmente durante la diferenciación linfóide o mielóide, la p210 contiene secuencias adicionales que alteran vías comunes de los precursores mieloides o linfoides. Los fenotipos clínicos de ambas mutaciones son muy parecidos y existe gran controversia sobre su relación con el resultado del tratamiento^{17,18,19}.

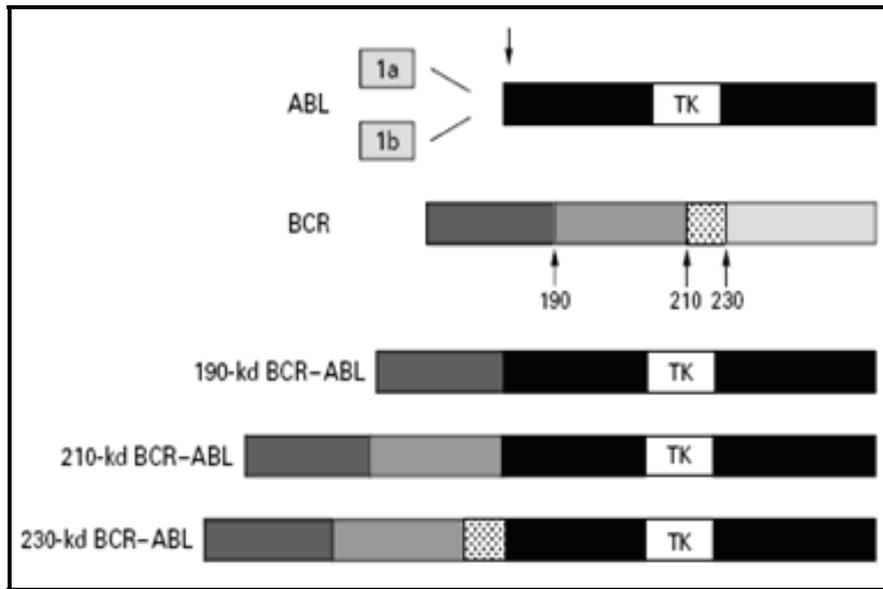


Figura 3. Proteínas de fusión BCR-ABL. Se muestra el sitio de rompimiento con flechas. El tamaño de las proteínas de fusión depende de la cantidad de la secuencia de BCR que sea retenida. La longitud de la secuencia de ABL es la misma en todos los casos. ABL tiene dos exones alternativos iniciales (1a y 1b). TK denota el dominio tirosinacinasasa¹⁵.

Translocación t(12;21). Es un marcador presente con frecuencia en pacientes jóvenes con leucemia linfoblástica aguda, se genera por la fusión entre los genes TEL y AML1; TEL es un miembro de la familia de genes ETS de factores de transcripción y AML1 codifica la fracción α del factor de unión al core, un regulador maestro de la formación de células totipotenciales hematopoyéticas definitivas. El factor de transcripción quimérico retiene un dominio esencial para la interacción proteína-proteína de TEL y las secuencias reguladoras de transcripción y de unión al DNA de AML1 (también conocida como CFB α). La proteína de fusión TEL-AML1 causa la inhibición de la actividad transcripcional. Normalmente AML1 se une a la secuencia del DNA por medio de una secuencia aumentadora del core, la unión de AML1 a la secuencia recluta factores y activadores de la transcripción a esta región, los complejos proteínicos resultantes regulan la transcripción, como son acetilasas de histonas que causan cambios conformacionales en la cromatina que favorecen la transcripción de genes (figura 4, panel A). TEL-AML1 se une también a la secuencia de DNA aumentadora del core y recluta desacetilasas de histonas, las cuales favorecen la compactación de la cromatina, resultando en la inhibición de la transcripción (figura 4, panel B). Estos cambios en la cascada transcripcional, alteran la capacidad de autorenovación y la capacidad de diferenciación de las células totipotenciales hematopoyéticas.

La conversión de un factor de transcripción, por medio de una translocación cromosomal, de ser un activador a ser un represor de genes, es un mecanismo patológico recurrente, no solo en las leucemias linfoblásticas, sino también en las

mieloblásticas, que forman proteínas de fusión que contienen a AML1 o al receptor α del ácido retinoico^{13,20,21}.

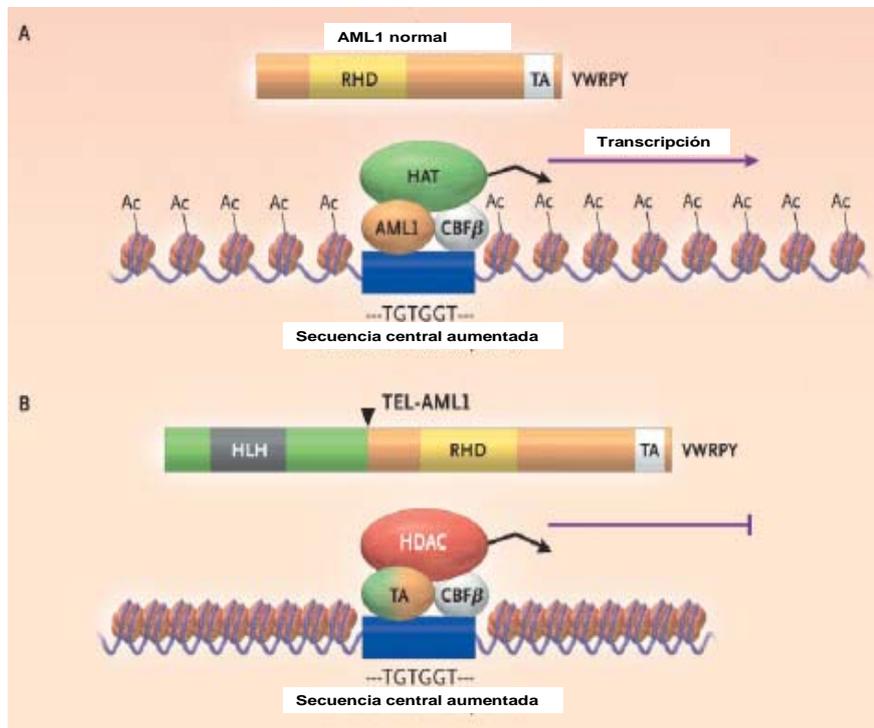


Figura 4. Inhibición de la transcripción por TEL-AML1. Panel A. Se observa el funcionamiento de AML1 normal, el cual tiene un dominio de unión al DNA y un dominio de unión al Factor de Unión al Core (CBF β). Al unirse estos dos factores de transcripción se reclutan las proteínas acetil transferasas de histonas (HAT), las que agregan grupos acetilos a las histonas, lo que favorece la transcripción de genes blanco. Panel B. Se observa a la proteína quimérica TEL-AML1 que mantiene su dominio de unión al DNA y al CBF β , pero ésta recluta proteínas desacetilasas de histonas (HDAC), que retiran los grupos acetilos presentes en las histonas, compactando el DNA e impidiendo la transcripción de genes blanco¹³.

Translocación Inv (16) (p13;q22). Se detecta en un porcentaje importante de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (M4Eo) y de acuerdo a la FAB es aquella en la que más del 20% pero menos del 80% de las células no eritroides son de linaje monocítico, comúnmente promonocitos. Más del 30% de las células no eritroides deben ser blastos, la concentración de monocitos en sangre debe ser mayor de $5 \times 10^9/L$. Estas aberraciones cromosómicas provocan una fusión entre dos genes, llamados CBF β (por sus siglas en inglés) y MYH11 (por sus siglas en inglés) y que es representada como CBF β /MYH11 (figura 5). La función de CBF β puede deducirse de su homólogo murino CBF β (o PEBP2b) ya que tienen un porcentaje de homología del 98% a nivel protéico. El gen codifica para 2 isoformas de la unidad β del factor de transcripción heterodimérico CBF, el cual consta de 2 subunidades (α y β). CBF se une a los elementos aumentadores de los genes de varios virus de la leucemia murina y de manera similar a los

aumentadores de los genes de los receptores de las células T. La subunidad α del CBF es idéntica a AML1, uno de los genes involucrados en la translocación t(8;21) de LAM-M2, que se localiza en el cromosoma 21 en el brazo largo en la posición 22. La subunidad β no se une directamente al DNA sino que forma un complejo heterodimérico con la unidad α lo que aumenta la afinidad de este último por el DNA. CBF debe ser crucial para el control de la división y/o la diferenciación celular del linaje mieloide puesto que la expresión de cualquiera de las subunidades como una proteína de fusión se asocia con el bloqueo de la diferenciación y la expansión descontrolada de las células leucémicas. Actualmente se ha demostrado que CBF β regula la expresión de dos genes específicos para la estirpe mieloide: mieloperoxidasa y elastasa neutrófila¹⁴.

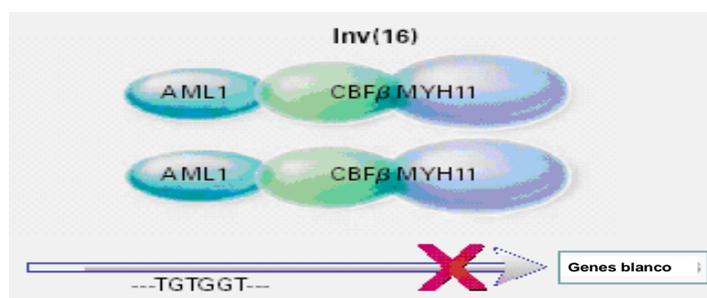


Figura 5. Interacción de la proteína quimérica CBF β MYH11 con el DNA. La proteína quimérica CBF β MYH11 codificada por la mutación Inv (16) continúa interactuando con AML1, sin embargo en lugar de permitir que AML1 interactúe con el DNA, esta proteína quimérica recluta a AML1 hacia un complejo inactivo funcionalmente en el citoplasma¹⁴.

El gen quimérico CBF β /MYH11, en la mayoría de los casos, provoca la remoción de los últimos 17 aminoácidos de la proteína CBF β . Esto modifica la función biológica de la proteína como reguladora de la expresión de genes, relacionándose este evento a la presencia de la leucemia. La proteína de fusión debe tener un efecto dominante puesto que sólo uno de los dos cromosomas 16 está invertido en las células leucémicas. Se ha visto que los pacientes que presentan la alteración cromosómica, tienen una supervivencia sin enfermedad de 74% después de 10 meses. En un seguimiento a 44 meses, 58% alcanza la remisión completa con quimioterapia convencional y profilaxis intratecal. En general la Inv (16) está asociada con un buen pronóstico para el paciente, siempre y cuando no se detecten otras alteraciones cromosómicas como las trisomias.

Traslocación t(8;21). La clonación de la translocación t(8;21) asociada a la leucemia mieloide aguda, llevó a la identificación de AML1, el cual codifica la subunidad de unión al DNA de AML1-CBF β , un factor de transcripción que regula un número específico de genes de la hematopoyesis y es esencial para el correcto desarrollo del sistema hematopoyético. Más sorprendente fue la observación de que el reordenamiento cromosomal asociado a la leucemia mieloide aguda inv (16) o su variante (16;16) tenía como blanco a CBF β , la otra

subunidad de este complejo factor de transcripción. Recientemente se ha encontrado que AML1-CBF β es el blanco de la translocación t(12;21) en la LLA pediátrica y en un número de translocaciones raras en AML, haciéndolo el blanco más frecuente de los reordenamientos cromosomales en la leucemia humana. La translocación t(8;21) se encuentra en aproximadamente el 40% de los pacientes con LMA subtipo FAB M2 pero no está restringida solo a él. La fusión creada por esta translocación, une el extremo amino terminal de AML1 incluyendo los dominios de unión al DNA y de interacción con CBF β , con el extremo carboxilo terminal del gen 821 (ETO) en el cromosoma 8. Aunque la proteína resultante mantiene su habilidad de unirse a las secuencias blanco reguladoras de AML1, ésta no activa la transcripción, sino que reprime predominantemente la activación mediada por AML1. (figura 6). Parece que la represión transcripcional es mediada directamente por la interacción de ETO con el complejo corepresor nuclear^{14,22,23}.

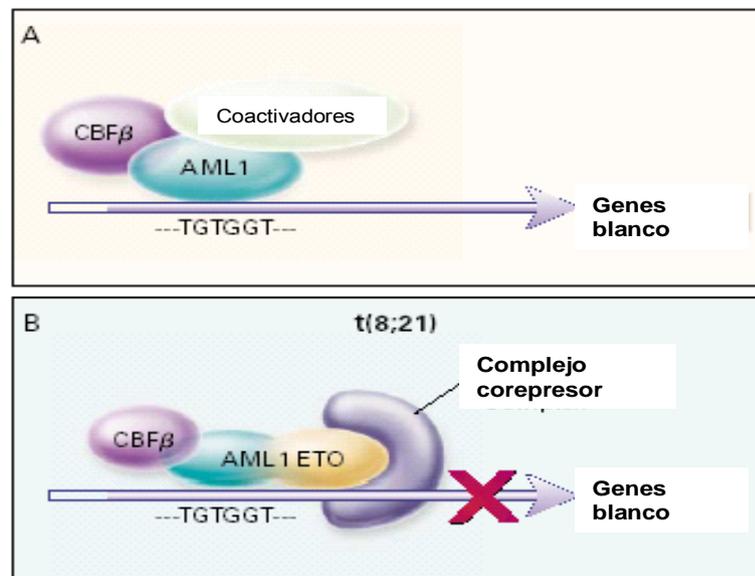


Figura 6. Regulación de la transcripción por AML1. Panel A. En las células normales el complejo heterodimérico del factor de transcripción AML1-CBF β se une a la secuencia del DNA TGTGGT en la región reguladora transcripcional de los genes blanco regulados por AML1 y activa la transcripción a través del reclutamiento de coactivadores. Panel B. En las células de la LAM con la translocación t(8,21) el extremo aminoterminal de AML1 se fusiona con el extremo carboxilo terminal de ETO. La proteína quimérica resultante continúa interactuando con CBF β y se une a la secuencia aumentadora del core, sin embargo ETO recluta un complejo corepresor nuclear y resulta en la represión dominante de los genes blanco regulados por AML1¹⁴.

La frecuencia las translocaciones de las leucemias en México, se muestra en la tabla 4.²⁴

Tabla 4
Distribución de translocaciones reportadas en diversos estudios en México y su frecuencia²⁴.

Translocaciones reportadas en México	Frecuencia (%)
t(15;17)	18.8
t(9;22)	9.2
Reordenamientos de los cromosomas 1,2,3,12 y 17	8.2
Anormalidades de 16 q22	7.3
t(8;21)	6.3
t(12;21)	8.5
-7 del	5.6
t(6;9)	5.3
Anormalidades de 11q23	4.6

La citometría de flujo es el método preferido para la inmunofenotipificación, con ella las células sanguíneas inmaduras pueden distinguirse por su complejidad celular y la expresión de CD45, la cual aumenta a medida que la célula madura, la técnica es conocida como Gating CD45, que acoplada a la expresión de antígenos de superficie celular provee información que permite definir con claridad la estirpe celular. La sensibilidad de la técnica permite detectar una célula leucémica entre 10,000 o más células normales.^{25,26}

La inmunofenotipificación es muy útil para caracterizar a las leucemias agudas pobremente diferenciadas y para definir las categorías pronósticas de los pacientes. Los estudios citogenéticos y moleculares proveen información pronóstica y llegan a ser vitalmente importantes para definir el esquema de tratamiento adecuado. La aplicación óptima de estas técnicas para el diagnóstico, permite que las estrategias de tratamiento sean dirigidas con mayor especificidad y que el efecto de la terapia sea más eficaz.^{27,28}

Existen diversos protocolos para la fenotipificación de la LA, pero las condiciones económicas de los países Latinoamericanos no hacen posible su desarrollo debido a los altos costos que estos implican^{31,32}, por tal motivo se realizó el segundo consenso latinoamericano para la inmunofenotipificación por citometría de flujo de las malignidades hematológicas, en el cual se acordó que la fenotipificación de la LA debe ser capaz de reconocer el linaje y la inmadurez celular, como se detalla a continuación:

a) LLA de linaje T, se sugiere la utilización de CD2, CD7 y CD3 como los mejores marcadores de linaje de células T, mientras que la etapa de madurez será definida por la presencia de CD34, TdT y CD45.

b) LLA de linaje de precursores de células B, se recomienda el uso de CD19, CD10 y CD79 α para definir el linaje B, y CD34, CD45, HLA-DR y TdT para determinar la etapa de maduración.

c) LAM, la definición del linaje celular de los blastos se logra por medio de CD13, CD33, MPO, y CD117, y para la etapa de maduración se sugiere el empleo de HLA-DR, CD34 y CD45.

d) LA bifenotípicas, pueden identificarse cuando los blastos presentan los marcadores de dos líneas celulares, no obstante debe descartarse su expresión aberrante mediante el empleo de CD3, CD19 y MPO³²

La clasificación de LA más precisa se logra determinando la expresión de dos antígenos de línea y dos de maduración.

Los subtipos inmunológicos que se han reportado en las ciudades de México y Puebla, se muestran en la tabla 5.^{29,30}:

Tabla 5
Frecuencia de fenotipos reportados en diversos estudios en México^{29,30}.

Subgrupo	Frecuencia (%)	Ciudad
LLA nula	5	México
PreB temprana	7.5	México
Común	74.6	México
Células B	3.5	México
Células T	9.4	México
Pre B	4.6	Puebla
Común	2	Puebla

El estudio de genotipo se ha convertido en una de las características más importantes para tomar decisiones terapéuticas, entre las que se encuentran el llevar a cabo o no trasplante alogénico de médula ósea durante la primera remisión del padecimiento. Se recomienda que los centros que no cuenten con métodos para hacer estudios citogenéticos y moleculares de las células leucémicas, se asocien con otros en los que se lleven a cabo estos estudios.

En México la leucemia aguda es la séptima causa de muerte en la edad preescolar (1-4 años) con 255 defunciones en el 2005 y es la segunda causa de muerte en la edad escolar (5 a 14 años) con 602 defunciones para el mismo año y representa el 34.4% de las neoplasias malignas en pediatría, entre ellas la leucemia linfoblástica corresponde al 75% de todas las modalidades de leucemia aguda, su incidencia en México es de cinco casos por cada 100,000 por año y el pico de edad de máxima frecuencia es entre los dos y los cinco años, la mayor cantidad de pacientes se ha registrado en el Distrito Federal, Puebla, Jalisco y Nuevo León^{33,34}.

Las leucemias agudas no linfoblásticas abarcan el 25% de las leucemias agudas en niños mexicanos, la incidencia de esta enfermedad es de 3 a 5.5 casos por millón, de manera leve el género masculino es el más afectado, se ha comunicado una incidencia relativamente mayor en las grandes ciudades de la República Mexicana, con inclusión del DF, Guadalajara, Monterrey y Puebla, lo cual quizá se relaciona con la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico más preciso en esos sitios^{29,33}.

La leucemia aguda tiene un mecanismo causal multifactorial y una composición biológica heterogénea, los factores hereditarios, la exposición a radiaciones, a sustancias químicas y a tratamientos quimioterapéuticos²⁹ han sido implicados en el desarrollo de ella, la predisposición genética podría jugar un papel principal en el desarrollo de la enfermedad, ya que se ha observado que individuos con historia familiar de leucemia o linfoma tienen 5.6 veces más riesgo para desarrollar leucemia mieloide aguda³⁵. Los factores ocupacionales y la exposición ambiental a radiaciones o químicos también han sido reportados como factores de riesgo al igual que el estatus social y la edad de la madre al parto³³.

Uno de los objetivos actuales de la terapia de los procesos leucémicos es proporcionar a los pacientes un tratamiento individualizado a través del diagnóstico y clasificación minuciosa de cada paciente, en base a diferentes características que se han asociado con mejores resultados (factores pronósticos) como: edad, cuenta de leucocitos, género, fenotipo, estado del sistema nervioso central, estado nutricional y genética e inmunología molecular, siendo éstas últimas la de mayor peso.^{18,20,21}

En Guerrero y otras entidades del país, se tiene una población infantil afectada por esta enfermedad, con características socioeconómicas que dificultan su acceso a los servicios especializados que se requieren para un correcto diagnóstico y seguimiento. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente los tipos de leucemia aguda en los centros hospitalarios del estado de Guerrero y otras entidades, mediante la detección de las translocaciones t(9;22), t(8;21), t(12;21) e Inv (16) y determinar la estirpe leucémica por medio de citometría de flujo con el propósito de mejorar el diagnóstico y determinar si existe asociación entre el grupo de riesgo y las variables de exposición como son : ocupación del padre y la madre, lugar de origen, exposición a agroindustriales, solventes, radiaciones, antecedentes familiares de leucemia, cáncer o defectos genéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente fue un estudio de tipo observacional, transversal y retrospectivo, realizado a partir del mes de Junio de 2005 a Junio de 2006, en 40 pacientes, 33 que acudieron al servicio de Oncología Pediátrica en el Instituto Estatal de Cancerología "Arturo Beltrán Ortega", de la ciudad de Acapulco, Guerrero y 7 que acudieron al servicio de Onco-Hematología del Hospital del Niño Morelense, de la ciudad de Cuernavaca Morelos, México con diagnóstico de leucemia aguda y edad máxima de 17 años, cuyos padres otorgaron un consentimiento informado .

La estandarización de las técnicas de Biología Molecular y de Citometría de Flujo se llevó a cabo en las instalaciones de los Laboratorios Clínicos de Puebla y del Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, bajo la dirección del Dr. Guillermo Ruiz Argüelles.

Una vez estandarizadas las técnicas, se trabajó en las instalaciones de los laboratorios de Biología molecular de las Unidades Académicas de Ciencias Químicas y de Medicina de la UAG para la transferencia de la tecnología.

En cuanto a la captación de pacientes, se inició con la toma de muestras de sangre periférica con EDTA, las cuales se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento, una vez obtenidas, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biomedicina Molecular de la Universidad Autónoma de Guerrero en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero para su procesamiento.

A los padres del paciente se les aplicó una encuesta para recabar datos personales y del entorno familiar, como ocupación y nivel de estudios de ambos, lugar de nacimiento del paciente, lugares de residencia, edad de la madre al parto, exposición a agroindustriales, solventes, sustancias químicas, radiaciones, antecedentes familiares de leucemia, cáncer o defectos genéticos. Además se obtuvieron datos del expediente clínico de cada paciente, como el número de leucocitos al diagnóstico, edad, sexo, la cuenta de leucocitos al momento de la toma de muestra, si presentaba desnutrición, o infiltración al sistema nervioso central, la clasificación de la leucemia según la morfología, si estaba recibiendo tratamiento y los días de duración.

Una parte de la muestra se destinó al estudio molecular para detectar las translocaciones t (9;22), t (8;21), t (12;21) e Inv (16) y con la otra parte se obtuvo el fenotipo inmunológico por citometría de flujo.

Para la realización de las técnicas moleculares se purificaron los leucocitos por medio de lisis osmótica selectiva de eritrocitos³⁶ y se extrajo el RNA por el método de fenolclororformo^{37,38} .

La integridad del RNA se comprobó por una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, posteriormente se realizó la retrotranscripción con la enzima Superscript II de Invitrogen (catálogo 18064-014) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. La mezcla de reacción contenía 0.5 mM DNTPS (A,C,G,T), 0.5µg/ µl de Oligo dT³⁹, 3 µg de RNA y agua para un volumen de 12µl, la cual se incubó 5 minutos a 65 °C; posteriormente, se agregaron 5 µl de 5XRT Buffer, 0.005 M DTT y 40U de RNasaOut⁴⁰, se incubó 2 minutos a 42 °C y por último, se agregaron 200U de SuperScriptII⁴¹, y se incubó a 42 °C por 50 minutos. La reacción se desactivó a 72 °C por 15 minutos.

La amplificación del cDNA se llevó a cabo con la técnica de PCR usando la enzima Taq recombinante de Invitrogen⁴². La mezcla de reacción contenía 5 µl de 10XPCR Buffer, 10 µg de cDNA, 0.4 µM de los iniciadores correspondientes, 1U de Taq DNA polimerasa y agua bidestilada estéril para un volumen final de 50µl. Por cada participante en el estudio, se usaron para el diagnóstico dos muestras del paciente, un control interno, un control positivo y un control negativo para cada una de las translocaciones. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler egradient, de Eppendorf, bajo diferentes condiciones de alineamiento de acuerdo a la tabla 6. En total se usaron 16 oligonucleótidos diferentes. Los productos amplificados fueron observados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio.

A 30 pacientes se les determinó el fenotipo inmunológico por medio de la técnica de citometría de flujo en las instalaciones del laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Medicina de la UAG, para lo cual se utilizó un citómetro tipo FACScan de Beckton Dickson (BD). El panel de anticuerpos utilizados comprendía: CD45, CD10, CD19, CD20, CD2, CD7, CD3, CD33, CD13, HLA-DR, CD14, CD34 Y CD 41, todos de BD, y cada uno estaba conjugado con diferentes fluorocromos discriminables entre sí, como ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) y peridinato de clorofila (PerCP) . La muestra sanguínea se marcó, se lisó con la solución FacsLysing y se lavó por dos ocasiones con la solución FacsFlow, ambas de BD. Los resultados se analizaron mediante el programa CellQuest, modalidad de lisado con lavado mediante la construcción de histogramas biparamétricos de las fluorescencias de tipo FL1, FL2, FL3 y Forward Side Scatter (FSC) y Side Scatter (SSC). Se utilizaron controles de Isotipo para la compensación y la técnica de Gating CD45 para la ubicación de las células inmaduras^{43,44}.

La información clínica, los datos de la encuesta y los resultados de las técnicas moleculares fueron analizados mediante el programa Intercooled STATA 8 y SPSS 12 para Windows. Se realizó descripción de frecuencias de cada variable y búsqueda de correlaciones entre la presencia de translocaciones y los factores de riesgo presentes en la población mediante regresión logística.

Tabla 6

Oligonucleótidos utilizados y condiciones de alineamiento en el estudio sobre leucemia aguda. Acapulco, Guerrero, México, junio 2005 – Junio 2006^{45,46,47,48,49.}

Translocación	Tamaño pb	Oligonucleótido	Secuencia	Condiciones
t(9;22) ^{45,46}				
Subtipo b3a2	349	LCP27 y LCP28	5'tcgtgtgtgaaactccagac3' 5'ccattccccattgtgattat3'	Preciclo: 1min a 95 °C 40 ciclos:
subtipo b2a2	274	LCP27 y LCP28	5'tcgtgtgtgaaactccagac3' 5'ccattccccattgtgattat3'	15 seg a 94 °C 20 seg a 60 °C
subtipo e1a2	317	BCRe1 y LCP28	5'actgcccggtgtcgtgt3' 5'ccattccccattgtgattat3'	20 seg a 72 °C Post-ciclo: 2 min a 72 °C
Control interno ABL	200	LCP29 y LCP28	5'tagcatctgactttgagcct3' 5'ccattccccattgtgattat3'	
t(8;21) ⁴⁷	467	AML1-C y MTG8-2	5'gagggaaaagcttcactctg3' 5'gccaactctttctcctatc3'	Preciclo: 1min a 95 °C 40 ciclos:
Control interno AML	192	AML1-C y AML1-E	5'gagggaaaagcttcactctg3' 5'gccgcagctgctccagttca3'	15 seg a 94 °C 20 seg a 62 °C 30 seg a 72 °C Post-ciclo: 2 min a 72 °C
t(12;21) ⁴⁸				
Subtipo 1s1	271	1ª: TEL-e y AML-e	5'agccccatcatgcaccctctgatcc3' 5'gtggtcggccagcacctccacc3'	Primera amplificación Preciclo: 1min a 95°C 40 ciclos:
Subtipo 1s2	232	2ª: TEL-i y AML-i	5'gcagaattccactccgtggattcaaacagtc3' 5'aacgcctcgtctatctgctgggctc3'	15 seg a 94 °C 30 seg a 64 °C 30 seg a 72 °C Post-ciclo: 2 min a 72 °C
Control interno ABL1	200	AML1-C y AML1-E	5'gagggaaaagcttcactctg3' 5'gccgcagctgctccagttca3'	Segunda amplificación Preciclo: 1min a 95 °C 40 ciclos:
				15 seg a 94 °C 30 seg a 60 °C 30 seg a 72 °C Post-ciclo: 2 min a 72 °C
Inv16 ⁴⁹				
Subtipo A	227	MYA y CBFβ5'	5'agctgcgtcttcatctcctc3' 5'ctggatggatgggctgtct3'	Preciclo: 1min a 95 °C 40 ciclos:
Subtipo B	241	3- y 4-	5'agctgcgtcttcatctcctc3' 5'ctggatggatgggctgtct3'	15 seg a 94 °C 20 seg a 66 °C
Subtipo B	620	MYA y CBFβ5'	5'gtctgtttatctgaaaggctg3' 5'cgtactgctgggtgaggttct3'	20 seg a 72 °C Post-ciclo: 2 min a 72 °C
Subtipo C	568	3- y 4-	5'gtctgtttatctgaaaggctg3' 5'cgtactgctgggtgaggttct3'	
Subtipo D	775	3- y 4-	5'gtctgtttatctgaaaggctg3' 5'cgtactgctgggtgaggttct3'	
Control interno CBFβ	230 194 160	CBFβ5' y CBFβ3'	5'ctggatggatgggctgtct3' 5'taggtcttcttcttctc3'	

RESULTADOS

Características generales de los pacientes que ingresaron al estudio.

De Junio de 2005 a Junio de 2006 se captaron 40 pacientes, 33 del servicio de oncología pediátrica en el Instituto Estatal de Cancerología de la ciudad de Acapulco, Guerrero y 7 del servicio de Onco-Hematología del Hospital del Niño Morelense de la ciudad de Cuernavaca, Morelos, 36 fueron de nuevo ingreso y 4 se encontraban en diferentes etapas del tratamiento. La mayoría de los pacientes provenían del medio rural, con nivel socioeconómico bajo, la mayoría de las madres eran ama de casa, y la principal ocupación de los padres fue la de campesino, la escolaridad de los padres fue baja (tablas 7 y 8).

Tabla 7 Ocupación de los padres de los niños con LA participantes del estudio

OCUPACIÓN DE LA MADRE	FREC	%	OCUPACIÓN DEL PADRE	FREC	%	OCUPACIÓN DEL PADRE	FREC	%
Ama de casa	29	72.5	Campesino	15	37.5	Policía	1	2.5
Empleada doméstica	4	10	Hojalatero	1	2.5	Taxista	1	2.5
Mostrador	1	2.5	Boletero	1	2.5	Vaquero	1	2.5
Desconocido	6	15	Obrero	1	2.5	Fotógrafo	1	2.5
Total	40	100	Ayudante de platero	1	2.5	electricista	1	2.5
			Albañil	2	5.0	cargador	1	2.5
			Chofer	1	2.5	inmigrante	2	5.0
			Desempleado	1	2.5	Peón	1	2.5
			Desconocido	8	20	Total	40	100

Tabla 8. Escolaridad de los padres de los pacientes con LA participantes en el estudio

	ESCOLARIDAD DE LA MADRE		ESCOLARIDAD DEL PADRE	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Analfabeta	4	10	3	7.5
Primaria sin terminar	6	15.0	5	12.5
Primaria terminada	15	37.5	16	40
Secundaria sin terminar	1	2.5	1	2.5
Secundaria terminada	5	12.5	2	5.0
Bachillerato sin terminar	0	0	0	0
Bachillerato terminado	1	2.5	4	10
Universitarios	1	2.5	0	0
Desconocido	7	17.5	9	22.5
Total	40	100	40	100

En el Estado de Guerrero la región mas afectada fue Acapulco, seguida de la zona Centro y ambas Costas. En cuanto a los pacientes provenientes del estado de Morelos del Hospital del Niño Morelense, la distribución geográfica fue muy variable, se tuvieron pacientes de Cuernavaca, Distrito Federal y Tepic, Nayarit (tablas 9 y 10).

Tabla 9. Distribución geográfica de los casos de LA infantil en el estado de Guerrero de Junio de 2005 a Junio de 2006

REGIÓN	NÚMERO DE CASOS	PORCENTAJE
Acapulco	14	42.42
Centro	3	9.09
Costa grande	3	9.09
Costa chica	3	9.09
Norte	3	9.09
Montaña	2	6.06
Tierra caliente	1	3.03
No se conoce	4	12.12
Total	33	100

Tabla 10. Distribución geográfica de los casos de LA provenientes del HNM del estado de Morelos.

CIUDAD	NÚMERO DE CASOS	PORCENTAJE
Cuernavaca, Morelos	2	28.6
México, DF	1	14.2
Tepic, Nayarit	1	14.2
No se conoce	3	43
Total	7	100

En el grupo de estudio los pacientes masculinos fueron 23 y femeninos fueron 17, el rango de edad fluctuó de 6 meses a 17 años con una media de 8.9 años, la cuenta de leucocitos menor fue de $1,900/\text{mm}^3$ y la mayor fue de $390,000/\text{mm}^3$ con una media de $63,760/\text{mm}^3$ y 16 pacientes presentaron ISNC (tabla 11) y se agrupó a los pacientes en base a los factores de riesgo (tabla12).

Los factores de riesgo encontrados en la población de estudio fueron los siguientes: dos familias reportaron antecedentes de defectos genéticos, una familia reportó antecedentes de linfoma y 8 familias reportaron antecedentes familiares de cáncer, en 4 familias se detectó exposición a solventes y en 20 familias se reportó exposición a productos agroindustriales.

Tabla 11. Características clínicas y tipo de exposición de los pacientes participantes en el estudio sobre leucemia aguda en Guerrero y Morelos durante el periodo de Junio de 2005 a Junio de 2006

NP	SEXO	EDAD	DX MF	FENOTIPO	CTA LEUCOS	DESNUT	ISNC	T EVOL	TRANSLOC	EXPOS
1	F	1	L1	LMA	60,000	Si	No	DN	t(8;21)	Agr
2	M	5	L1	NR	390,000	Si	Si	DN	No	Sol
3	M	2.5	L1	NR	32,000	Si	Si	DN	No	No
4	M	10	L1	NR	33,000	Si	Si	DN	No	Agr
5	F	4	L1	NR	4,400	No	No	2años	No	No
6	F	11	L1	LLAB	64,300	No	No	DN	t(12;21)	Agr/Sol
7	M	4	L1	LLAB	104,450	Si	Si	DN	t(9;22)	Agr sol
8	M	8	L1	LLAB	6,200	Si	Si	4años	No	Agr
9	M	9	L1	NR	59,000	No	Si	DN	t(9;22)	Agr
10	M	13	L1	NR	4,300	No	Si	3años	No	Agr
11	F	4	L1	LLAB	56,800	No	No	DN	No	Agr
12	F	5	L1	LLAB	32,100	No	No	DN	No	No
13	F	6	L1	NR	10,000	Si	Si	DN	No	Agr
14	M	2	L1	LLAB	38,300	Si	Si	DN	No	Agr
15	F	0.5	L1	NR	120,00	Si	No	DN	No	Agr
16	F	10	LGC	NR	18,300	Si	No	DN	No	No
17	F	6	L2	LLAB	6,000	No	No	DN	No	No
18	M	14	L1	LLAB	88,000	Si	Si	DN	No	Agr
19	M	15	M1	LLAB/T	18,100	No	No	DN	No	Agr
20	M	14	L1	LMA	125,000	No	Si	DN	t(8;21)	Agr
21	M	9	L2	LLAB	15,000	No	No	DN	No	Agr
22	F	9	L1	LLAB	16,800	No	No	DN	No	No
23	M	17	L1	LLAB	22,500	Si	Si	DN	t(9;22)	No
24	F	10	L1	LLAB	5,700	Si	Si	DN	t(9;22)	No
25	M	14	M1	LMA	12,500	No	Si	DN	No	Agr
26	F	11	L1	LLAT	104,00	No	No	DN	No	No
27	M	13	L1	LLAB	15,000	Si	No	DN	No	No
28	M	15	M7	LLAB	142,000	No	No	DN	No	No
29	M	12	L1	LLAT	180,000	No	No	DN	No	No
30	M	16	L1	LLAB	2,200	Si	No	DN	No	Agr
31	F	17	L2	NR	16,000	Si	Si	DN	No	No
32	M	6	L1	LLAB	23,000	No	No	DN	No	No
33	M	9	L1	LLAB	34,000	No	No	4años	No	No
34	F	16	L1	LLAB	185,000	No	No	DN	No	Agr, sol
35	M	10	L1	LLAB	295,000	Si	Si	DN	No	Agr
36	F	2.5	L1	LLAB	65,600	Si	No	DN	No	Agr
37	F	12	L1	LLAB	11,500	No	No	DN	No	No
38	F	8	L1	LLAB	60,000	Si	No	DN	No	No
39	M	8	M0	LLAB	1,900	No	No	DN	No	No
40	M	2	L1	LLAB	10,000	No	No	DN	No	No

Np: número progresivo
Sexo:

F: femenino
M: masculino
Edad: años

Cta leucos: cuenta de leucocitos al diagnóstico
Transloc: translocación

Fenotipo:
NR: no realizado

LMA: leucemia mieloide aguda
LLAB: leucemia linfoblástica aguda B
LLAT: leucemia linfoblástica aguda T
LLA B/T: leucemia bifenotípica

ISNC: infiltración al sistema nervioso central

Dx mf: diagnóstico morfológico
T evol: tiempo de evolución:
DN: diagnóstico nuevo
Desnut: desnutrición
Expos: exposición
Agr: agroindustriales
Sol: solventes

Tabla 12. Grupos de riesgo con base en los factores pronósticos observados en la población estudiada

FACTOR PRONÓSTICO	GRUPO DE RIESGO ESTÁNDAR		GRUPO DE ALTO RIESGO	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Edad	Más de 1 y menos de 9 20	50.0	Menos de 1 y más de 9 20	50
Sexo	Femenino 17	42.5	Masculino 23	57.5
Desnutrición	No 21	52.5	Si 19	47.5
Leucocitos al diagnóstico	Menor a 50,000/mm ³ 24	60	Mayor a 50,000/mm ³ 16	40
ISNC	No 24	60	Si 16	40
Morfología	Linfoblástica 35	87.5	Mieloblástica 5	12.5

Caracterización molecular de los pacientes que ingresaron al estudio.

A los 40 pacientes se les realizó el estudio molecular para la detección de las translocaciones t(9;22) , t(8;21), t(12;21) e Inv16 por medio de RT-PCR, en las figuras 7 y 8 se muestran los corrimientos electroforéticos de los productos de PCR de pacientes que resultaron positivos.

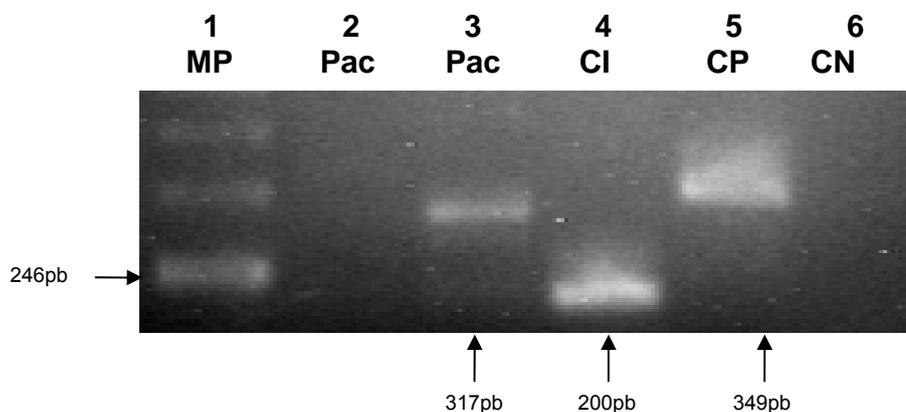


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos de PCR para detectar la translocación t(9;22). Carril 1: MP marcador de peso molecular de 123 pb, carril 2: muestra del paciente con oligonucleótidos para detectar los arreglos de tipo b3a2 y b2a2, carril 3: muestra del paciente con oligonucleótidos para detectar el arreglo de tipo e1a2, carril 4: CI control interno ABL, carril 5: CP control positivo tipo b3a2, carril 6: CN control negativo

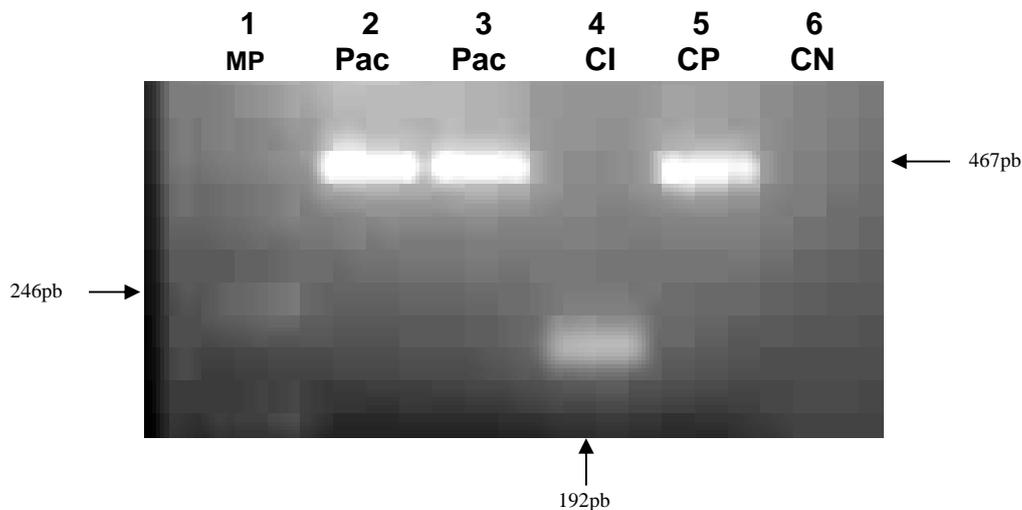


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% de los productos de PCR para detectar la translocación t(8;21). Carril 1:MP marcador de 123 pb, carril 2 y 3: muestra del paciente con oligonucleótidos para detectar la quimera AML/ETO, carril 4: control interno AML1, carril 5: control positivo de t(8,21), carril 4: control negativo.

Se detectaron 4 pacientes positivos para la translocación t(9;22), dos pacientes positivos para la t(8;21), un paciente positivo para la translocación t(12;21) y no se detectaron pacientes positivos para la inv16 (tabla 13).

Tabla 13
Resultado de la detección de translocaciones por RT-PCR en el grupo estudiado.

TRANSLOCACIÓN	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Pacientes que no presentan	33	82.50
Pacientes que presentan	7	17.50
Total	40	100
Tipo de translocación		
t(9;22)	4	10
t(8;21)	2	5
t(12;21)	1	2.5
Inv (16)	0	0

Caracterización inmunofenotípica de los pacientes que ingresaron al estudio

De todos los pacientes se tiene el reporte del estudio morfológico realizado y en 30 casos fue posible realizar la determinación del fenotipo por medio de citometría de flujo. En la tabla 14 se presentan los fenotipos detectados por citometría de flujo, observándose que el fenotipo mas frecuente fue el de LAL B.

Tabla 14
Fenotipos observados por citometría de flujo en la población en estudio

FENOTIPO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
LAL B	24	60
LAL T	2	5
LAM	3	7.5
BIFENOTIPICA	1	2.5
No realizados	10	25
Total	40	100

Mientras que el reporte morfológico de los pacientes, el cual fue asignado por el especialista, se detalla en la tabla 15, observándose que la más frecuente fue la tipo L1.

Tabla 15
Diagnóstico morfológico reportado en los pacientes estudiados

MORFOLOGÍA	FRECUENCIA	PORCENTAJE	PORCENTAJE POR LINAJE
L1	32	80	LINFOBLASTICAS
L2	3	7.5	87.5
LMA M7	1	2.5	MIELOBLASTICAS
LGC	1	2.5	12.5
M0	1	2.5	
M1	2	5	
Total	40	100	100

Cuando se contrastó el resultado del fenotipo con el de la morfología reportada, se observó discordancia de resultados en 7 casos (23.3%), en dos casos se había clasificado la leucemia de los pacientes como L1 pero el resultado de la citometría reveló que eran LAM con alto grado de inmadurez (figura 9). En dos casos la leucemia fue clasificada como LAM, pero el fenotipo inmunológico reveló que eran LAL B con alto grado de inmadurez (figura 10). En dos casos la leucemia fue clasificada como L1 pero el fenotipo inmunológico fue compatible con LAL T, por lo que estos pacientes fueron reasignados a los grupos de riesgo correspondientes teniendo que modificar su tratamiento (tabla 16).

Tabla 16
Casos de discordancia entre el resultado del estudio morfológico y el fenotipo por citometría de flujo, se resalta en negritas y cursivas los casos de discordancia.

MORFOLOGIA	FENOTIPO DE LOS BLASTOS			
	LMA	LLA B	LLA T	LLA B/T
LLA	2	22	2	0
LMA	1	2	0	1

Translocaciones y riesgo de factores pronósticos adversos en la población en estudio

Se agrupó a los pacientes en base a los factores pronósticos y la presencia de translocaciones, observándose que la mayor parte de los pacientes portadores de translocación se encontraban dentro de los grupos de alto riesgo (tabla 17).

Tabla 17
Grupos de riesgo con base en los factores pronósticos investigados en la población y la presencia de translocaciones.

FACTOR PRONÓSTICO	CON TRANSLOCACIÓN	%	SIN TRANSLOCACIÓN	%	RM	IC	P
Edad							
Menos de 1 y mas de 9 años	5	12.5	14	35	3.3	0.5-20	0.17
1 a 9 años*	2	5	19	47.5			
Sexo					0.9	0.12-7.3	0.9
Masculino	4	10	19	47.5			
Femenino*	3	7.5	14	35			
Desnutrición					3.4	0.5-20	0.1
Con desnutrición	5	12.5	13	32.5			
Sin desnutrición*	2	5	18	45			
Cuenta de leucocitos al dx					4.7	0.79-28	0.08
Mayor a 50 000 mm ³	5	12.5	11	27.5			
Menor a 50 000 mm ³ *	2	5	22	55			
ISNC					4.7	0.79-28.7	0.08
Con ISNC	5	12.5	11	27.5			
Sin ISNC*	2	5	22	55			
Fenotipo					9.3	0.64-139	0.1
LMA y LLAT	2	5	3	7.5			
LLAB*	1	2.5	14	35			
Morfología					0.9	0.01-10	0.9
LAM	1	2.5	5	12.5			
LLA*	7	17.5	28	70			

*Categoría de referencia RM: Razón de momios IC: Intervalo de confianza

Factores de riesgo encontrados en la población en estudio

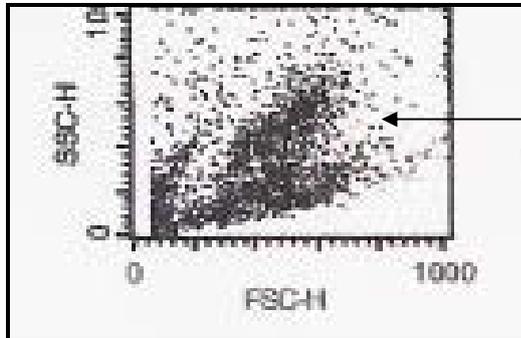
Los factores de exposición se agruparon por la presencia o ausencia de translocaciones con el fin de buscar relaciones de riesgo, observándose un riesgo aumentado de portar translocación en aquellos pacientes que tenían antecedentes familiares de cáncer, exposición a solventes y exposición a productos agroindustriales (tabla 18).

Tabla 18
Factores de riesgo encontrados en los pacientes con LA agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia de translocación.

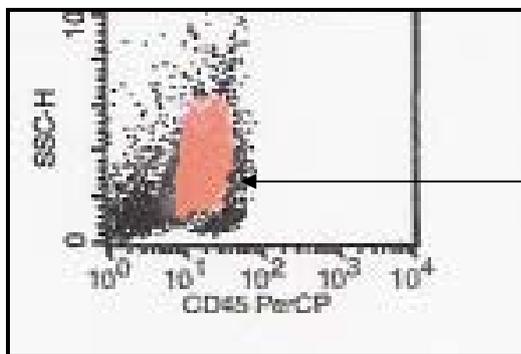
	SIN TRANSLOCACIÓN	CON TRANSLOCACIÓN	RM	IC	P
Sin Antecedentes familiares de cáncer*	16	2	8	1.06-60	0.04
Con Antecedentes familiares de cáncer	4	4			
Sin exposición a agroindustriales*	5	1	1.6	0.15-17	0.6
Con exposición a agroindustriales	15	5			
Sin exposición a solventes*	19	4	4.75	0.55-44	0.1
Con exposición a solventes	2	2			

*categoría de referencia, RM: Razón de momios, IC: Intervalo de confianza

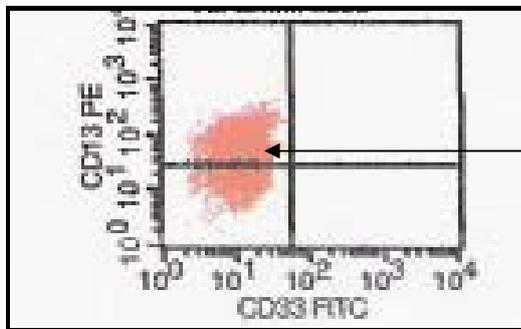
Figura 9. Resultado del fenotipo inmunológico por citometría de flujo del paciente 20, se muestran los histogramas de la expresión de CD45, CD13 y CD34, característicos de la LAM.



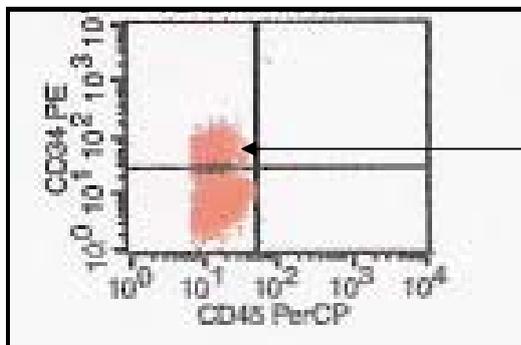
9.1 Histograma biparamétrico de la distribución de la población en base al tamaño, FSC, (eje de las X) y complejidad celular, SSC, (eje de las y).



9.2 Histograma biparamétrico de la expresión de CD45 (eje de las X) y complejidad celular, SSC, (eje de las y). En color rojo se observa la zona de blastos identificada por su baja expresión de CD45 .

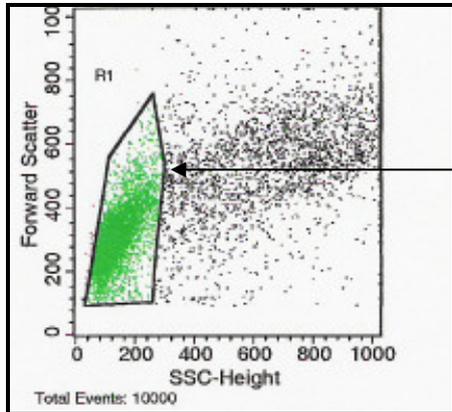


9.3 Histograma biparamétrico de la expresión de los antígenos mieloides CD13 (eje de las Y) y CD33 (eje de las X), se observa expresión aumentada de CD13 característico de la línea mieloide.

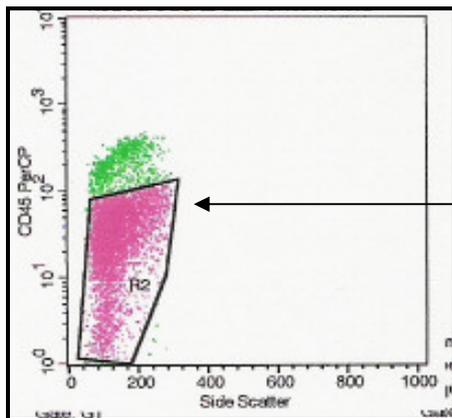


9.4 Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración CD34 y del CD45, la flecha indica expresión aumentada de CD34 característico de las células con alto grado de inmadurez.

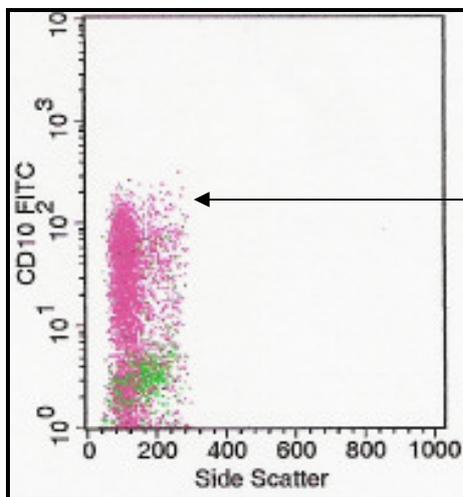
Figura 10. Resultado del fenotipo inmunológico por citometría de flujo del paciente 39, se muestran los histogramas de la expresión de CD45, CD10, CD19, CD20, HLA-DR y CD34, propios de la LLA-B



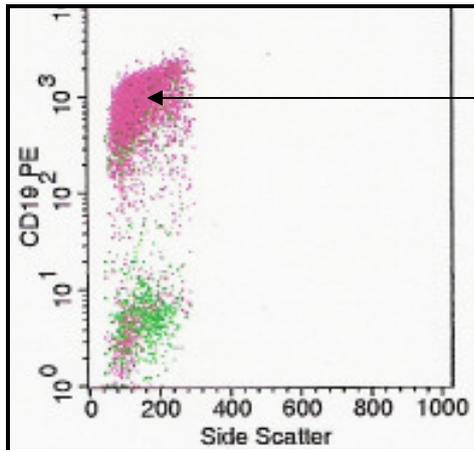
10.1 Histograma biparamétrico de la distribución de la población en base al tamaño, FSC, (eje de las y) y complejidad celular, SSC, (eje de las x).



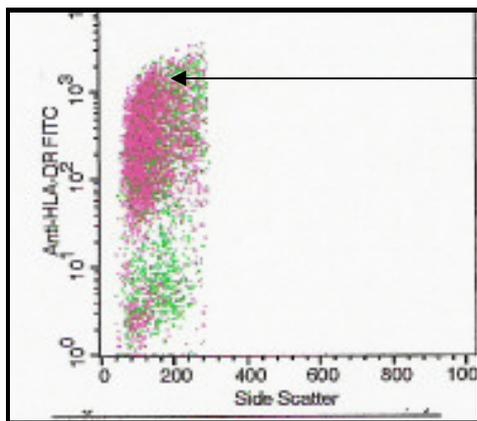
10.2 Histograma biparamétrico de la expresión de CD45 (eje de las y) y complejidad celular, SSC, (eje de las x). En color fiucsia se observa la zona de blastos identificada por su baja expresión de CD45 .



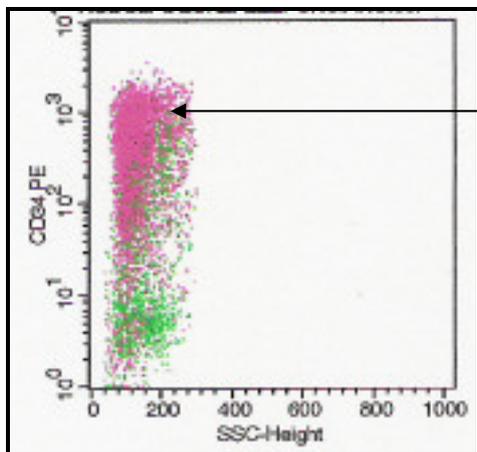
10.3 Histograma biparamétrico de la expresión CD10 y complejidad celular, SSC, la flecha indica expresión aumentada de CD10 característico del linaje B.



10.4 Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno CD19 y complejidad celular, SSC, la flecha indica expresión aumentada del antígeno linfocito B CD19.



10.5 Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración HLA-DR y complejidad celular, la flecha indica expresión aumentada de HLA-DR.



10.6 Histograma biparamétrico de la expresión del antígeno de maduración CD34 y complejidad celular, la flecha indica expresión aumentada de CD34 característico de las células con alto grado de inmadurez.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El grupo de estudio estuvo conformado por familias de bajos recursos económicos, que provenían en su mayoría del medio rural, la mayoría de los padres eran campesinos y las madres en su mayoría eran amas de casa, el nivel de escolaridad principalmente fue primaria, la región del estado en la cual se encontraron el mayor número de casos fue la de Acapulco, seguida de la región Centro, Costa Chica, Costa Grande y Norte, las menos afectadas fueron la Montaña (6%) y la Tierra Caliente (3%).

Se realizó la caracterización molecular de 40 pacientes con LA en el estado de Guerrero y en el de Morelos durante el periodo de Junio de 2005 a Junio de 2006, encontrándose en el 17.5% de los pacientes alguna de las 4 translocaciones, la que se encontró con mayor frecuencia fue la t(9;22) con una frecuencia del 10%, lo que no concuerda con datos internacionales que reportan una frecuencia del 3% en los pacientes con LAL^{13,51}, y en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) reportan una frecuencia para esta translocación del 5% en el periodo de 2001-2002⁵¹. Debido a que la presencia de esta translocación conlleva un pronóstico desfavorable, sería acertado investigar la causa de esta frecuencia aumentada en nuestra población y tratar de identificar los factores de riesgo asociados.

En el caso de la t(8;21), en nuestra población se observó una frecuencia del 5%, lo que difiere de lo reportado en la literatura internacional, en donde se menciona una frecuencia del 16%⁵², mientras que en el INP durante el periodo de 2001 a 2002⁵¹, se reportó su presencia en 9 de 28 pacientes (32%) con LAM, aquí también es importante mencionar que en el grupo en estudio solamente encontramos tres casos de LAM, lo que constituye el 7.5% de los pacientes analizados y uno de los casos positivos para t(8;21) se encontró en un paciente que fue caracterizado con morfología tipo LAL L1 y al que no se le realizó la fenotipificación, por lo que sería conveniente realizar el estudio una vez que termine su esquema terapéutico.

Se detectó un solo caso de la t(12;21), que representa una frecuencia en nuestra población del 2.5%, lo que contrasta con la bibliografía internacional que la cita como la más frecuente de las translocaciones en LAL, con un 22%¹³. En nuestra población la translocación más frecuente fue t(9;22) que es la representación citogenética del cromosoma Filadelfia, su presencia confiere un pronóstico sumamente desfavorable, sobretodo cuando aparece en niños mayores de 10 años, con cargas tumorales altas y mala respuesta a la prednisona, en niños con estas características, el tratamiento de elección es el Transplante de Médula Ósea (TMO). La terapéutica para ellos es la considerada de riesgo alto. Dos de los pacientes fallecieron, uno se encuentra en remisión y está en lista de espera para el TMO y el cuarto paciente presenta cargas tumorales altas, confirmándose la severidad de esta variedad y resalta la importancia de detectarla en etapas tempranas para ajustar el esquema terapéutico a uno de riesgo alto en espera de mejorar el pronóstico de remisión.

De los 30 pacientes con inmunofenotipo por citometría de flujo, se pudo observar una frecuencia del 60% de LAL B lo que concuerda con la literatura internacional y nacional^{53,54,55} ya que en general esta variedad es la más frecuente en niños, el 5% de LAL T menor que lo reportado a nivel nacional (9.4%)^{29,30} y una frecuencia del 7.5% para las LAM. Con la determinación del inmunofenotipo fue posible también observar discordancia en siete casos con respecto a la identificación morfológica. El primero fue el paciente 20, diagnosticado morfológicamente como una L1 y al cual se le asignó un protocolo terapéutico de riesgo estándar, no obstante el paciente no reaccionó, manteniendo las cuentas leucocitarias altas, el estudio de fenotipo por citometría de flujo mostró blastos que presentaban expresión alta de CD13 y CD34, compatible con una leucemia mieloblástica, permitiendo el cambio en la terapia. Finalmente el paciente fue cambiado de institución y no fue posible conocer su evolución.

En dos casos (pacientes 28 y 39) fueron diagnosticados morfológicamente como LAM, sin embargo el estudio por citometría de flujo arrojó resultados compatibles con leucemia linfoblástica de precursores de células B, lo que implicó asignarles tratamientos menos agresivos, es decir terapias de riesgo estándar.

En dos casos más los pacientes (26 y 29) fueron diagnosticados como LAL, sin embargo el estudio por citometría de flujo permitió demostrar que la clona afectada era de precursores de células T, el tratamiento para este tipo de leucemia es muy particular y esta variedad es considerada como de alto riesgo⁵⁰, por lo que el pronóstico de estos pacientes es desfavorable. En el caso del paciente 1, se tenía indicios de una LAM ya que se detectó presencia de t(8,21), pero la morfología indicaba una L1, el fenotipo no se realizó en ese momento ya que no estaban disponibles los reactivos, y cuando finalmente se hizo, se observó la expresión de antígenos mieloides por lo que se tuvo que reorientar el tratamiento. Finalmente el paciente 19 fue diagnosticado como una M1 por morfología y se le trató de esa manera, sin embargo sufrió una recaída y se le realizó el fenotipo inmunológico, en el cual se observó expresión de antígenos linfoides de las líneas B y T, siendo compatible con una leucemia bifenotípica de linaje linfoide. Así de los 30 fenotipos realizados, en el 23% de los casos (n=7) se reorientó el diagnóstico, lo que resalta la sensibilidad y especificidad de la identificación inmunofenotípica de las clonas alteradas y su utilidad para emplearla en todos los pacientes de nuevo diagnóstico para evitar la aplicación de protocolos terapéuticos inapropiados garantizando una mejor respuesta y mejores condiciones de vida de los pacientes.

El caso del paciente 26 resalta la importancia de la técnica de citometría de flujo para la detección de células leucémicas, el paciente fue remitido a la institución por sospecha de LA, presentaba cuenta de leucocitos de 2200 y sintomatología compatible con LA, en un primer estudio por citometría de flujo, no se detectaron blastos comunicándose el resultado al especialista, se tomó una nueva muestra de sangre periférica, pero se observó sólo un 3% de blastos, y se mantuvo en observación al paciente, transcurridos 6 días el paciente presentó erupciones cutáneas y desarrolló un cuadro de varicela, por lo que se aplicaron medidas

profilácticas y se envió a su domicilio, una vez transcurrido el cuadro se le tomó una muestra sanguínea y entonces se observó expresión de CD45, CD10 y CD19 en el 43% de las células, siendo el estudio compatible con LALB. En este caso fue muy afortunada la decisión del especialista de no administrar quimioterapia a la llegada del paciente, sino guiarse por el resultado de la citometría ya que la aplicación de la terapia hubiera resultado en un aumento de la morbi-mortalidad.

Factores pronósticos

En general, se observó que la mayoría de los pacientes se encontraban dentro del grupo de riesgo estándar de acuerdo a los factores pronósticos estudiados, pero cuando se agruparon estos mismos factores de acuerdo a la presencia o ausencia de translocación, se pudo observar que la mayoría de los portadores de translocaciones se encontraban ubicados dentro del grupo de riesgo alto en cada uno de los factores pronósticos, lo que nos indica que la presencia de las translocaciones condiciona a presentar factores pronósticos adversos, de acuerdo a las RM calculadas, se observó aumento en el riesgo en los pacientes que portaban cuentas de leucocitos mayores a 50 000 (RM= 4.7), en el grupo de edad de menos de 1 y más de 9 años (RM= 3.3), los que presentaban ISNC (RM= 4.7), los que presentaban desnutrición (RM= 3.4) y los que tenían un fenotipo considerado de alto riesgo (RM= 9.3) .

El 52.5% de los pacientes presentaron desnutrición al diagnóstico, en algunos estudios se ha mencionado que en sí misma la desnutrición debe considerarse como factor adverso, y se ha reportado que los niños con desnutrición tiene una sobrevivida a cinco años del 26% mientras que para los bien nutridos es de 59% aunado a esto el riesgo relativo de morir es 1.8 veces mayor en ese mismo periodo, a medida que avanzaba el tiempo de observación la mortalidad de los pacientes aumentaba de manera significativa, por lo que es necesario diseñar nuevas estrategias para los niños con desnutrición.⁵⁶

Factores de riesgo

En el grupo de estudio se observó una alta frecuencia de exposición a agroindustriales (50%) debido a la ocupación de los padres (campesinos) o bien a la actividad desarrollada por los familiares con los cuales vivía el paciente, la RM obtenida evidenció asociación entre la exposición a agroindustriales y la presencia de translocaciones (RM= 1.6; IC_{95%}=0.15-17) pero ésta no fue estadísticamente significativa a los niveles de confianza convencionales del 95%, cabe comentar que al realizar la encuesta se exploró este tema y de acuerdo con la información proporcionada por los familiares pudimos detectar que los agroquímicos son utilizados incorrectamente, puesto que los campesinos no utilizan protección al momento de su empleo, refieren que de hecho se despojan de su ropa para evitar que se impregne quedando totalmente expuestos a las aspersiones, y es una práctica común llevar a los niños a colaborar en esas jornadas, los cuales van caminando exactamente detrás de la persona que va suministrando los químicos, refieren que utilizan sustancias como el Gramozone,

Sulfamin, Velfuran, sulfato, Foley, Esteron, Tamaron, Malation y otros de los cuales no conocen el nombre ya que al pedirlos solo mencionan su utilidad (polvo para maleza, polvo para la plaga, etc.), lo que nos alerta sobre la poca información que tiene este grupo laboral en este sentido. En la literatura se han reportado diversos estudios que muestran un aumento en el riesgo de padecer LA de hasta 7 veces en personas que han sufrido exposición a pesticidas⁵⁷ y los OR aumentaron entre los portadores de polimorfismos en las enzimas CYP1A1m1 y CYP1a1m2 cuando la madre durante el embarazo o los niños habían estado expuestos a ciertos insecticidas^{58,59}. En otro reporte se mostró que México es una zona agro cultural con el más alto daño a la salud en la población por pesticidas, y que la relación con el daño a la salud se debe a la aplicación de estos productos cuyo uso en muchos casos está prohibido en otros países y en México.⁶⁰

En nuestro estudio se observó que el 20% de las familias tenían antecedentes familiares de cáncer, la RM evidenció asociación estadísticamente significativa entre este grupo y la presencia de translocaciones (RM=8; IC_{95%} =1.06-60). En la literatura se ha reportado un riesgo aumentado de padecer LA en pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer⁶¹, pero no se encontraron reportes en este sentido para riesgo de portar translocaciones en particular.

Se detectó exposición a solventes en el 10% de las familias, en base a la RM se observó una asociación aumentada (OR=4.75, IC_{95%}=0.5-44) no estadísticamente significativa.

Enfermedad mínima residual

Transcurrido un año de haber iniciado este protocolo, se tuvo la oportunidad de realizar la búsqueda de EMR por citometría de flujo en cinco casos, 4 pacientes se encontraban en remisión (1,2, 3 y 7) y uno en recaída (8), en todos los casos se pudo observar la presencia de EMR, pero en el caso de los pacientes en remisión fue de 1%, mientras que en el paciente en recaída fue del 18%, diversos estudios han reportado que la presencia de EMR es un fuerte predictor de recaída la cual se da en aproximadamente el 20% de los casos de LA, y se ha demostrado que aquellos pacientes que presentan 1% de EMR al final de la fase de inducción tienen mayor riesgo de recaer (68% +/- 16%) que aquellos que no presentan EMR (7% +/- 7%)^{10,27,62}, por lo que el monitoreo de la EMR en las diferentes etapas del tratamiento provee de información significativa al especialista que puede dirigir el tratamiento para una recuperación total del paciente

Abandono del tratamiento

Los obstáculos observados en los países en desarrollo para lograr una curación de los pacientes con LA son la pobreza nacional o individual, la falta de centros médicos especializados, un número insuficiente de médicos especialistas, el alto costo de los estudios para clasificación de riesgos y la complejidad de los tratamientos. Aunado a esto se tiene la búsqueda tardía de atención médica, los

niveles socioeconómicos y culturales de la población, la falta de estructuración de los sistemas de salud, los problemas geográficos y de comunicación, la falta de conexión de los tres niveles de atención médica y sobre todo la falta de cumplimiento de las indicaciones médicas que genera abandono en el tratamiento o de recidivas tempranas.

Muy pocas naciones proporcionan atención gratuita a los pacientes con LAL, lo que hace recaer el costo del tratamiento en el paciente individual o en su familia, algunas organizaciones no gubernamentales han respondido a estas necesidades específicas, lo que ha contribuido de manera significativa al tratamiento integral de los pacientes, con la creación de albergues para hospedaje de los enfermos y su familia, financiamiento del tratamiento y transportación de los pacientes foráneos, en este estudio, nueve pacientes abandonaron el tratamiento por diversas causas lo que representa el 22.5% del total.

En conclusión en el presente trabajo se logró cumplir con los objetivos y al caracterizar adecuadamente la LA se logró mejorar el diagnóstico de los pacientes participantes, los cuales se verán beneficiados al recibir la terapia adecuada de acuerdo a sus características inmunológicas y genéticas en particular, aunado a esto se logró la aceptación de los clínicos en 3 centros hospitalarios, en Guerrero el IECAN-ABO y en Morelos en el HNM y en el hospital del IMSS de la ciudad de Cuernavaca, ya que se dieron cuenta de la importancia de las herramientas moleculares e inmunológicas al notar la mejoría de los pacientes que ingresaron al estudio sobre todo en aquellos en los que se tenían dudas sobre su clasificación. Uno de los retos de la LA es el perfeccionamiento de los tratamientos, en base al linaje involucrado y al genotipo individual, ya que la quimioterapia es la piedra angular de la terapéutica de la enfermedad, es importante realizar mas investigación sobre factores pronósticos ocultos, importantes en predecir la respuesta al tratamiento, como puede ser la variabilidad en la biodisponibilidad y el metabolismo de las sustancias, la dieta y la utilización de los medicamentos complementarios, en particular hace falta abundar en el conocimiento de ciertas enzimas que metabolizan toxinas endógenas y ambientales que pueden conferir resistencia a los agentes citotóxicos , y de enzimas que generan las reacciones de desintoxicación y metabolismo de xenobióticos, en respuesta al tratamiento^{63,64,65}. El desarrollo de la farmacogenómica permitirá identificar factores de riesgo genéticos relacionados con mayor propensión de generar la enfermedad, con el tipo de reacción al tratamiento y con la propensión a generar segundos tumores como consecuencia de la terapia, en este sentido ya se han obtenido indicios del papel importante que juegan los polimorfismos de algunas enzimas como la MTHFR, TPMT, TS, GTPS1, NAD(P)H, CYP1A2, CYP2D6 y CYP3A4^{65,66,67}, faltando analizar el papel de ellas en nuestra población para tratar de explicar el resultado del tratamiento en los pacientes con LA infantil y de esta manera mejorar las tasas de curación de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Ruiz Argüelles Guillermo. Actualización en leucemias, Ed. Médica Panamericana, 1 ed. 1996, México.
2. Cooper Geoffrey, The cell a mollecular approach.Ed. ASM press, 3ª ed,2004,Washington, D.C. USA.
3. Gonzalez de Buitrago, Patología Molecular,Ed. Mac Graw Hill,1ª ed.,2001, Barcelona, España.
4. Kumar Cotran Robins. Patología humana. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 6 ed.1997. Mexico. Pp 408-419
5. McKenna W. Robert, Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leucemias, clinical chemistry,46:8(B):1252-1259, 2000
6. Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV:Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: Age distribution, bcr breakpoint and prognostic significance. Leukemia 5:196, 1991
7. Uckun FM, Hatten KH, Crotty ML et al. Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4,11)(q21;q23) chromosomal translocation.Blood;92,3:810-821, 1998
8. Smita Bhatia, Harland N, Sather Nyla, et al. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leucemia.Blood,100:1957-1964, 2002
9. Friedmann Alison, Weinstein Howard. The role of prognostic features in the treatment of chilhood acute lymphoblastic leucemia.The oncologist,5:321-328, 2000
- 10.Roberts WM,Estrov Z, Ouspenskaia MV,et al. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia.The New England Journal of medicine. 336;5:317-323,1997
- 11.Darrel J, Foon K. Recent advances in flow cytometry:applications to the diagnosis of hematologic malignancy. Blood, vol 90 (8):2863-2892,1997.
- 12.Hong Chang, Fariha S, et al. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. Leukemia research. Vol 28:43-48, 2004.
- 13.Ching-Hon Pui, M.D., Mary V. Relling, Pharm.D., and James R. Downing, Acute Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med;350;15:1535-48, 2004.
- 14.Lowenberg B, Downing J, Burnett A, Acute Myeloid Leukemia, N Engl J Med:341;14:1051-1062,1999.
- 15.Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, Estey E, Keating MJ, Ku S, Trujillo J, Huh Y, Stass S, Kurzrock R: Significance of the p210 versus p190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. Blood 78:2411, 1991.
- 16.Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU, Koller CA, Walters R,Trujillo JM, Talpaz M: Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 67:55, 1987
- 17.Secker-Walker LM, Craig JM: Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia:Areview. Leukemia 7:147, 1993

18. Urban J, Pfeifer H et al. Early minimal disease analysis during treatment of Philadelphia chromosome/Bcr-Abl positive acute lymphoblastic leukemia with the Abl-tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571). *Blood*, 1,(10): 85-90, 2003
19. Druker J et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, vol 344:1038-1042, 2001
20. Stefan Faderl, Hagop M. Kantarjian, Moshe Talpaz, and Zeev Estrov. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic leukemia. *Blood*, Vol 91, No 11 (June 1: pp 3995-4019), 1998.
21. Rubnitz Jeffrey E, Pui Ching-Hon. Childhood acute lymphoblastic leukemia. *The oncologist*;2:374-380,1997
22. Pedersen J, Andersen M, Christiansen D, Genetics pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood*, Vol 99, No 15(March 15:1909-1912), 2001.
23. Rubnitz JE, Shuster JJ, Land VJ, Link MP et al. Case control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-Lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a pediatric oncology group study. *Blood* 89;4,1143:1146, 1997.
24. Arana-Trejo RM, Gomez-Morales E, Rubio-Borja ME, Kassack-Ipina JJ, Cervantes-Peredo A, Guerrero-Rivera S, Gonzalez-Llaven J, Gutierrez-Romero M, Pizzuto-Chavez J, Kofman-Alfaro S. Cytogenetic findings in 303 Mexican patients with de novo acute myeloblastic leukemia. *Arch Med Res*. ;28(2):209-14. 1997
25. Orfao A, Ruiz Argüelles A. Citometría de flujo y su aplicación en Hematología. En "Lopez- Borrascas A et al. Enciclopedia Iberoamericana de Hematología". Pp 161-75. Salamanca, Ediciones Universidad de Salamanca. 1993
26. Darrel J, Foon K. Recent advances in flow cytometry: applications to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*;90:8,:2863-2892. 1997
27. Cavé H et al, Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*;339:9:591-598, 1998
28. Lindblom A, Liljegren A. Tumor markers in malignancies. *BJM*. 320:424-427 2000
29. Paredes-Aguilera R, Romero-Guzman L, Lopez-Santiago N, Bravo-Lindoro A, Correa-Gonzalez C, Joly-Linero R, Nieto-Martinez S, del Campo-Martinez A. Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in Mexican children. *Sangre (Barc)*. Jun;44(3):188-94. 1999
30. Lobato Mendizabal E, Ruiz Arguelles GJ. Prevalence and features of preB cell acute lymphoblastic leukemia in Mexico: description of 9 patients. *Sangre (Barc)* 1991, 36 (1): 1-5
31. Ruiz Arguelles A, Duque ER, Orfao A. Primera conferencia latinoamericana de consenso en la tipificación inmunológica de leucemias. *Rev Invest Clin* 1997; 49:317-22.
32. Ruiz Arguelles A, Rivadeneira EL, Duque ER, Orfao A et al. Report on the second Latin American Consensus Conference for Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005; 70B:39-44.

33. Rivera Luna R. Hemato Oncología Pediátrica. Editores de textos mexicanos, 1 ed.2006,México
34. Secretaría de salud. Principales causas de mortalidad, disponible en : <http://www.ssa.gob.mx>, consultada el 25 de Enero de 2007.
35. Sandler Dp, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. Semin Oncol 1997; 24 (1):3-16
36. Rolfs et al. PCR: Clinical Diagnostics and research. Ed Springer Laboratory, 1992.
37. Sambrook et al. Molecular cloning.Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989
38. Chomczynsky and Sacchi. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem:162:156-159
39. Inserto actual Oligo (dT) Primer, Invitrogen, número de catálogo 18418-012
40. Inserto actual RNase OUT, Invitrogen, número de catálogo 10777-019
41. Inserto actual SuperScript II Reverse Transcriptase, número de catálogo 18064-022
42. Inserto actual Taq DNA Polymerase,recombinant, número de catálogo 11615-010
43. Orfao A, González de BJM. La citometría de flujo en el laboratorio clínico. Comité de publicaciones de la sociedad española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.1995
44. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, et al. Flow cytometry: its applications to Haematology. Haematologica 1995; 80: 69-81
45. Shtivelman, Lifshitz, Gale and Canaani. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature (315), 550-554
46. Van der Feltz, Shivji, Allen, Heisterkamp, Groffen and Wiedemann. Nucleotide sequence of both reciprocal translocation junction regions in a patient with Ph positive acute lymphoblastic leukemia, with a breakpoint within the first intron of the BCR gene. Nucleic Acids Res (17), 1-10
47. Kozu, Mitoshi, Shimizu et al. Acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. Blood (82), 1270-1276
48. Harbott et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. Blood (90), 4933-4937.
49. Claxton, Liu, Hsu et al. Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. Blood (83), 1750-1756.
50. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol 2003;40:274-80
51. Perez Vera, Montero Ruiz. Citogenética en leucemias.En: Rivera Luna R. Hemato Oncología Pediátrica. México , Editores de textos mexicanos, 1 ed.2006:179-212
52. Potter AM, Watmore A. Cytogenetics in myeloid leukaemia . En:Rooney DE. Human cytogenetics, malignancy and acquired abnormalities.Oxford Universty Press,2001:27-55.
53. Lowenberg B, Downing J, Burnett A, Acute Myeloid Leukemia, N Engl J Med:341;14:1051-1062,1999
54. Romero Guzman LT. Citometría de flujo: su aplicación en el diagnóstico y clasificación de leucemia aguda. Gac Med Mex 2002; 138 (supl1): 162-165

55. Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S, Gunn L, Skibola CF, Ma X, Buffler PA. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Aug 7;206(2):237-45.
56. Lobato Mendizabal E, López Martínez B, Ruiz Arguelles G. A critical review of the prognostic value of the nutritional status at diagnosis in the outcome of therapy of children with acute lymphoblastic leukemia. *Rev Invest Clin* 2003; 55(1) : 31-35
57. Infante-Rivard, Claire; Labuda, Damian; Krajinovic, Maja; Sinnett, Daniel. Risk of Childhood Leukemia Associated with Exposure to Pesticides and with Gene Polymorphisms. *Epidemiology.* 10(5):481, September 1999.
58. Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S, Gunn L, Skibola CF, Ma X, Buffler PA. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Aug 7;206(2):237-45.
59. Fagioli F, Cuneo A, Piva N, Carli MG, Previati R, Balboni M, Tomasi P, Cariani D, Scapoli G, Castoldi G. Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. *Cancer.* 1992 Jul 1;70(1):77-85.
60. Valdez Salas B, Garcia Duran EI, Wiener MS. Impact of pesticides use on human health in Mexico: a review. *Rev Environ Health.* 2000 Oct-Dec;15(4):399-412
61. Bener A, Denic S, Al-Mazrouei M. Consanguinity and family history of cancer in children with leukemia and lymphomas *Cancer.* 2001 Jul 1;92(1):1-6.
62. Coustan-Smiyh E, Sancho J, Pui CH, Campana D et al. Clinical importance of MRD in childhood acutelymphoblastic leukemia. *Blood* 2000 : 96 (8):2691-2696
63. Evans, WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429, 464-468 (2004).
64. Krynetski, EY, Evans WE. Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal. *AM. J. Hum. Genet.* 63,11-16 (1998)
65. Meyling H. Cheok* and William E. Evans. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for pharmacogenomics of cancer therapy. *Nature* 6,117-129 (2006).
66. Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 45, 51–88 (2005).
67. Krajinovic, M. *et al.* Role of polymorphisms in *MTHFR* and *MTHFD1* genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J.* 4, 66-72 (2004).
68. Lugthart, S. *et al.* Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 7, 375-386 (2005).