



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**



**Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y
Biomedicina (CICSaB)**



**DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

TESIS QUE PRESENTA

L.E. RUTH TREJO MARTÍNEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

DIRECTORES DE TESIS

DRA. PERLA DEL CARMEN NIÑO MORENO

DR. EDGAR ALEJANDRO TURRUBIARTES MARTÍNEZ

AGOSTO 2023



Detección de genes de fusión en pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda. Por Ruth Trejo Martínez. Se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en la División de Genómica Médica de Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la tutoría de la Dra. Perla del Carmen Niño Moreno y el Dr. Edgar Alejandro Turrubiartes Martínez, y en colaboración con los departamentos de Oncología y Hematología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” bajo la autorización de la Dra. Lourdes Cecilia Correa González y el Dr. Oscar de Jesús Pérez Ramírez. Gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca con el número 1084671 para la realización de este trabajo.

Tesis que presenta

L.E. RUTH TREJO MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Perla del Carmen Niño Moreno
Dr. Edgar Alejandro Turrubiartes Martínez

ASESORES INTERNOS

Dra. Sofía Bernal Silva
Dr. Roberto Fidencio González Amaro

JURADO

Presidente de sinodales: Dr. Christian García Sepúlveda
Secretaria de sinodales: Dra. Sofía Bernal Silva
Sinodal: Dr. Roberto Fidencio González Amaro

AGOSTO 2023

Agradecimientos

A Dios por permitirme terminar una etapa más en esta vida, por las oportunidades que me ha brindado y por los retos que me ha permitido superar.

Agradezco al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) por haberme aceptado y ser parte de ella al abrirme sus puertas de su seno científico para poder estudiar mi maestría, así como también a los y las diferentes docentes que brindaron su conocimiento y apoyo para seguir adelante día a día.

A mi mamá y mi hermano, por su apoyo incondicional y porque siempre demostraban lo orgullosos que estaban de mí.

A mis directores de tesis, por brindarme las bases necesarias para iniciar y culminar la maestría, por el apoyo brindado dentro y fuera de los horarios escolares y laborales, así como también agradezco el haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

A mis asesores de tesis, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico.

A mi amigo Ricardo, gracias por motivarme a seguir adelante y hacer que confiara en mí misma, por siempre estar ahí apoyándome en cada paso que doy.

También agradezco a todos los que fueron mis compañeros de laboratorio y de clase durante la maestría, en especial a mi amigo Alan ya que gracias al compañerismo, amistad y apoyo moral este camino recorrido fue más divertido.

Detección de genes de fusión en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

Trejo-Martínez R¹, Turrubiarres Martínez E^{1,2}, González-Amaro R³, Bernal Silva S^{3,4}, Niño-Moreno P^{1,2}

¹Sección de Genómica Médica, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina.

²Facultad de Ciencias Químicas. UASLP. ³Sección de Medicina Molecular y Traslacional, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina. Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología, UASLP.⁴

Palabras clave: *Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)*, *Médula Ósea (M.O)*, *Enfermedad Mínima Residual (EMR)*.

Correspondencia:

Perla del Carmen Niño Moreno Ph. D.

Sección de Genómica Médica

Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, UASLP

Av. Sierra Leona No. 550

Col. Lomas Segunda Sección C.P. 78210

San Luis Potosí, México

52 (444) 826 1450 ext. 6420 y 8545

ncarmenp@uaslp.mx

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el trastorno oncológico más común en niños y adolescentes, caracterizado por la proliferación incontrolada de células hematopoyéticas de estirpe linfoide. Esta condición continúa siendo un problema de salud importante en México, ya que el promedio de sobrevivencia (40-60%) es muy bajo. Lo anterior se debe a diversos factores, incluyendo la falta de disponibilidad de procedimientos de diagnóstico molecular. Se ha reportado que los genes de fusión *BCR-ABL* (cromosoma Filadelfia), *ETV6-RUNX1* y *MLL-AF4* se asocian con características clínicas que influyen en el pronóstico y tratamiento de pacientes pediátricos con LLA. El objetivo de este trabajo fue el de estandarizar las técnicas para la detección de estas traslocaciones, así como realizar un estudio piloto de su frecuencia en pacientes del Estado de San Luis Potosí. Se obtuvieron muestras de médula ósea de 18 pacientes pediátricos con el diagnóstico (morfológico e inmunofenotipo) de LLA del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto". De estas muestras se extrajo el RNA total y mediante PCR se sintetizó el cDNA correspondiente. Posteriormente, se estandarizó la detección de los genes de fusión *BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1* y *MLL-AF4* mediante PCR de punto final. Se utilizaron como controles, la amplificación del gen *ABL* endógeno, así como la amplificación de los tres controles positivos correspondientes. De esta forma, se corroboró la correcta estandarización de las tres PCRs. Encontramos que el inmunofenotipo de las muestras correspondió a LLA B común (n=15), pro-B (n=1) y pre-B (n=2), en tanto que la traslocación *BCR-ABL* se detectó en 0/8 muestras, la *ETV6-RUNX1* en 5/12 muestras y la *MLL-AF4* en 5/6 muestras. No se encontró una asociación aparente entre la presencia de las mutaciones y las características clínicas de los pacientes, muy probablemente por el bajo número de muestras estudiadas. Los resultados de este estudio indican que se estandarizaron apropiadamente las reacciones de PCR propuestas y que es necesario estudiar un mayor número de pacientes para corroborar su utilidad clínica en nuestro medio.

INTRODUCCIÓN

La leucemia es el trastorno oncológico más común en la infancia, inicia en la médula ósea (MO) y posteriormente se disemina a sangre periférica. Esta patología se caracteriza por el aumento de la producción de células inmaduras (blastos), pierden la capacidad de diferenciarse debido a su inestabilidad genética dando lugar a una clona maligna. La acumulación de estas células inmaduras provoca fallo medular e infiltración a órganos ⁽⁹⁾.

La etiología de esta patología no es del todo clara, sin embargo, se sabe que ocurren cambios en el ADN de las células de la MO principalmente por el reordenamiento anómalo en el cual dos cromosomas no homólogos, intercambian segmentos entre sí formando un gen de fusión. La mayor prevalencia de LLA, se observa en población hispana y caucásica, así como también en población masculina respecto a la femenina ⁽¹⁴⁾.

El cuadro clínico de esta patología se caracteriza por: presencia de palidez, fatiga, fiebre, sangrado nasal, infecciones que se presentan de manera recurrente o persistente, inflamación de ganglios linfáticos y dolor óseo, así como articular o de columna ⁽¹⁾. Para el diagnóstico de la LLA, se toman en cuenta signos, síntomas y estudios de laboratorio los cuales se enfocan principalmente en identificar alteraciones en la biometría hemática ⁽¹⁾.

Una clave del éxito terapéutico es la correcta identificación y clasificación de las características biológicas de la LLA como lo son las alteraciones estructurales de los cromosomas. Las guías de práctica clínica (GPC) en México indican que para un correcto diagnóstico se hace una clasificación de la leucemia aguda por el sistema MIC, el cual toma en cuenta la clasificación morfológica por tinción celular, la clasificación por inmunofenotipo y la clasificación citogenética para detectar alteraciones estructurales de los cromosomas ⁽²⁶⁾.

En la LLA pediátrica, los genes de fusión t(12;21) (*TEL-AML / ETV6-RUNX1*), t(1;19) (*E2A-PBX1/TCF3-PBX1*) y t(9;22) (*BCR-ABL*) y las fusiones que involucran al gen *MLL* (principalmente *MLL-AF4*) t(4;11) son las anomalías genéticas mejor caracterizadas y de mayor frecuencia ⁽¹⁰⁾.

El cromosoma Philadelphia o t(9;22) *BCR-ABL* fue la primera anomalía cromosómica, asociada a una enfermedad maligna específica en humanos ⁽¹¹⁾. La traslocación del gen *BCR* localizado en el cromosoma 22, y el gen *ABL* localizado en el cromosoma 9, forma un gen de fusión híbrido llamado *BCR-ABL*, que codifica para una proteína tirosin quinasa que tiene funciones en la regulación del ciclo celular, provocando un trastorno proliferativo. Este gen de fusión *BCR-ABL* está presente en población pediátrica con LLA de 0 a 14 años alrededor del 3 al 5% y de 14 a 18 años en un 25% ⁽¹¹⁾.

El mecanismo por el que esta proteína tirosin quinasa provoca un trastorno proliferativo involucra la unión de un ligando a la proteína tirosin quinasa *BCR-ABL* y su fosforilación. Estos residuos de tirosina fosforilados forman sitios de unión a otras proteínas como Jak quinasa, iniciando una cascada de señalización que produce un aumento de la proliferación celular, la

capacidad de infiltración de células que afectan a otros tejidos, evasión de la muerte celular programada e inhibición de la reparación del ADN ⁽¹²⁾.

Gracias a la detección molecular del gen de fusión, se pudo identificar que al utilizar un tratamiento específico con un inhibidor de tirosin quinasas como el Imatinib; la supervivencia de los pacientes con LLA hasta 5 años sin complicaciones aumentó al 70%, cuando antes de esta terapia, esta traslocación estaba asociada con una supervivencia muy baja ⁽¹³⁾.

Por otro lado, se ha reportado, que el gen de fusión *ETV6-RUNX1/TEL-AML1* se presenta en la LLA con una frecuencia del 20 al 25% en edades de 2 a 12 años, y su presencia se asocia a un buen pronóstico con un tratamiento específico ⁽¹⁴⁾. Gracias al cual en el 90% de los casos el tratamiento resulta exitoso perdiendo el producto de fusión por completo. Sin embargo, la recaída se asocia con la aparición nuevamente de este producto de fusión, por lo que es útil evaluar la presencia de enfermedad mínima residual (EMR) en esta traslocación ⁽¹⁵⁾.

El gen de fusión *MLL-AF4* representa aproximadamente el 50 al 85% de las translocaciones en la LLA, y aunque este gen puede tener variaciones con más de 80 genes, el gen de fusión *MLL-AF4* representa en su mayoría el 36%. Las leucemias con este gen se caracterizan por tener un inicio repentino con una progresión agresiva y un pronóstico notoriamente precario. Se ha demostrado que este gen de fusión se presenta con una frecuencia del 49% en niños de 0 a 1 año, y un 44% en niños y adolescentes entre 1 y 18 años ⁽¹⁶⁾.

La importancia de este gen de fusión radica en que se asocia a mal pronóstico en niños menores de un año, en especial en menores de 90 días, teniendo una respuesta deficiente al tratamiento e incluso al trasplante de células hematopoyéticas ⁽¹⁶⁾.

En México la LLA representa el 80% de los diagnósticos de leucemia en menores de 15 años con respecto a otras neoplasias. En los últimos años el porcentaje de nuevos casos en pacientes pediátricos de 0 a 14 años en ambos sexos es del 37.2% y la mortalidad es del 52.8% convirtiéndola en un importante problema de salud pública ⁽¹²⁾.

En México, la supervivencia de los pacientes pediátricos que padecen LLA es de menos del 60%, en contraste con países desarrollados donde la supervivencia para esta enfermedad se encuentra por arriba del 90%. En la mayoría de los casos esto se debe a la falta de acceso a estudios de inmunofenotipo y citogenética ⁽²⁴⁾.

Se estima que cerca del 85% de los pacientes entre 1 a 18 años con LLA recién diagnosticada y contando con regímenes terapéuticos adecuados, sobreviven a 5 años sin complicaciones ⁽²⁵⁾. Por lo que es de gran importancia el diagnóstico oportuno de la LLA para guiar las decisiones terapéuticas que sean más adecuadas y así aumentar la supervivencia de los niños con esta patología.

Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue el de estandarizar las técnicas para la detección de estas traslocaciones, así como realizar un estudio piloto de su frecuencia en pacientes del Estado de San Luis Potosí.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de estudio.

El presente trabajo de investigación es de tipo descriptivo y observacional en donde se incluyeron muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA por inmunofenotipo del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de la ciudad de San Luis Potosí, parte de las muestras derivan de otro protocolo más grande y aquellas que se pudieron recolectar durante un periodo de 6 meses a partir de 15 de junio del 2021. Se contó con la aprobación de los comités de Investigación y Ética en Investigación del mismo hospital bajo el número de registro 23-19. Todos los sujetos de estudio tuvieron firmado el consentimiento informado por sus padres o tutores.

Extracción de ARN.

La muestra de médula ósea se recolectó en tubos con EDTA, de los cuales 600 μ l de muestra se utilizaron para lisar los eritrocitos y posteriormente realizar la extracción del ARN mediante el método de Nucleozol modificado. El ARN obtenido se cuantificó con el equipo NanoDrop Thermo Scientific con mediciones a 260/280 nm tomando un valor igual o mayor a 1.7 como valores de pureza e integridad aceptable. El ARN se resguardó a -80°C hasta su uso.

RT-PCR

Se ajustó el RNA a una concentración de 2 μ g de RNA total por 20 μ l de reacción para realizar la síntesis de cDNA utilizando el kit comercial applied biosystems (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador applied biosystems by Thermo Fisher Scientific con 1 unidad de Multiscribe Reverse Transcriptase, 50U/ μ L, 10X RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X (100mM) desoxinucleótidos trifosfato (dNTP Mix) y 100 μ L RNase Inhibitor, en un volumen final de 20 μ L, añadiendo 2 μ g de RNA. Se incubaron a 25°C durante 10 minutos, 37°C por 2 horas y finalmente a 85°C durante 5 minutos.

El cDNA obtenido se cuantificó con el equipo NanoDrop Thermo Scientific con mediciones a 260/280 nm tomando un valor de 1.6–1.8 como valores de pureza e integridad aceptable. El cDNA se resguardó a -20°C hasta su uso.

PCR del gen housekeeping ABL

La evaluación del gen constitutivo *ABL* para comprobación de una correcta síntesis de cDNA, se realizó por PCR en un termociclador applied biosystems by Thermo Fisher Scientific. En la

tabla anexo 1 (en la sección de anexos), se muestra el juego de oligonucleótidos específicos, utilizados para la amplificación del gen constitutivo *ABL*. Se utilizó 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer de enzima, 4 mM de MgCl₂, 2 mM de oligonucleótidos específicos (Tabla 2), 2 mM de dNTPs, en un volumen final de 25µL. El producto de PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio para su análisis.

Este gen se encuentra dentro del genoma de los mamíferos y se toma como el mejor control para la detección de la LLA ya que es un buen gen housekeeping **estable**, que ha mostrado una variabilidad mínima en la expresión genética. El transcrito, de 280pb se observa en la **Figura 1 A**.

Para este estudio se contó con 3 controles positivos para detección de estos genes de fusión, el gen para *BCR-ABL p190* que fue proporcionado por otro estudio, *TEL-AML1* fue sintetizado y *MLL-AF4* fue clonado en un vector, **Figura 1 A**. El certificado de análisis se muestra en la **figura 2 y 3** respectivamente.

PCR del gen de fusión BCR-ABL p190 o Cromosoma Philadelphia t (9;22).

La evaluación del gen de fusión *BCR-ABL p190* se realizó por PCR anidada en un termociclador applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, el juego de oligonucleótidos específicos, utilizados para la amplificación se detallan en la **tabla anexo 2**. Se utilizó 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer de enzima, 5/3 mM de MgCl₂, 1 mM de oligonucleótidos específicos, 3/2 mM de dNTPs, en un volumen final de 25µL. El producto de la PCR se utilizó en una PCR anidada con diferentes oligonucleótidos a 1 Mm. El producto de la segunda amplificación de PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio para su análisis. El transcrito de 474pb correspondiente al punto de corte e1a2 de p190 se observa en la **figura 1A**.

PCR del gen de fusión TEL-AML1 t (12;21).

La evaluación del gen de fusión *TEL-AML1* se realizó por PCR anidada en un termociclador applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, el juego de oligonucleótidos específicos, utilizados para la amplificación se detallan en la **tabla anexo 3**. Se utilizó 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer de enzima, 2.5/1.5 mM de MgCl₂, 0.5 mM de oligonucleótidos específicos (Tabla 6), 3/2 mM de dNTPs, en un volumen final de 25µL. El producto de la PCR se utilizó en una PCR anidada con diferentes oligonucleótidos. El producto de la segunda amplificación de PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio para su análisis. El transcrito de un tamaño de 260pb se muestra en la **figura 1 A**.

PCR del gen de fusión MLL-AF4 t (4;11).

Se realizó una PCR anidada en un termociclador applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, el juego de oligonucleótidos específicos, utilizados para la amplificación se detallan en la **tabla anexo 4**. Se utilizó 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer de enzima, 2.5 mM de MgCL₂, 0.5 mM de oligonucleótidos específicos (Tabla 7), 3 mM de dNTPs, en un volumen final de 25µL. El producto de la PCR se utilizó en una PCR anidada con diferentes oligonucleótidos. El producto de la segunda PCR se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio para su análisis. El transcrito de tamaño de 200pb se muestra en la **figura 1 A**.

MATERIAL Y METODOS SUPLEMENTARIOS

Para la evaluación del gen de fusión *MLL-AF4* se contó con un gen control clonado en el plásmido pUC57, el certificado de análisis se muestra en la **Figura 3**. Para lo cual fue necesario realizar métodos suplementarios como se indica a continuación.

Digestión con Apal

Se realizó la digestión del vector con enzima de restricción Apal que realiza un corte en 1283pb. Se utilizó una reacción de Buffer de enzima de restricción 10X (Promega), BSA acetilado 10µg/µl, DNA 1µg/µl, en un volumen final de 20µl. El producto de este corte se utilizó en una PCR anidada como control positivo del gen de fusión *MLL-AF4*.

Transformación en células competentes y Clonación del plásmido con el gen MLL-AF4

Se utilizaron células transformantes Top 10, las cuales fueron cultivadas en caldo LB (Luria Bertani) y posteriormente agar LB. La transformación de células competentes se realizó por choque térmico con 1µl del plásmido circular *MLL-AF4*, y 100µl de células competentes Top 10. Se añadió 900µl de LB caldo y se incubó a 37°C en agitación por 16 a 24hrs. Se sembraron 100µl de la transformación en placa de LB, con asa acodada y se incubó a 37°C por 16 h. Se sembró 1 colonia en caldo LB a 37°C en agitación por 16 h. Se tomó 3ml del medio para formar un pellet por medio de centrifugación, se congeló un pellet con glicerol a -80°C, y el resto se utilizó para extracción de DNA plasmídico con el QIAGEN Plasmid Mini Kit según las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

Características demográficas de los sujetos de estudio.

Como se muestra en la **tabla 1**, el total de pacientes con diagnóstico de LLA por inmunofenotipo fue de 18 en edades de 8 meses a 14 años, de los cuales 2 pacientes presentaron un diagnóstico de LLA pre-B, 1 paciente presentó LLA-pro-B y 15 pacientes presentaron diagnóstico de LLA B común. De los pacientes con LLA el sexo que predominó fue el masculino con 14 pacientes y el femenino con 4.

Detección de genes de fusión en la LLA

Gen de fusión *BCR-ABL*

Para el gen de fusión *BCR-ABL* o cromosoma *Philadelphia* que corresponde a la translocación t (9;22) (9q34.1)(22q11.2), se analizaron 8 muestras de pacientes en edades de 11 a 14 años (las muestras fueron seleccionadas por frecuencia como se muestra en la **tabla 2**) presentando resultado negativo, se amplificó a la par el control positivo para esta translocación obteniendo una banda de 474Pb correspondiente a dicho gen de fusión p190 e1a2, **figura 1 B**.

Gen de fusión *TEL-AML1*

Para este gen de fusión se analizaron 12 muestras, 8 pacientes en edad de 2 a 9 años, edad en la que predomina este gen de fusión, y 4 pacientes de 11 a 14 años ya que esta translocación se presenta de manera frecuente en la LLA. (las muestras seleccionadas para este gen se muestran en la **tabla 2**). El producto de estas PCRs dio como resultado la amplificación de una banda de 210 pb aproximadamente correspondiente a 5 pacientes en edad de 12, 3, 5, 12 y 2 años como se observa en la **figura 1 C**.

Gen de fusión *MLL-AF4*

La presencia del gen de fusión correspondiente a la translocación t (4;11) (q21;q23). Se analizaron 6 muestras de niños en edad de 8 meses a 14 años, (las muestras seleccionadas para este gen se muestran en la **tabla 2**) de las cuales se detectó como positivo este gen en 5 pacientes en edades de 8 meses, 3, 12, 12 y 7 años respectivamente. La amplificación del producto se observa en la **figura 1 D**.

DISCUSIÓN

Las translocaciones cromosómicas son las alteraciones genéticas más comúnmente encontradas en la LLA por lo que la detección por medio la evaluación morfológica, citometría de flujo e inmunofenotipo, así como la detección molecular de este daño genético es un buen determinante para el diagnóstico, estratificación del riesgo y tratamiento personalizado.

Las translocaciones que se presentan con mayor frecuencia en la LLA pediátrica son la t (12;21) [*TEL-AML1*], t (9;22) [*BCR-ABL*] y la reorganización de *MLL* ⁽²⁰⁾.

En este estudio se demuestra que la prevalencia del sexo en los pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA fue el masculino, las alteraciones más comunes presentes fueron la presencia de anemia, leucopenia y plaquetopenia, lo que indica una alteración medular específica de la LLA. El inmunofenotipo reportado nos indica que el diagnóstico predominante en los pacientes fue el de LLA B-Común (tabla 1,2,3). González A. y Col en el 2021, mostraron la presencia de LLA B-Común en el 71.60%, subtipo Pre-B con un 21.60%, mientras que el subtipo Pro-B se presentó en el 2.37% de los pacientes ⁽²⁸⁾.

Al evaluar la distribución de frecuencia de los genes de fusión según el inmunofenotipo de la leucemia se determinó que al menos con los 18 pacientes del estudio no hay una relación con el diagnóstico por inmunofenotipo de la LLA y la presencia específica de una translocación ya que de los pacientes que resultaron positivos para alguna de las 3 translocaciones solamente 1 tiene diagnóstico de LLA pro-B. Lepe J. y Col. En el 2017, mencionan que en uno de los casos con diagnóstico de LLA pro-B, en un menor de 1 año presentó el reordenamiento del gen *MLL*, tres casos de LLA B-Común presentaron el gen de fusión *TEL-AML1* y el diagnóstico de LLA Pre-B no presentó alteraciones genéticas ⁽²⁹⁾.

Devi G y Col. En el 2022. Mencionan que el gen de fusión *TEL-AML1* es uno de los más frecuentemente asociado a la LLA en la población pediátrica. Se asocia con buen pronóstico, describiéndose como una anomalía común en la LLA de células B al menos en ese estudio el 13.6% de la población presentó este gen de fusión ⁽²¹⁾.

Mariela C y colaboradores en el 2015, analizaron muestras de M.O de pacientes diagnosticados con LLA con una edad media de 10 días a 16 años, reportando que el 15.2% del total de muestras procesadas presentaron el gel de fusión *TEL-AML1* ⁽²²⁾. Este resultado es menor al detectado en este estudio donde se reportó el 42% de la presencia de este gen en la población conforme al total de muestras analizadas. De las 5 muestras positivas, encontramos que 4 muestras correspondían a diagnóstico de LLA B-Común y 1 con diagnóstico de LLA- pro B.

El inmunofenotipo de estos pacientes positivos para el gen de fusión *TEL-AML1* mostraba la presencia en común de CD19, CD45 low, 4 pacientes mantenían diagnóstico de LLA B-común y un paciente presentaba diagnóstico de LLA-pro B. El hemograma completo revelaba que

la hemoglobina y el hematocrito en los 5 pacientes es bajo, el conteo de glóbulos blancos es variable y el recuento de plaquetas en todos se encontraba disminuido.

Layton-Tovar C. en el 2015, Menciona que se ha estudiado que los pacientes suelen tener una tasa de curación baja si las células leucémicas presentan ciertas características específicas como la presencia del Cromosoma Philadelphia *BCR-ABL* (t:9;22)(q34.1; q11.2) y *MLL-AF4* (t:4;11)(q21;23) ⁽²³⁾. En este estudio no fue posible detectar Cromosoma Philadelphia *BCR-ABL*, pero una de las causas que nosotros asociamos es a la falta de pacientes con edades mayores a 14 años, posiblemente si se aumentara el tamaño de la muestra analizada y se incluyeran pacientes de mayor edad podríamos tener hallazgo del gen de fusión *BCR-ABL*. ya que se encuentra en un 25% en pacientes de 14 a 18 años, esclareciendo así el predominio de la edad por el mismo. Esto es importante ya que, Juárez G. y Colaboradores en el 2020 exponen que los factores biomoleculares de mal pronóstico son muy frecuentes en las leucemias agudas infantiles, presentando en un 17.2% la presencia del gen de fusión *MLL-AF4* y en un 20.7% *BCR-ABL* ⁽²⁷⁾. En nuestro estudio el 83% de la población (5 pacientes) presentaron el gen de fusión *MLL-AF4*, y al menos 2 de los pacientes fallecieron, concordando con los estudios mencionados sobre el mal pronóstico que acompaña a esta translocación.

El inmunofenotipo de estos pacientes positivos para el gen de fusión *MLL-AF4* mostraba la presencia en común de CD19, CD45 low, 4 pacientes mantenían diagnóstico de LLA B-común y un paciente presentaba diagnóstico de LLA-pro B, 2 pacientes mantenían expresiones parciales y aberrantes de mieloperoxidasa. El hemograma completo revelaba que la hemoglobina y el hematocrito en 4 pacientes es bajo, el conteo de glóbulos blancos es variable y el recuento de plaquetas en 3 pacientes se encontraba disminuido.

Zata J. y colaboradores en el 2020, mencionan que el cambio de linaje representa 6 a 9% de los casos y se observa con mayor frecuencia en pacientes infantiles. Y en su estudio exponen a un paciente de 9 años con Diagnóstico de LLA- B de Muy Alto Riesgo, que recae con LMA tras 1 año 9 meses de recibir tratamiento con Quimioterapia y radioterapia profiláctica ⁽²⁷⁾. Por lo cual sería indispensable continuar con un seguimiento de estos pacientes que presentaron cambio de linaje ya que se ha visto una expresión de las características de esta enfermedad más agresivas. Dado que uno de los dos pacientes en este estudio que presentan estas características falleció.

CONCLUSION

En este estudio se logró estandarizar, la metodología para la detección molecular de los genes de fusión *BCR-ABL p190*, *TEL-AML1* y *MLL-AF4* en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA. El 44% de los pacientes, a los que se les probó alguna translocación, presentaron algún gen de fusión de los ya mencionados, sin embargo, no se encontró una distribución relacionada al diagnóstico por inmunofenotipo y la presencia específica de alguna translocación, debido a la pequeña cantidad de pacientes que conformaron el presente estudio.

A pesar de ello, este estudio pone en evidencia que la implementación de la detección de genes de fusión en la población pediátrica puede mejorar la estratificación del riesgo y pronóstico, permitiendo una adecuada elección terapéutica que ayude a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de Salud. SS. (2008). Diagnóstico temprano y oportuno de leucemia aguda en la infancia y adolescencia en el primer nivel de atención. <http://www.facmed.unam.mx/sg/css/GPC/SIDSS-GPC/gpc/docs/SSA-061-08-ER.pdf>
2. Domenech, C. H. (2021). Leucemia linfoblástica aguda del niño y el adolescente. EMC – Pediatría; 56(1):1–9. [https://doi.org/10.1016/S1245-1789\(21\)44720-7](https://doi.org/10.1016/S1245-1789(21)44720-7)
3. López, H. G. Acute lymphoblastic leukemia. (2019). Genetic mechanisms. Hematol Méx.;20(4):273-277. <https://doi.org/10.24245/rhematol.v20i4.3516>
4. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia. (2015) Epidemiología del cáncer en menores de 18 años. [Epidemiología del cáncer en menores de 18 años, México 2015 | Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia | Gobierno | gob.mx \(www.gob.mx\)](http://www.gob.mx)
5. Swerdlow, S. H, et al. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood, 127(20), 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
6. Emadi, A., & Ley J. Y. (2022) MSD Manual Professional Version. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). [Chronic Myeloid Leukemia \(CML\) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition \(msdmanuals.com\)](https://www.msdmanuals.com)
7. National Cancer Institute. (2022). Childhood acute lymphoblastic leukemia treatment (PDQ®)—patient version. <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>
8. Behring S. (2021) B-cell acute lymphoblastic leukemia. healthline, [B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Symptoms, Treatment, and Outlook \(healthline.com\)](https://www.healthline.com/health/b-cell-acute-lymphoblastic-leukemia)
9. Ribeiro, RC., & Pui, CH. (1993). Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematologic pathology*, 7(3), 121–142. [Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/121142/)
10. Jiménez, M. S., Hidalgo, M. A., & Ramírez, B. J. (2017). Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. Acute lymphoblastic leukemia: a genomic perspective. Boletín médico del Hospital Infantil de México, 74(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.bmhix.2016.07.007>
11. Pui, C. H., Roberts, K. G., Yang, J. J., & Mullyghan, C. G. (2017). Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 17(8), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.03.299>

12. Savage, D. G., & Antman, K. H. (2002). Imatinib mesylate a new oral targeted therapy. *The New England journal of medicine*, 346(9), 683–693. <https://doi.org/10.1056/NEJMra013339>
13. Scheijen, B. & Griffin, J. (2002) Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 21, 3314–3333. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205317>
14. Centro de alta Especialidad en Genética Humana. (2022). Análisis molecular del rearreglo TEL/AML1 (TRANSLOCACIÓN 12;21) en leucemias. <http://www.dnagen.com.mx/analisis-molecular-del-rearreglo-telaml1-translocacion-1221-en-leucemias/>
15. Bhojwani, D., et al Bhojwani, D., Pei, D., Sandlund, J. T., Jeha, S., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J. E., Raimondi, S. C., Shurtleff, S., Onciu, M., Cheng, C., Coustan, S. E., Bowman, W. P., Howard, S. C., Metzger, M. L., Inaba, H., Leung, W., Evans, W. E., Campana, D., Relling, M. V., & Pui, C.-H. (2012). ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *NIH*, 26(2), 265–270. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.227>
16. Britten, O., Ragusa, D., Tosi, S., & Kamel, M. Y. (2019). MLL-Rearranged Acute Leukemia with t (4;11) (q21; q23)-Current Treatment Options. Is There a Role for CAR-T Cell Therapy?. *Cells*, 8(11),1341. <https://doi.org/10.3390/cells8111341>
17. Meyer, C., Burmeister, T., Gröger, D., Tsaur, G., Fechina, L., Renneville, A., Sutton, R., Venn, N. C., Emerenciano, M., Pombo-de-Oliveira, M.S., Blunck, B. C., Lopes, A. B., Zuna, J., Trka, J., Ballerini, P., Lapillonne, H., Braekeleer, M., Cazzaniga, G., Abascal, C. L., Van der Velden, V. J. H., Delabesse, E., Parque, T. S., Oh S.H., Silva, M. L. M., ... & Marschalek, R. (2018). The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*, 32(2), 273–284. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.213>
18. Bonaventure, A., Harewood, R., Stiller, C.A., Gatta, G., Clavel, J., Stefan, D.C., Carreira, H., Spika, D., Gragera, R.M., Peris, B. R., Piñeros M., Sant M., Kuehni CE., Murphy, G. M.F., Coleman, M.P., & Allemani C. (2017). Worldwide comparison of survival from childhood leukemia for 1995-2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89828 children from 198 registries in 53 countries, *The Lancet Haematology*, 4(5), e202–217. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30052-2](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30052-2)
19. Betancourt, N.Q., Chávez, I. M.I., Leblanch, F. C.C., & Jimenes P.N. (2021). Clinical epidemiological characterization and survival in patients under 19 years with leukemia. *MEDISAN*. 25(1), 26-40 <https://www.redalyc.org/journal/3684/368466087003/html/#B9>
20. Terwilliger, T & Abdul, H. M. (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 7, e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
21. Devi, G.S., Ahmed, F., Mundada, M.C., Khera, R., Nambaru, L., Mallavarapu, K., Boyella, P.K., Patil, V., Laddha, P.S., & Rajappa, S.J. (2022) Retrospective Study of B Lymphoblastic Leukemia to Assess the Prevalence of TEL/AML1 in South India: A Study of 214 Cases and Review of Literature. *IJMPO*. 4, <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742611>

22. Coccé, MC., Alonso, CN., Rossi, JG., Bernasconi, AR., Rampazzi, MA., Felice, MS., Rubio, PL., Eberle, SE., Medina, A., & Gallego, MS., (2015). Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina. *Molecular syndromology*, 6(4), 193–203. [hTtps://doi.org/10.1159/000441046](https://doi.org/10.1159/000441046)
23. Layton TC. (2015). Prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia: Possible molecular markers. *Revista de Medicina e investigación*, 3(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.mei.2015.02.008>
24. Velasco, P., & Murillo, L. (2021). Leucemia aguda en Pediatría |*Pediatría Integral*, 25 (6): 296–307. <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2021-09/leucemia-aguda-en-pediatria/>
25. National Cancer Institute. (2023). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment: Treatment-Health Professional Information. NCI. [Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment \(PDQ®\): Treatment - Health Professional Information \[NCI\] | Kaiser Permanente](#)
26. Catalogo Maestro de Guías de Práctica Clínica, Guía de Práctica Clínica SS-061-08. (2017). Diagnóstico oportuno de la leucemia aguda en pediatría en primer y segundo nivel de atención. 20 [ER.pdf \(cenetec-difusion.com\)](#)
27. Juárez, A., Luna, S. N.C., Chargoy, V.E., Juárez, M. L.A., Martínez, R. M.N., Zárate, O. N., Martínez, V. E., López, M. B., Pelayo, R., & Balandrán, J.C. (2020). Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias from Oaxaca, Mexico. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 19. <https://doi.org/10.1177/1533033820928436>
28. Kishore, M., Kumar, V., Marwah, S., & Nigam, S. A. (2019). Conversion of ALL to AML: A rare phenomenon. Case Report. *Online FirstIndian J*, 314(3). [\(PDF\) CONVERSION OF ALL TO AML: A RARE PHENOMENON](#)
29. González, C. A., Alvarado, S. D., Cisneros L. M., Ramírez, P. J., Poveda, A. M., Espín, C. L. (2021). Hallazgos moleculares y citogenéticos en pacientes pediátricos, diagnosticados de leucemia linfoide aguda: Un estudio de centro único. *SOLCA*, 31(2), 141–154. <https://doi.org/10.33821/561>
30. Zúñiga, L. J.L., López, J. F.J., & Hernández, O. J.G. (2017). Cytopathologic features of childhood acute leukemia at the Hospital of Especialidades Pediátricas, Chiapas, Mexico. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 74(2), 122-133. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.12.002>

PIE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de PCRs de las translocaciones *BCR-ABL p190*, *ETV6-RUNX1* y *MLL-AF4* en muestras pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

A) Amplificación de controles positivos de traslocaciones detectadas en este estudio. C1: gen endógeno *ABL* (280 pb), C2: *BCR-ABL p190* (474 pb), C3: *ETV6-RUNX1* (210 pb) y C4: *MLL-AF4* (200 pb), respectivamente **B)** Amplificación de la traslocación *BCR-ABL p190*. Muestras de pacientes M1 a M8 resultaron negativas a la presencia de este gen de fusión. **C)** en el caso de *ETV6-RUNX1*. Las muestras M1, M2, M4, M5 y M7 resultaron positivas para esta traslocación (71%), mientras que M3 y M6 fueron negativas (29%). **D)** de manera similar para *MLL-AF4*. Las muestras M1 a M5 fueron resultados de pacientes positivos (83%) y M6 corresponde a resultado negativo (17%).

M: marcador de peso molecular. CP: control positivo. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Marcador de pares de bases de 100 pb.

Figura 2. Certificado de análisis gen sintético para traslocación *TEL-AML1*, utilizado como control positivo.

Figura 3. Certificado de análisis gen sintético clonado en vector para traslocación *MLL-AF4*, utilizado como control positivo.

FIGURAS

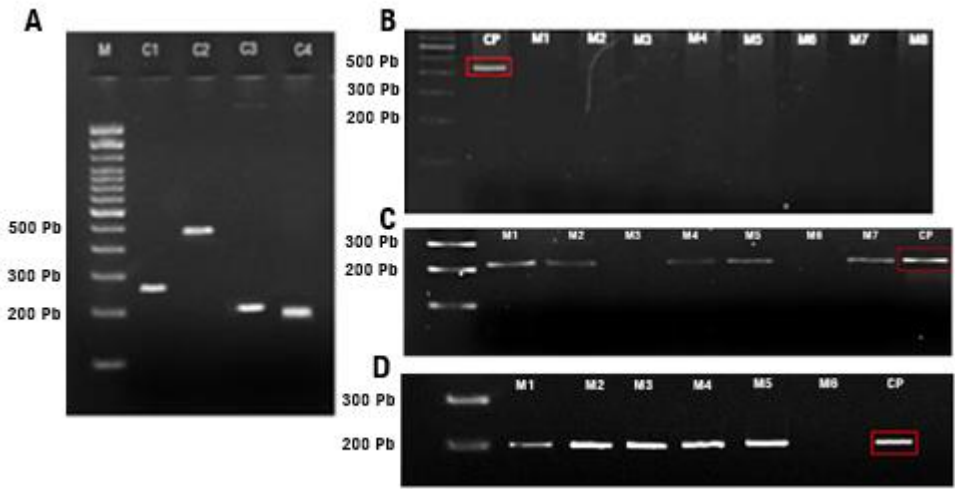


Figura 1.



CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: COT-23360-MPGM 16-Ene-23
 Usuario: QFB, Paulina Eiseset
 Institución: Centro de Investigación en Ciencias de la ID: M7964
 Nombre del T4Brick: TEL-AML1

Secuencia:
 CTTCATAGGG AAGGGGAGGC CATCAAGCTC TCTCATGGG AAGAACTGGC TTACATGACC 49
 CACATATGAG TGTCTGCTGC CCGGCTGGAA GAGCAAGCCA TGGCCATGAG GAGAAATAGCA 120
 GGAAAGAGAA TGGGAGAGGCT CAGCAAGAGC CAGCAATGCA TACTGGAGAT GAATCTCTCT 180
 AAGAGACTCC ACATATCCAG CAGAGAGCCG CCGTTCAGCC CCGCTTCCAC CCGGCTGAGC 240
 CCAAGCAGAA TTAGCCAGGC GTTA 264

Rendimiento final: 255.2 PM: 163014.88
 No. Bases: 264 Tm: 65.900000000000006
 94.27 µl de agua para una concentración de 1x10¹⁰ copias

Prueba de calidad del T4Brick		Imagen del T4Brick:
Especificaciones	Resultado	Tamaño (µM)
OD 260/280:	1.8	
Libre de contaminación:	Pasa	500
Apariencia clara:	Pasa	1000
Libre de partículas:	Pasa	

La concentración del T4 Brick es extremadamente alta (Aproximadamente 1.8855e+10 copias al resuspender en 50µl o una concentración de 1x10¹⁰ copias al resuspender en 94.27 µl)

Karla Montserrat
 LACP. Karla Montserrat Osorio Romero

RECOMENDACIONES DE USO
 Para resuspender se recomienda utilizar uno de los siguientes buffers
 - TE Buffer (10 mM Tris HCl/1 mM EDTA) pH 8.0
 - Agua libre de Nucleasas.

Una vez resuspendido es recomendado hacer alícuotas para minimizar la exposición del Oligo al ambiente de laboratorio y a el número de ciclos de congelación y descongelación.

ADN ARTIFICIAL S DE RL DE CV
 Eugenio Guerrero #278
 Cal. Tabachines
 Iniquito, Qto. www.Moligo.com



Figura 2.

T4OLIGO

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Solicitud: 05_CICSB_PE_23360 **Fecha:** 23/ENE/2022

Cotización: COT-23360-MPGM

Usuario: QFB. Paulina Elisset Ujanas Hernández

Nombre del Gen: MLL-AF4

ID: M7984-2

Longitud: 837 pb

Cantidad: ~3.2 µg

Volumen para dilución: 20 µl de H2O dd estéril (libre de nucleasas)

Vector de clonación: pUC57

Método de clonación: Digestión por enzima SmaI

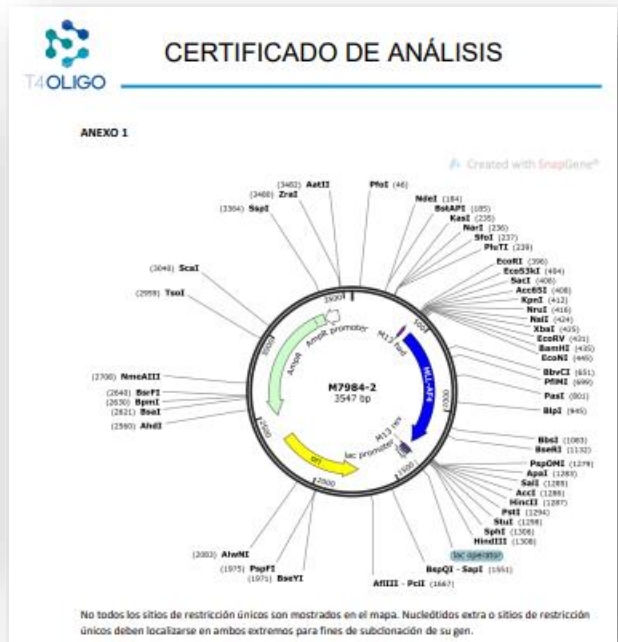


Figura 3.

TABLAS

Rango de edad	%	total
<1 año	6	1
2-9 años	50	9
11-14 años	44	8
Total	100	18

Sexo	%	total
Femenino	22	4
Masculino	78	14

Inmunofenotipo	%	total
LLA pre-B	11	2
LLA pro-B	6	1
LLA B común	83	15

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Se puede observar que el 44% de los pacientes se encontró en el rango de edad entre los 10-18 años. Del total de pacientes, el sexo masculino prevaleció con un 78%. En relación con el inmunofenotipo, el 83% presentó un diagnóstico de LLA B común, seguido de la LLA pre-B con un 11%.

Diagnóstico	Edad	BCR-ABL p190	ETV6-RUNX1	MLL-AF4
Translocaciones probadas				
LLA común	8 meses	-	-	P
LLA común	2 años	-	P	-
LLA pro-B	3 años	-	P	P
LLA común	3 años	-	N	-
LLA común	4 años	-	N	-
LLA común	5 años	-	P	-
LLA común	6 años	-	N	-
LLA pre-B	7 años	-	-	N
LLA común	7 años	-	N	P
LLA común	9 años	-	N	-
LLA común	11 años	N	N	-
LLA común	12 años	N	-	P
LLA común	12 años	N	P	P
LLA común	12 años	N	P	-
LLA común	13 años	N	-	-
LLA común	14 años	N	-	-
LLA pre-B	14 años	N	N	-
LLA común	14 años	N	-	-

Tabla 2. Traslocaciones probadas por citogenética en pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Las translocaciones se seleccionaron en base a la frecuencia y edad de predominio debido a muestra insuficiente para detectar los 3 genes de fusión en cada una. El símbolo “-“ representa la NO realización, “**P**” significa resultado positivo para la translocación y “**N**” resultado negativo.

ANEXOS

Blanco	Secuencia	Tamaño (Pb)	Tm (°C)
dtCA3	5'- TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G -3'	28	62.6
dtA2	5'- TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T -3'	25	62.2

Tabla anexo 1. Condiciones de PCR para el gen constitutivo *ABL*

Blanco	Secuencia	Tamaño (Pb)	Tm (°C)
dtNB1	5'- GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC A -3'	25	64.2
dtABL	5'- GGT ACC AGG AGT GTT TCT CCA GAC TG -3'	26	60.3
dtCA3	5'- TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G -3'	28	62.6
dtB2A	5'- TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T -3'	22	55.8

Tabla anexo 2. Condiciones de PCR anidada para *BCR-ABL p190*




Blanco	Secuencia	Tamaño (Pb)	Tm (°C)
TEL-A	5'- TGCACCCTCTGATCCTGAAC -3'	20	64
AML1-B	5'- AACGCCTCGCTCATCTTGC -3'	19	64
TEL-C	5'- AAGCCCATCAACCTCTCTCATC -3'	22	64
AML1-D	5'- TGGAAGGCGGCGTGAAGC -3'	18	64

Tabla anexo 3. Condiciones de PCR anidada para *TEL-AML1*

Blanco	Secuencia	Tamaño (Pb)	Tm (°C)
MLL (ENF207)	5'- CCCAAGTATCCCTGTAACAAAAA -3'	25	57.4
AF4 (ENR262)	5'- GATGGAGTCCACAGGATCAGAGT -3'	23	64.3
MLL (ENF208)	5'- GAAAGGAACTTGGATGGCTCA -3'	22	60.2

Tabla anexo 4. Condiciones de PCR para *MLL-AF4*

DIAPOSITIVAS

DETECCIÓN DE GENES DE FUSIÓN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Seminario de defensa de tesis de maestría
Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biomédicas Básicas

Presenta: LE. Ruth Trejo Martínez

2023

**Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas CICSA B.
Facultad de Medicina. UASLP.**

COMITÉ TUTELAR

Codirectores de Tesis
Dra. Perla del Carmen Niño Moreno
Dr. Edgar Alejandro Turrubiarres Martínez

Asesores Internos
Dra. Sofía Bernal Silva
Dr. Roberto F. González Amaro

JURADO

Presidente de sinodales:
Dr. Christian García Sepúlveda


Secretaria de sinodales:
Dra. Sofía Bernal Silva
Sinodal:
Dr. Roberto González Amaro

Índice

Antecedentes	4
Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Metodología	20
Resultados	28
Discusión	37
Conclusión	39
Agradecimientos	40
Anexos	41

Cáncer Infantil

El Cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adolescentes (WHO, 2021)

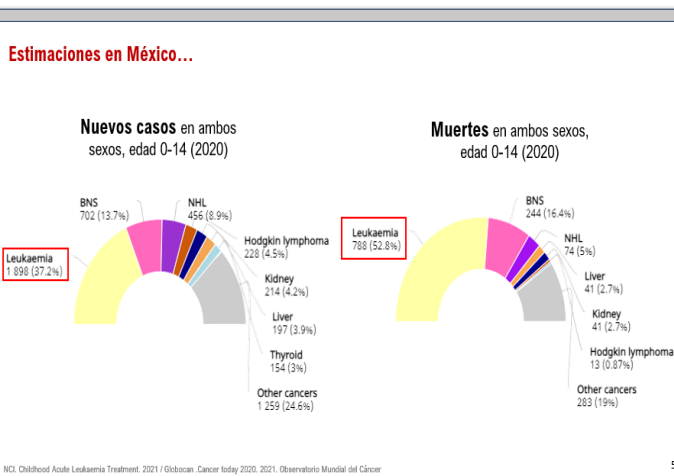
Primera causa de muerte por enfermedad en México

Gráfica 1. Tasas de incidencia por grupo de edad, ICNA




Leucemia

Tipo de cáncer más común → La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) representa el 80% de los diagnósticos en pediatría

Supervivencia a 5 años


Unidos contra el Cáncer



Vigilancia mundial de la supervivencia al cáncer (CONCORD-3) 2000 a 2014

- Países desarrollados han logrado avances en el diagnóstico, tratamiento y atención para LA, con una tasa de supervivencia a 5 años cercana al **90%**
- México, las estimaciones de supervivencia a 5 años varían entre **40 y 60%**

Una de las causas: es la falta de igualdad en el acceso a estudios para la clasificación adecuada de la LA




Unidad Médica Acreditada (UMA)

- Componente esencial para el análisis de información para el Registro de Cáncer de Niños y Adolescentes (RCNA)
- Registros de cáncer de la propia entidad federativa y fuera de la entidad

San Luis Potosí S.L.P

HOSPITAL CENTRAL DR. IGNACIO MORONES PRIETO SAN LUIS POTOSÍ 64



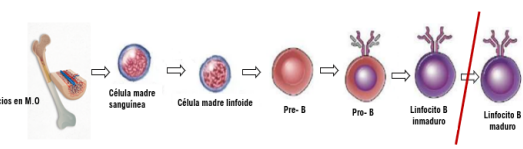
Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes 2019 Secretaría de Salud, Dirección general de epidemiología.

Distribución de casos de LA según Unidad Médica Acreditada, México, 2019.

Componente importante que da pauta a brindar una atención adecuada en el estado

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

- Afecta la estirpe linfóide en sus distintas etapas de maduración antes de diferenciarse a un linfocito B o T maduro
- Aumento incontrolado de células linfoides inmaduras (blastos)
- Estas células pierden su capacidad de diferenciación



Inicio en M.O → Célula madre sanguínea → Célula madre linfóide → Pre-B → Pp-B → Linfocito B inmaduro → Linfocito B maduro

Ahlikan E. y col. MSD manual profesional versión 2020 / OPC diagnóstico oportuno de la leucemia aguda en pediatría en primer y segundo nivel de atención. 2017

Diagnóstico según el ACS

Diagnóstico oportuno de la leucemia aguda

Signos y síntomas

Posibles signos: Adenomegalia, Hepatomegalia, Esplenomegalia, Sangrados, Etc.

B.H. Urgente

Referir a especialista

Indicación de AMO

Blastos 20%

Diagnóstico de LLA

Clasificación de la leucemia

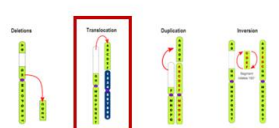
- Clasificación Morfológica: Franco-Americano-Británica (FAB)
 - L1
 - L2
 - L3
- Clasificación por inmunofenotipo: Grupo europeo para la clasificación inmunológica de las leucemias (IGLL)
 - Mielocitos
 - Linfocitos
 - Monocitos
 - CD 33
 - CD 119
 - CD 117
 - CD 10
- Clasificación molecular: Alteraciones estructurales de los cromosomas

ACS. Early detection, diagnosis and types acute lymphocytic leukemia. 2018

Clasificación molecular

Se identifican alteraciones estructurales de los cromosomas

En la LLA las alteraciones estructurales se detectan en +60% de los casos



Translocaciones recíprocas: Ocurren cuando dos cromosomas no homólogos intercambian segmentos entre sí

Alteran la diferenciación y proliferación de células progenitoras

Detección molecular

El Gamble y Kabir O. Procesos moleculares implicados en la leucemia linfoblástica aguda de células B. 2017; Ramos M. et al. alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. An Esp Pediatr. 2001

ACTUALIZACIÓN DE LA CLASIFICACIÓN DE LA OMS

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las neoplasias mieloides y la leucemia aguda

La OMS toma en cuenta la importancia clínica de las alteraciones genéticas, por lo que realizó una clasificación de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides enumerando las siguientes entidades en la LLA

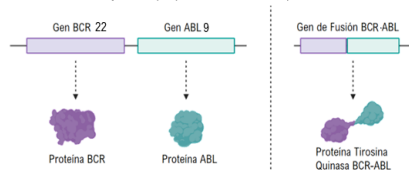
- Leucemia / linfoma linfoblástica B
- Leucemia / linfoma linfoblástica B con t (9; 22) (q34.1; q11.2); **BCR-ABL1**
- Leucemia / linfoma linfoblástica B con t (v; 11q23.3); **KMT2A**
- Leucemia / linfoma linfoblástica B con t (12; 21) (p13.2; q22.1); **ETV6-RUNX1**
- Leucemia / linfoma linfoblástica B con t (5; 14) (q31.1; q32.3) **IL3-IGH**
- Leucemia / linfoma linfoblástica B con t (1; 19) (q23; p13.3); **TCF3-PBX1**

WHO. The update who classification of hematological malignancies. 2016

Detección molecular: Cromosoma Philadelphia

El cromosoma Philadelphia (Ph+) fue la primera anomalía cromosómica asociada con una enfermedad maligna específica en humanos (1960)

Se forma un gen de fusión híbrido (**BCR-ABL**) que codifica para una proteína tirosina quinasa que provoca un trastorno proliferativo



Gen BCR 22 → Proteína BCR

Gen ABL 9 → Proteína ABL

Gen de Fusión BCR-ABL → Proteína Tirosina Quinasa BCR-ABL

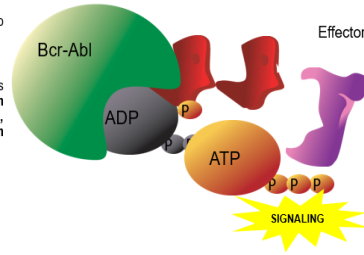
Este gen de fusión **BCR-ABL** está presente en la población pediátrica de 0 a 14 años con LLA alrededor del 3 al 5% y de 14 a 18 años en un 25%

Cairo G. et al. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia in childhood and targeted therapy. 2020

Mecanismo de acción de BCR-ABL

Supervivencia sin complicaciones a 5 años de 70 %

- El dominio quinasa, activa a una proteína sustrato por fosforilación
- El sustrato activado, inicia una cascada de reacciones que culminan en un aumento de la proliferación celular, capacidad de infiltración a otros tejidos, evasión de la apoptosis, inhibición de la reparación del ADN, entre otras



ADP = adenosin-difosfato; ATP = adenosin-trifosfato; P = fosfato

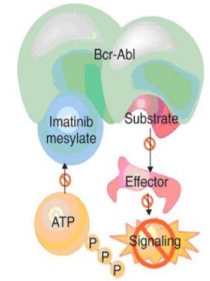
Savage and Antman. *N Engl J Med*. 2002;346:683. Schrijen and Griffin. *Oncogene*. 2002;21:3314.

Mecanismo de inhibición del imatinib

Supervivencia sin complicaciones a 5 años de 70 %

Gracias a la detección molecular

Inhibe la unión del ligando a la proteína tirosina quinasa BCR-ABL evitando la fosforilación del sustrato, impidiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis



El tratamiento específico: quimioterapia intensiva y mesilato de imatinib

ADP = adenosin-difosfato; ATP = adenosin-trifosfato; P = fosfato

Savage and Antman. *N Engl J Med*. 2002;346:683. Schrijen and Griffin. *Oncogene*. 2002;21:3314.

Detección del gen de fusión ETV6-RUNX1

Cocci M. y cols. 2015
Analizaron 874 pacientes con diagnóstico de LLA

Guerra F. y cols. 2016
Analizaron 91 pacientes con LLA
ETV6-RUNX1 (7.2%)

Cytogenetic and molecular findings	n	Frequency, %	Sex, M/F	Median age
t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1	75	8.2*	38/37	4 ys 5 mo
t(12;21)(p13;q22)/KMT2A	72	8.2	33/39	5 mo
t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1	42	4.8	19/23	4 mo
t(11;19)(q23;p13.3)/KMT2A-MLLT1	12	1.4	5/7	7 mo
t(9;11)(p22;q23)/KMT2A-MLLT3	9	1.0	4/5	5 mo
t(10;11)(p12;q23)/KMT2A-MLLT10	3	0.3	2/1	1 y 1 mo
t(1;11)(p32;q23)/KMT2A-EP305	1	0.1	0/1	6 mo
inv(11)(q13;q23)/KMT2A-RTBD18	1	0.1	1/0	9 mo
t(11;17)(q23;q21)/KMT2A-MLLT6	1	0.1	0/1	6 mo
t(11;22)(q23;q13)	1	0.1	0/1	7 mo
t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1	53	6.0	26/27	5 ys 5 mo
t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1	26	3.0	21/5	9 ys 4 mo

Datos globales a nivel mundial

- Prevalencia de ETV6-RUNX1 es del 7-18%
 - Mayor frecuencia en niños de 2 a 9 años
- Asociada a un **Buen pronóstico** con tratamiento adecuado

Mariño M. et al. Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina, 2015. PCR detection of relevant translocations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *BMS*, 2016.

Detección del gen de fusión MLL-AF4

Cocci M. y cols. 2015

Sánchez F. y cols. 2023
Analizaron 375 pacientes con LLA
MLL-AF4 en 0.53% (2)

Cytogenetic and molecular findings	n	Frequency, %	Sex, M/F	Median age
t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1	75	8.2*	38/37	4 ys 5 mo
t(12;21)(p13;q22)/KMT2A	72	8.2	33/39	5 mo
t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1	42	4.8	19/23	4 mo
t(11;19)(q23;p13.3)/KMT2A-MLLT1	12	1.4	5/7	7 mo
t(9;11)(p22;q23)/KMT2A-MLLT3	9	1.0	4/5	5 mo
t(10;11)(p12;q23)/KMT2A-MLLT10	3	0.3	2/1	1 y 1 mo
t(1;11)(p32;q23)/KMT2A-EP305	1	0.1	0/1	6 mo
inv(11)(q13;q23)/KMT2A-RTBD18	1	0.1	1/0	9 mo
t(11;17)(q23;q21)/KMT2A-MLLT6	1	0.1	0/1	6 mo
t(11;22)(q23;q13)	1	0.1	0/1	7 mo
t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1	53	6.0	26/27	5 ys 5 mo
t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1	26	3.0	21/5	9 ys 4 mo

Datos globales a nivel mundial

- Prevalencia de MLL-AF4 es del 1-2%
- Mayor frecuencia en niños menores de 1 año

Inicio repentino, progresión agresiva y pronóstico notoriamente precario

Mariño M. et al. Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina, 2015. Sánchez F. et al. Frequency of BCR-ABL, ETV6-RUNX1, MLL-AF4, and TEL-ABL1 fusion genes in B-cell acute lymphoblastic leukemia, 2023.

Genes de fusión en la Leucemia Linfoblástica Aguda

BCR-ABL p190

Frecuencia: 0 a 14 años 3-5%, 14 a 18 años 25%
Pronóstico: pobre
Tratamiento específico: M. imatinib

ETV6-RUNX1

Frecuencia: 2 a 9 años 7-18%
Pronóstico: favorable
Tratamiento específico: L-asparaginasa

MLL-AF4

Frecuencia: mayor en menores de 1 año, 1-2%
Pronóstico: pobre y aún peor en menores de 1 año
Tratamiento específico: intensivo con antineoplásicos



Ramos M. et al. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *An Esp Pediatr*. 2001

Justificación

- En México, la supervivencia de pacientes pediátricos con LLA es de **menos del 60%**, en contraste con **países desarrollados** donde la supervivencia de esta enfermedad es **arriba del 90%**. En la mayoría de los casos se debe a la **falta de acceso** a estudios moleculares
- La OMS destaca la importancia clínica de las alteraciones genéticas, en su clasificación de subtipos de LLA con translocaciones recurrentes se encuentran los genes de fusión **ETV6-RUNX1**, **BCR-ABL p190** y **MLL-AF4** para un abordaje rápido y eficaz del diagnóstico, detección de riesgo y tratamiento
- Se estima que **cerca del 85%** de los pacientes entre 1 a 18 años con LLA recién diagnosticada y con **regímenes terapéuticos adecuados** sobreviven a 5 años sin complicaciones, por lo que es de gran importancia el diagnóstico oportuno para guiar las decisiones terapéuticas más adecuadas y aumentar la supervivencia de los niños con esta patología

Hipótesis

Los pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, diagnosticados por citometría de flujo, presentarán alguno de los siguientes genes de fusión; *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL p190* y *MLL-AF4*, y estarán distribuidos según su inmunofenotipo y edad del paciente

Objetivo General

Realizar la detección molecular de los genes de fusión *BCR-ABL p190*, *ETV6-RUNX1* y *MLL-AF4* en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda.

Objetivos Específicos

- Determinar las características de los pacientes:
 - Demográficas: edad, sexo
 - Alteraciones Hematológicas
 - Inmunofenotipo
- Realizar la detección molecular de los genes de fusión:
 - BCR-ABL p190*
 - ETV6-RUNX1*
 - MLL-AF4*
- Evaluar la frecuencia de los genes de fusión según el inmunofenotipo de la leucemia.

18

19

Diseño del estudio

- Estudio piloto
- Estudio descriptivo observacional
- Selección y tipo de muestra: Aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA del Hospital central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

Registro en Comité: 23-19
Fecha de aprobación: 27 de marzo de 2019

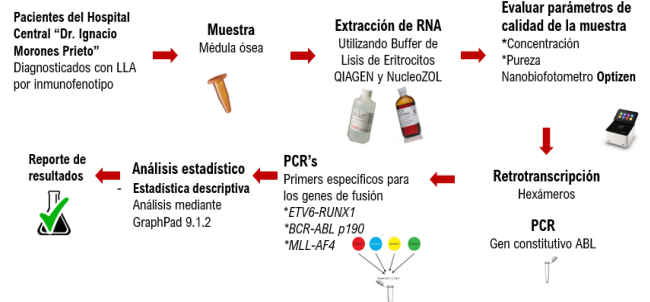
De inclusión	
Pacientes del HC Dr. Ignacio Morones Prieto	
Consentimiento informado	Firmado
Diagnóstico inicial	LLA por Inmunofenotipo
Tipo de muestra	Médula ósea

Criterios

De eliminación
Muestra no viable

20

Estrategia Metodológica



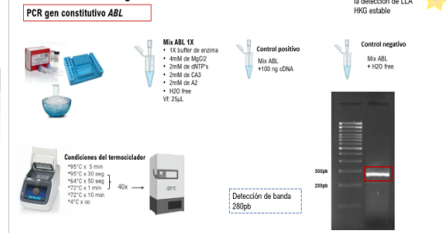
21

Juegos de primers *ABL*

Gen housekeeping *ABL*

Blanco	Secuencia
dBAS	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGG TTG G-3'
dB2	5'-TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T-3'

Detección molecular del gen control

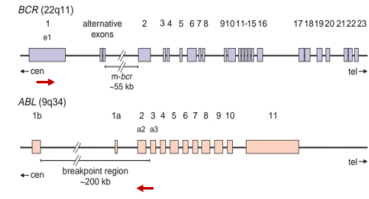


- ✓ La estabilidad de la expresión del gen housekeeping es un requisito para la normalización precisa de la expresión del gen objetivo en una PCR

22

Juegos de primers *BCR-ABL p190*

a



Frecuencia de la isoforma *e1a2* en LLA pediátrica >95%

Gen de fusión *BCR-ABL* PCR anidada

Blanco	Secuencia
dBNS1	5'-GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC A-3'
dBBL	5'-GGT ACC AGG AGT GTT TCT CCA CAG TG-3'
dBAS	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGG TTG G-3'
dB2A	5'-TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T-3'

J.M. van Doorn, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia of minimal residual disease. 1999

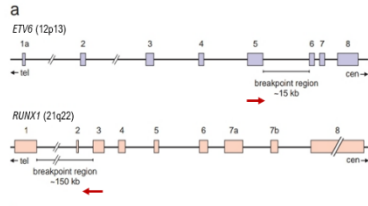
23

Juegos de primers *ETV6-RUNX1*

Gen de fusión *ETV6-RUNX1* PCR anidada

Blanco	Secuencia
TEL-A	5'-TGACCTCTGATCTGAGC-3'
AML1-B	5'-AACGCTCTGATCTCTGC-3'
TEL-C	5'-AAGCCCTCAACCTCTCTCATC-3'
AML1-D	5'-TGAAGCGCGCTGAGC-3'

Exones y regiones de punto de ruptura para *ETV6* Y *RUNX1*

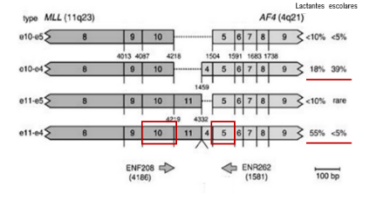


J.M. van Doorn, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia of minimal residual disease. 1999

Juegos de primers *MLL-AF4*

Gen de fusión *MLL-AF4* PCR anidada

Blanco	Secuencia
MLL (ENF207)	5'-CCCCAATGCCCTGTAACAACAAA-3'
AF4 (ENR262)	5'-GATGAGTCCACAGATCAGAGT-3'
MLL (ENF208)	5'-GAAAGGAACTGTGATGCTCA-3'

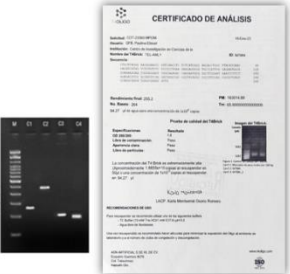


Comparten el Primer reverse que se une al exón 5 en *AF4*

J.M. van Doorn, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia of minimal residual disease. 1999

Controles positivos

- Se contaron con 3 controles positivos para este estudio
- ✓ Control positivo *BCR-ABL p190*
- ✓ Control sintético *ETV6-RUNX1*
- ✓ Control clonado en vector para *MLL-AF4*

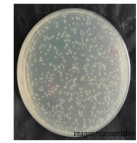
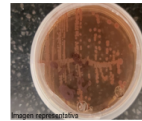


CERTIFICADO DE ANÁLISIS

Nombre del Gen: *MLL-AF4*
 ID: M7984-2
 Longitud: 837 pb
 Cantidad: ~3.2 µg
 Volumen para dilución: 20 µl de H₂O dd estéril (libre de nucleasas)
 Vector de clonación: pUC37
 Método de clonación: Digestión por encima SmaI

Transformación en células competentes y Clonación del plásmido con el gen *MLL-AF4*

- Se cultivaron células Top 10
- Se realizó la transformación de células competentes por choque térmico con el plásmido circular que contiene el gen *MLL-AF4*
- Se añadió medio LB caldo e incubó a 37°C por 16 a 24hrs
- Se inocularon placas con bacterias más antibiótico e incubó a 37°C por 16 a 24 horas
- Se realizó un cultivo con una colonia aislada
- Se formó un pellet el cual, una parte fue criopreservada a -80° + glicerol y a otra parte se le realizó extracción de ADN con el Kit QIAGEN Plasmid Mini



Resultados



Resultado. Características de los pacientes

N = 18

Tabla 1. Características demográficas

Edad	total	
8 meses -14 años	18	
Sexo	Femenino	Masculino
	22	4
	78	14



Pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí, S.L.P.

Características de los pacientes

c) Tabla de diagnóstico por inmunofenotipo

Inmunofenotipo	%	total
LLA pre-B	11	2
LLA pro-B	6	1
LLA B común	83	15

Diagnóstico por inmunofenotipo de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí. S.L.P.

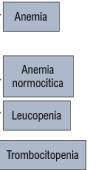
30

Características de los pacientes

b) Tabla de alteraciones hematológicas

	Valor alto	Valor de referencia	Valor bajo
Hemoglobina	-	12-17g/dl (19%)	(81%)
Hematocrito	-	35-52% (25%)	(75%)
Volumen Corpuscular Medio (VCM)	-	80-100 fl. (87%)	(13%)
Leucocitos	(19%)	4.80-10.80 x10 ⁹ /L (12%)	(69%)
Plaquetas	-	150 - 450 x10 ⁹ /L (25%)	(75%)

Laboratorios de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, San Luis Potosí. S.L.P.

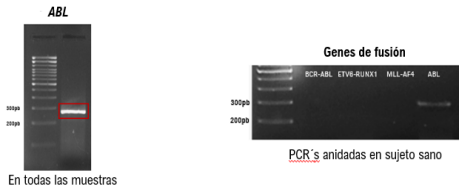


Alteración medular

Pediatría Integral. Anemias en la infancia y adolescencia. Clasificación y diagnóstico. Volumen XX, Junio 2016

31

ABL y controles probados en sujeto sano



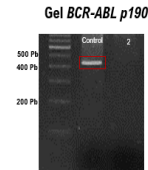
En todas las muestras

No a todos los pacientes se les realizó la detección de genes de fusión

- Cantidad de muestra
- Frecuencia de la translocación por edad
 - Tiempo de diagnóstico
 - Comorbilidades
 - Defunción

Imágenes representativas 32

Resultado. Detección molecular de los genes de fusión

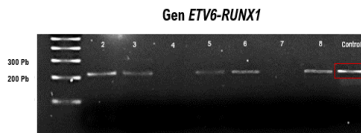


Resultado: negativo

Carril 1	Marcador de 100 Pb
Carril 2	Control +
Carril 3	Paciente 11
Carril 4	Paciente 12
Carril 5	Paciente 13
Carril 6	Paciente 14
Carril 7	Paciente 15
Carril 8	Paciente 16
Carril 9	Paciente 17
Carril 10	Paciente 18

Imágenes representativas 33

Resultado. Detección molecular de los genes de fusión

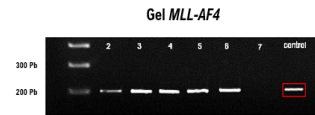


Resultado: 5 positivos

Carril 1	Marcador de 100 Pb
Carril 2	Paciente 2
Carril 3	Paciente 3
Carril 4	Paciente 4
Carril 5	Paciente 6
Carril 6	Paciente 13
Carril 7	Paciente 7
Carril 8	Paciente 9
Carril 9	Control +
	Paciente 5
	Paciente 10
	Paciente 17
	Paciente 6
	Paciente 11

Imágenes representativas 34

Resultado. Detección molecular de los genes de fusión



Resultado: 5 positivos

Carril 1	Marcador de 100 Pb
Carril 2	Paciente 1
Carril 3	Paciente 3
Carril 4	Paciente 9
Carril 5	Paciente 12
Carril 6	Paciente 13
Carril 7	Paciente 8
Carril 8	Control +

Imágenes representativas 35

Traslocaciones probadas

Diagnóstico	Edad	BCR-ABL p190	ETV6-RUNX1	MLL-AF4
Traslocaciones probadas				
LLA común	8 meses	-	P	P
LLA común	2 años	-	P	-
LLA pro-B	3 años	-	P	P
LLA común	3 años	-	N	-
LLA común	4 años	-	N	-
LLA común	5 años	-	P	-
LLA común	6 años	-	N	-
LLA pre-B	7 años	-	-	N
LLA común	7 años	-	N	P
LLA común	9 años	-	N	-
LLA común	11 años	N	N	-
LLA común	12 años	N	-	P
LLA común	12 años	N	P	P
LLA común	12 años	N	P	-
LLA común	13 años	N	-	-
LLA común	14 años	N	-	-
LLA pre-B	14 años	N	N	-
LLA común	14 años	N	-	-

20% de pacientes positivos para 2 genes de fusión

14% de defunciones

Distribución de frecuencia de los genes de fusión según el inmunofenotipo de la leucemia

Se realizó una prueba de significancia (prueba exacta de Fisher) y no se encontró una relación entre el inmunofenotipo de la LLA y la presencia específica de una translocación

"-" NO realizado, "P" resultado positivo y "N" resultado negativo

Discusión

González A. y Col. 2021

- LLA B-Común se presentó en 71.60%, subtipo Pre-B en 21.60% y el subtipo Pro-B en 2.37% de los pacientes

En nuestro estudio, LLA B-Común se presentó en 83%, subtipo Pre-B en 11% y el subtipo Pro-B en 6% de los pacientes

Devi S, et al. Estudio retrospectivo de la leucemia linfoblástica B para evaluar la prevalencia de TELJAML1. Indian J Med Paediatr Oncol [Engpatidou M, et al. ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis. 2018]

Discusión

Devi G y Col. 2022 ETV6-RUNX1 es una anomalía común en la LLA de células B

De 125 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de células B
El 13.6% resultó positivo para el gen de fusión ETV6-RUNX1 (18 pacientes)
Edad media en la que se presentó: 5 años
M: 17 F: 1

En nuestro estudio, de 12 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de células B
El 42% resultó positivo para el gen de fusión ETV6-RUNX1 (5 pacientes)
Edad media en la que se presentó: 7 años
M: 4 F: 1

Devi S, et al. Estudio retrospectivo de la leucemia linfoblástica B para evaluar la prevalencia de TELJAML1. Indian J Med Paediatr Oncol [Engpatidou M, et al. ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): The spectrum of clonal heterogeneity and its impact on prognosis. 2018]

Discusión

Juárez G. y Col. 2020

De 154 pacientes con diagnóstico de LLA B
H: 47%, M: 53%

Gen de fusión	Número de pacientes	Porcentaje
BCR-ABL	6	20.7%
MLL-AF4	5	17.2%
ETV6-RUNX1	2	6.9%

Nuestro estudio: BCR-ABL 0 de 8, MLL-AF4 5 (8.3%), ETV6-RUNX1 5 (42%)

Para la detección del gen de fusión BCR-ABL, si la población de nuestro estudio estuviera conformada por pacientes > de 14 años, probablemente encontraríamos la presencia de este gen de fusión

Edad	Sexo
6 años	M
9 años	M
7 años	F
11 años	M
3 años	M
13 años	M
12 años	M
5 años	M
7 años	F
2 años	M
4 años	M
8 meses	M
3 años	M
14 años	F
14 años	M
12 años	M
14 años	M
12 años	F

Juárez G. et al. Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias From Oaxaca, Mexico.

Conclusión

En este estudio se logró estandarizar, la metodología para la detección molecular de los genes de fusión BCR-ABL p190, ETV6-RUNX1 y MLL-AF4 en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA. El 44% de los pacientes, a los que se les probó alguna translocación, presentaron algún gen de fusión de los ya mencionados, sin embargo, no fue posible determinar la relación entre el diagnóstico por inmunofenotipo y la presencia específica de alguna translocación, debido a la pequeña cantidad de muestra recibida para el presente estudio

A pesar de ello, este estudio pone en evidencia que la implementación de la detección de genes de fusión en la población pediátrica puede mejorar la estratificación del riesgo y pronóstico, permitiendo una adecuada elección terapéutica que ayude a mejorar la calidad de vida de los pacientes

Perspectivas a futuro ...

Implementar el diagnóstico molecular para la detección de genes de fusión en pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de hospitales de segundo y tercer nivel de atención en San Luis Potosí, para la estratificación del riesgo, tratamiento dirigido y oportuno que aumente la sobrevivencia de los mismos

Agradecimientos especiales

Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto
Dra. Lourdes Cecilia Correa González
Dr. Oscar de Jesús Pérez Ramírez

Hospital De Especialidades Médicas Centro Médico Nacional La RAZA
Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

Sinodales
Dr. Christian García Sepúlveda
Dr. Sofía Bernal Silva
Dr. Roberto González Amaro

¡Gracias!

¡Gracias a mi equipo de trabajo, amigos y compañeros que me brindaron su apoyo y conocimientos!

Se recibieron líneas celulares para utilizarlas como controles positivos del Hospital De Especialidades Médicas Centro Médico Nacional la RAZA, Ciudad de México, CDMX,

Línea celular REH (ETV6-RUNX1)

Morfología linfoblástica aisladas del tejido de paciente con LLA + para GF

- Crecimiento en suspensión, medio RPMI-1640 + SBF 10% + 1% penicilina/estreptomicina
- Incubación a 37°C con un 5% de CO₂

