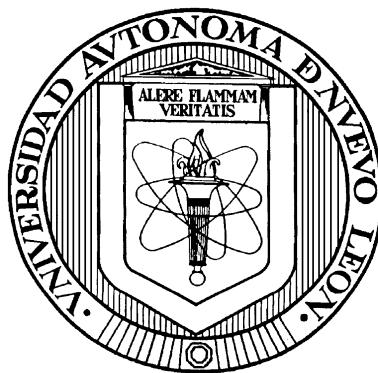


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Evaluación del uso de microarreglos genómicos como
herramienta de apoyo para determinar el pronóstico en
pacientes con LMA**

Por

QFB. Geovana Calvo Anguiano

Como requisito parcial para obtener el Grado de

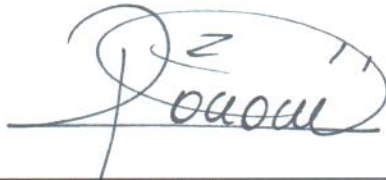
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en

Biología Molecular e Ingeniería Genética

J u l i o, 2013

“Evaluación del uso de microarreglos genómicos como herramienta de apoyo para determinar el pronóstico en pacientes con LMA”.

Aprobación de la Tesis:



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Director de Tesis



DR. C. CARLOS CÓRDOVA FLETES
Co-Director de Tesis



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Miembro de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Diagnostico Molecular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Durante estos dos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado.

En primer lugar quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada.

A la Dra. Rocío Ortiz López, al Dr. Carlos Córdova Fletes y al Dr. Augusto Rojas Martínez por su valiosa asesoría y sus comentarios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Herminia Martínez, por su apoyo en todo momento.

A todo el personal del **Servicio de Hematología del Hospital Universitario** “Dr. José Eleuterio González” de la UANL; principalmente al Q. Carlos Cancela, a la MC. Leslie López, a la MC. Sandra Mendoza y a la Q. Rosario Salazar que colaboraron para la realización de la presente tesis.

A todo el personal y compañeros del departamento de **Bioquímica y Medicina Molecular**.

A mis compañeros de generación: Liz, Kame, Alex, Mariel, Paola, Erick, Yessi y Carlos, gracias por todos los momentos que pasamos juntos.

A todos mis compañeros del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (**CIDICS**).

“Nunca dejes de crecer ni de florecer, la vida tiene sus estaciones y tu debes de estar listo para salir de cada una de ellas”

José L. Faria V.

DEDICATORIA

Primeramente a mi mamá (Guille), por darme vida, cariño y apoyo incondicional.

A mis hermanos y sobrinos, por su apoyo y cariño; nunca los olvido siempre están presentes.

A la Familia Lugo-Trampe, por su apoyo, cariño y confianza; gracias por todos sus consejos.

Especialmente a ti José, por estar conmigo siempre, por todo tu apoyo y paciencia y por no dejarme vencer.

ÍNDICE

	Página
Lista de tablas	i
Lista de figuras	ii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
1. Introducción	1
1.1 Epidemiología de la LMA	2
1.2 Etio-patogénesis de la LMA	3
1.3 Clasificación de la LMA	4
1.4 Citogenómica y Biología molecular de la LMA	6
1.5 El gen <i>FLT3</i>	8
1.6 El gen <i>NRAS</i>	10
1.7 El gen <i>KIT</i>	11
1.8 El gen <i>NPM1</i>	12
1.9 El gen <i>C/EBPα</i>	13
1.10 Diagnóstico y pronóstico	14
1.10.1 Cariotipo	14
1.10.2 Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia (FISH)	15
1.10.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	16
1.10.4 Arreglos de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)	16

2. Justificación	18
3. Objetivos	
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. Material y Métodos	
4.1 Estrategia Experimental	20
4.2 Tipo de estudio	20
4.3 Población de estudio	21
4.3.1 Criterios de inclusión	21
4.3.2 Criterios de no inclusión	22
4.3.3 Criterios de eliminación	22
4.4 Reactivos	22
4.5 Equipo utilizado	23
4.6 Programas	23
4.7 Diseño de los iniciadores	24
4.8 Generación de controles	24
4.9 Procesamiento de las muestras	24
4.9.1 Análisis de fragmentos	
4.9.1.1 Metodología para la detección de las mutaciones en el gen <i>FLT3</i>	27
4.9.1.2 Metodología para la detección de las mutaciones en el gen <i>NPM1</i>	28
4.9.2 Discriminación alélica	
4.9.2.1 Metodología para la detección de las mutaciones en el gen <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	30

4.9.3 Arreglos de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)	31
5.9.3.1 Análisis	33
5. Resultados	
5.1 Descripción de la población	35
5.2 Resultados objetivo 1	
5.2.1 Comprobación de la generación de controles positivos	37
5.2.2 Análisis de fragmentos	
5.2.2.1 Mutaciones en el gen <i>NPM1</i>	38
5.2.2.2 Mutaciones en el gen <i>FLT3</i>	40
5.2.3 Discriminación alélica	42
5.2.4 Hallazgos en el aCGH	45
5.2.5 Análisis de vías	48
5.2.6 Asociación de resultados	49
6. Discusión	52
7. Conclusiones	56
8. Perspectivas	57
9. Anexos	58
Anexo 1	59
Anexo 2	70
10. Bibliografía	71

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Subtipos de LMA según Clasificación FAB.	4
Tabla 2. Grupos pronósticos con respecto al tratamiento según la OMS.	5
Tabla 3. Principales alteraciones citogenéticas/moleculares que se presentan en la LMA.	6
Tabla 4. Características de las mutaciones incluidas en este trabajo.	25
Tabla 5. Tabla de los iniciadores utilizados para cada una de las mutaciones tamizadas	26
Tabla 6. Características de la población incluida en el estudio.	35
Tabla 7. Características de concentración y pureza de algunas muestras analizadas.	36
Tabla 8. Vías afectadas en genes alterados en el número de copias.	48
Tabla 9. Características clínicas y hallazgos en el aCGH.	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelo hipotético de los tipos de mutaciones que ocurren en la LMA.	8
Figura 2. Representación gráfica de los dominios de la proteína FLT3.	9
Figura 3. Representación esquemática de la proteína FLT3.	10
Figura 4. Representación esquemática de la proteína NRAS.	11
Figura 5. Representación esquemática de la proteína KIT.	12
Figura 6. Representación esquemática de la proteína NPM1.	13
Figura 7. Representación esquemática de la proteína C/EBP α .	14
Figura 8. Estrategia General.	20
Figura 9. Diagrama del diseño de la estrategia de la generación de los controles.	25
Figura 10. Datos de las sondas incluidas en el chip.	34
Figura 11. Gel de agarosa al 1% para verificar integridad de las muestras de ADN.	37
Figura 12. Secuenciación de controles positivos.	37
Figura 13. Electroferograma de muestras analizadas con el software genemaper.	39
Figura 14. Gráfica de frecuencia de mutaciones en el gen NPM1.	39
Figura 15. Gráfica de frecuencia de mutaciones en el gen FLT3	40
Figura 16. Electroferograma de muestras analizadas con el software genemaper.	41
Figura 17. Secuenciación de la mutación D835Y.	42
Figura 18. Tabla de discriminación alélica IDH1 (R132C [C>T]).	43
Figura 19. Tabla de discriminación alélica IDH1 (R132H [C>T]).	43
Figura 20. Tabla de discriminación alélica IDH2 (R140Q G>T).	44

Figura 21. Gráfica de frecuencias para las mutaciones en los genes <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> .	44
Figura 22. Ideograma obtenido del análisis con el software Nexus.	46
Figura 23. Gráfica de logaritmo base2.	47
Figura 24. Alteraciones encontradas en los pacientes analizados con microarreglos de aCGH.	47
Figura 25. Gráfica de interacción proteína-proteína.	49
Figura 26. Gráfica de combinación de mutaciones.	50

ABREVIATURAS

.GFF	Gene-Finding Format
aCGH	Hibridación Genómica Comparativa en arreglo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C/EBPA	CCAAT/Enhancer binding protein alpha
CMH	Célula hematopoyética
CNA	Alteraciones en el número de copias
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
FAB	Franco-Americano-Británico
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia
FLT3	FMS-relacionado a tirosin cinasa tipo 3
FLT3-IDT	FMS-relacionado a tirosin cinasa tipo 3-Duplicación Interna en Tandem
KIT	Oncogén homólogo v-kit Hardy-Zuckerman 4 sarcoma viral felino
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMAs	Leucemia Mieloide Aguda secundaria
LMC	Leucemia mieloide crónica
Mb	Mega bases
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
NPM1	Nucleofosmina (fosfoproteína nucleolar B23)
NRAS	Neuroblastoma RAS viral
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
pM	Picomolar
REENM	Registro Epidemiológico de Neoplasias Malignas
RTK	Receptor Tyrosine kinase
SMD	Síndrome Mieloproliferativo
STC	Sample Tracking control (por sus siglas en inglés)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar

RESUMEN

Geovana Calvo Anguiano

Fecha de Graduación: Julio, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: "Evaluación del uso de microarreglos genómicos como herramienta de apoyo para determinar el pronóstico en pacientes con LMA"

Número de páginas: 88

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Diagnóstico Molecular

Propósito y Método del Estudio: La leucemia mieloide aguda (LMA) es un trastorno clonal causado por la transformación maligna de las células derivadas de la médula ósea. La LMA representa un grupo heterogéneo de desordenes con anormalidades genéticas variables y de respuesta variable al tratamiento.¹ Ciertos cambios cromosómicos estructurales (e.g. presencia de las traslocaciones 8;21 y 15;17) y numéricos (presencia de monosomías 5 y 7) se han asociado a un pronóstico favorable o desfavorable, respectivamente.² De la misma manera, mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1* y *C/EBP α* han demostrado tener una gran importancia pronóstica.^{3,4} No obstante en ausencia de los marcadores comunes de pronóstico desfavorable en pacientes con un fenotipo clínico agresivo, se requiere de la identificación de marcadores alternativos para explicar dicho fenotipo clínico. Actualmente, abordajes genómicos más sensibles con microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) son usados para identificar cambios genéticos asociados a la patogénesis del cáncer. Eventualmente, ciertos de estos cambios podrían incluir genes asociados con un pronóstico favorable o desfavorable para los pacientes y permitirá incluir a los aCGH como un método pronóstico en nuestra población. En este estudio se implementó el uso de microarreglos genómicos en 31 pacientes con LMA para determinar el pronóstico en pacientes con LMA.

Contribuciones y Conclusiones: Se diseñó, desarrolló e implementó una metodología para la detección de 8 mutaciones de 4 genes diferentes. Se obtuvo la frecuencia de las mutaciones tamizadas; En el análisis de aCGH se encontraron principalmente regiones deletadas en todos los pacientes analizados; en 11 pacientes no se encontró ninguna de las mutaciones tamizadas mientras que en el microarreglo se encontraron regiones deletadas que incluían genes relacionados a cáncer, aberraciones cromosómicas, malignidades hematopoyéticas y LMA; los cromosomas que presentaron más anomalías fueron el 5 y 7. Se determinaron las regiones mínimas comunes que comparten 14 de nuestros pacientes en los cuales se encuentran genes que participan directa o indirectamente en cáncer, vías de señalización como MAPK, JAK-STAT, p53, proliferación, supervivencia y apoptosis y LMA. Se realizó un análisis personalizado para cada uno de los pacientes con lo que observamos cambios significativos importantes lo que podría explicar la evolución favorable/desfavorable de la LMA.

Firma del director:

Dra. C. Rocío Ortiz López

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones mieloides son originadas en células precursoras pluripotenciales que normalmente forman eritrocitos, neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y plaquetas. Interrupciones en la maduración mieloide resultan en trastornos hematológicos como leucemia mieloide aguda (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) y leucemia mieloide crónica (LMC).² La LMA se origina por la transformación neoplásica de una célula madre y se caracteriza por la acumulación de blastos en médula ósea. Dicha acumulación conduce a una producción disminuida de eritrocitos, granulocitos y plaquetas con las consecuentes manifestaciones clínicas de anemia, infección y hemorragia.⁵

En términos generales la LMA describe un grupo heterogéneo de desordenes clonales de células progenitoras hematopoyéticas, cuya falta de diferenciación y proliferación excesiva y falta de diferenciación resulta en la acumulación de células no funcionales denominadas mieloblastos, con un espectro de características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares similares entre si.⁶

La LMA se puede presentar como un proceso de novo o como un proceso secundario cuando existen antecedentes de síndrome mielodisplásico (SMD), exposición a agentes leucemogénicos o por tratamientos con capacidad leucemogénica, principalmente fármacos alquilantes e inhibidores de la



topoisomerasa II.^{7,8} Sin embargo, generalmente la causa específica de la LMA en cualquier paciente individual es desconocida.⁹

1. Epidemiología de LMA

La LMA representa alrededor del 25% de los tipos de leucemias que afectan a niños y adultos.¹⁰ La LMA es el tipo de leucemia predominante en el periodo neonatal, en tanto que en la niñez y la adolescencia solo cuenta una pequeña proporción de casos. La LMA explica para el 15-20% de las leucemias agudas en niños y 80% de las leucemias agudas en adultos.² La incidencia mundial estimada de LMA es de 3-4 casos por cada 100,000 habitantes al año aumentado con la edad; así la incidencia de LMA en adultos mayores de 60 años es de 10 casos por cada 100,000 habitantes al año.¹¹

En México, se tienen pocos reportes sobre la incidencia de la LMA y solo hay reportes generales, sin especificar el tipo de leucemia, sobre una incidencia de 0.7 casos por cada 100,000 habitantes al año. Según el registro epidemiológico de neoplasias malignas (REENM) los estados que presentan una mayor incidencia son: Baja California, Tabasco, Tlaxcala, Distrito Federal, Puebla, Nayarit, Yucatán, Michoacán, Jalisco y Colima con una incidencia general >3.5 casos por cada 100,000 habitantes al año.¹²

1.2 Etio-patogénesis de la LMA

Al igual que en otras leucemias agudas como la leucemia linfoblástica, los hallazgos citogenéticos en células de LMA han permitido identificar genes importantes en la patogénesis de LMA. Mutaciones somáticas en el 80% de éstos pacientes resultan de traslocaciones cromosómicas que afectan una región crítica de proto-oncogenes; el producto aberrante de ésta alteración interrumpe vías que regulan la diferenciación, el crecimiento o supervivencia de progenitores de células sanguíneas.² Las traslocaciones más prevalentes en LMA incluyen la t(8;21)(q22;q22) afectando los genes *AML1/ETO*, la t(15;17)(q31;q22) afectando los genes *PML/RAR α* , la t(9;11)(p22;q23) afectando los genes *MLL/AF9* y la t(9;22)(q34;q22) afectando los genes *BCR/ABL1* (tabla 3). En ciertos casos, monosomías parciales o completas de algunos cromosomas (i.e. cromosoma 5 ó 7) o ganancias de cromosomas como el 4, 8 o 13 son las principales anomalías citogenéticas observadas, aunque en las últimas no se ha definido completamente su participación. Asimismo, es interesante mencionar que pacientes con las traslocaciones 8;21 y 15;17 tienen un pronóstico más favorable; en contraste, portadores de monosomías afectando los cromosomas 5 ó 7 tienen los pronósticos menos favorables (tabla 2).² En general, aproximadamente el 80% de los casos de LMA presentan alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales conspicuas, mientras que el resto de los pacientes se reportan con un cariotipo normal. En la tabla 3, se muestran las principales alteraciones citogenéticas y moleculares presentes en la LMA.¹³



1.3 Clasificación de la LMA

La LMA puede clasificarse a través de características, morfológicas, citogenéticas y por marcadores de superficie. Existen dos grandes grupos de clasificación, el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) y la clasificación según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El grupo FAB propuso la primera clasificación de la LMA en 1976 basándose en las características morfológicas y citoquímicas (tabla 1) con la finalidad de realizar comparaciones entre instituciones o ensayos clínicos. Sin embargo, esto es solo de utilidad en pacientes de recién diagnóstico.¹⁴

Subtipo FAB	Nombre
M0	LMA con diferenciación mínima
M1	LMA sin maduración
M2	LMA con maduración
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4Eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacariocítica aguda

Tabla 1. Subtipos de LMA según clasificación FAB.

En 2005, la OMS retoma la clasificación FAB incorporando e interrelacionando las características citogenéticas y anormalidades moleculares dando con esto 3 grupos pronósticos con respecto al tratamiento (tabla 2), actualmente la de mayor importancia.¹ Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales que reaccionan con los antígenos de superficie han sido utilizados para clasificar la LMA. Se considera que el verdadero valor de estos antígenos está en que definen un fenotipo leucémico que puede ser usado en la detección de la enfermedad residual mínima.¹⁴

Factores pronósticos en LMA	Citogenética	Anormalidades moleculares
Pronóstico favorable	<ul style="list-style-type: none"> • t(8; 21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1 • inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q22) CBFB-MYH11 • t(15;17) PML-RARA 	Mutación <i>NPM1</i> Mutación <i>C/EBPA</i>
Pronóstico intermedio	<ul style="list-style-type: none"> • Cariotipo normal • Trisomía 8 • t(9;11) AF9-MLL 	Mutación <i>KIT</i> con t(8;21) o inv(16)
Pronóstico desfavorable	<ul style="list-style-type: none"> • Cariotipo complejo • Monosomía de 5 y 7 ó del(5q) o del(7q) • inv(3)(q21;q26) • (11q23) MLL • t(9;11) AF9-MLL 	mutación FLT3-IDT (<i>NPM1</i> ausente) Mutación TET2 Expresión del gene WT1

Tabla 2. Grupos pronósticos con respecto al tratamiento según la OMS

Alteración citogenética	Subtipo FAB	Genes de fusión
t(8;21)(q22;q22)	M2	AML1/ETO
Inv(16)(p13q22)	M4eo	CBFβ/MYH11
t(15;17)(q21;q11)	M3	PML-RAR
Otras variantes que involucran 17q11	M3	PLZF-RAR PM-RAR NuMA-RAR
Alteraciones de 11q23 y sus variantes		MLL
t(4;11)(q21;q23)		MLL/AF4 MLL/AF9 MLL/ELL MLL/ENL
t(9;11)(p22;q23), t(11;19)(q23;p13.1), t(11;19)(q23;p13.3)	M4, M5	
t(6;9)(p23;q34)	M2	DEK/CAN
t(3;3)(q21;q26)	-	Ribophorin/EV11
Monosomía del cromosoma 5/del(5q)	M6	-
Monosomía del cromosoma 7/del(7q)	M6	-

Tabla 3. Principales alteraciones citogenéticas/moleculares que se presentan en la LMA.

1.4 Citogenómica y biología molecular de la LMA

Actualmente, las herramientas genómico-moleculares son una pieza fundamental para detectar reordenamientos génicos/genómicos en LMA, ya que son más sensibles y representan una superior resolución que la proporcionada por citogenética convencional.³

En particular, el advenimiento de la tecnología de arreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) ha mejorado sustancialmente la detección de

desequilibrios genómicos en cáncer, lo que permite la identificación de nuevos genes candidatos. Recientemente los aCGH han permitido la identificación de alteraciones crípticas en el número de copias (CNA) génicas en pacientes con LMA con cariotipos complejos, con anomalías cromosómicas conocidas y en el 15-16% de los casos de adultos con cariotipos normales. Estas anormalidades consisten en pequeñas ganancias o pérdidas de material genómico que varían en tamaño (desde 0.2 hasta 4.1 Mb), siendo las pérdidas más comunes que las ganancias.¹⁵

Vale la pena notar que las LMA con cariotipos normales en adultos representan el subgrupo más grande y heterogéneo con respecto a la evolución de la enfermedad y no todos los pacientes de este subgrupo tienen la misma respuesta al tratamiento.¹⁵

Recientemente, un grupo de marcadores moleculares se han asociado al pronóstico de la LMA.¹⁶ Mutaciones en diversos genes afectados en esta alteración hematológica parecen caer en dos grupos de complementación ampliamente definidos. El primer grupo (clase I) comprende las mutaciones que activan las vías de transducción de señales y con ello aumenta la proliferación o supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas. El otro grupo (clase II) comprende mutaciones que afectan los factores de transcripción o componentes de la maquinaria del ciclo celular y causa deterioro en la diferenciación (figura 1).¹⁷

Las mutaciones clase I generalmente conducen a la activación de los genes *FLT3*, *c-KIT* y en la misma vía de señalización a *RAS*, *MYC*, *MPL*, *KIT*, *p53*, *RB*, *WT1* entre otros.¹⁸ Mientras que las mutaciones de clase II incluyen a las aberraciones cromosómicas recurrentes como *t(8;21)*, *inv(16)* y *t(15;17)*, además de mutaciones de los factores de transcripción *RUNX1*, *C/EBP α* y *MLL*.¹⁸

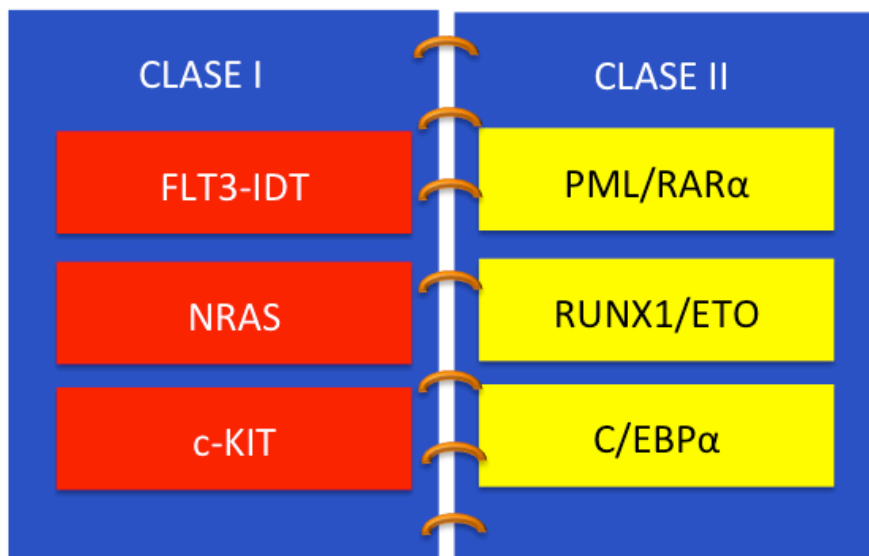


Figura 1. Modelo hipotético de los tipos de mutaciones que ocurren en la LMA.

1.5 El gen *FLT3*

El gen *FLT3* (fms-related tyrosine kinase 3), el cual desempeña un papel fundamental en la hematopoyesis, se localiza en el cromosoma 13 (13q12) contiene 24 exones¹⁹ (figura 2), codifican para una proteína de 993 aminoácidos. La proteína FLT3 contiene un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio de yuxtamembrana y un dominio de tirosina cinasa (figura 3).²⁰

El dominio cinasa está interrumpido por una secuencia hidrófoba corta; esta característica permite categorizar a FLT3 en el grupo de los receptores tirosin-kinasa (RKT por sus siglas en inglés) que comparten dicha característica estructural: KIT, FMS, PDGF-R (alfa y beta), y los receptores de VEGF.²¹

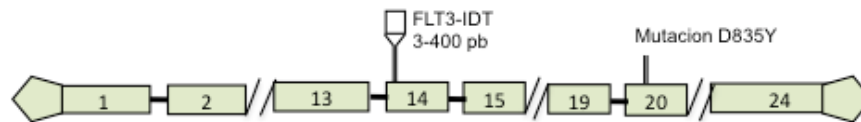


Figura 2. Representación gráfica del gen *FLT3*, indicando el exón donde ocurren las mutaciones.

El dominio de yuxtamembrana de FLT3, como muchos otros receptores, ejerce una influencia reguladora negativa de la actividad tirosina quinasa; por lo tanto, las mutaciones en esa región suelen interrumpir sus funciones reguladoras negativas y justo en este dominio cae la mutación más común e importante del gen *FLT3*, la duplicación interna en tándem (FLT3-ITD). Ciertos tipos de mutaciones del gen *FLT3* causan formas constitutivamente activadas del receptor, las cuales se han observado en un número significativo de pacientes con LMA.²²

La mutación FLT3-IDT es una inserción de 3 a 400 pb que ocurre en múltiplos de 3, lo que permite que el marco de lectura se mantenga; usualmente se

presenta en el exon 14, cerca de la secuencia que codifica para los aminoácidos 590-600 de la proteína.²³

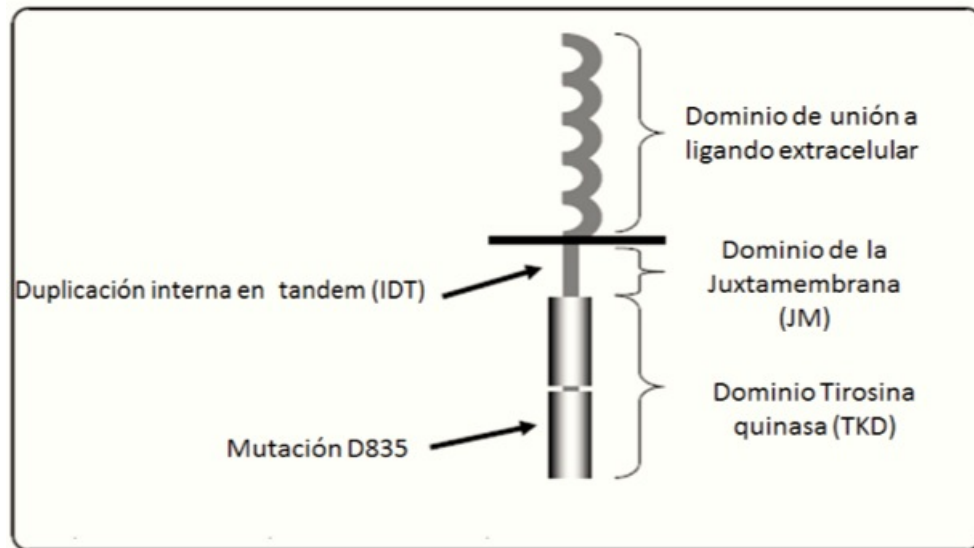


Figura 3. Representación gráfica de los dominios de la proteína FLT3.

1.6 El gen *NRAS*

El oncogén *NRAS* (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene), se localiza en el cromosoma 1 (1p13.2) y está constituido por 7 exones que codifican para una proteína de 189 aminoácidos.¹⁹ La proteína *NRAS* pertenece a la familia *RAS* que son proteínas que regulan la transducción de señales mediante la unión a una variedad de receptores de membrana, incluyendo *KIT* y *FLT3*, desempeñan un papel importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis (figura 4). los genes *RAS*, especialmente *NRAS*, son frecuentemente afectados por mutaciones en la LMA.⁴

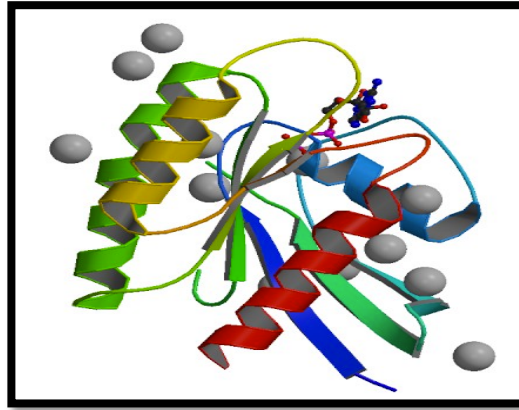


Figura 4. Representación esquemática de la proteína NRAS.

1.7 El gen *KIT*

El gen *KIT* (*v-kit* Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral) se localiza en el cromosoma 4 (4q12) y está constituido por 21 exones, que codifican para una proteína de 976 aminoácidos.¹⁹ La proteína KIT pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa (RKT) (figura 5). Esta proteína se encuentra en la membrana celular de ciertos tipos de células en donde se une a una proteína específica, llamada factor de células madre. La proteína KIT activa a otras proteínas dentro de la célula, conduciendo a la activación de una serie de proteínas en múltiples vías de señalización.²⁴ Las vías de señalización estimuladas por la proteína KIT, controlan muchos procesos celulares importantes como el crecimiento celular, la proliferación celular, la supervivencia y el movimiento (migración).²⁵

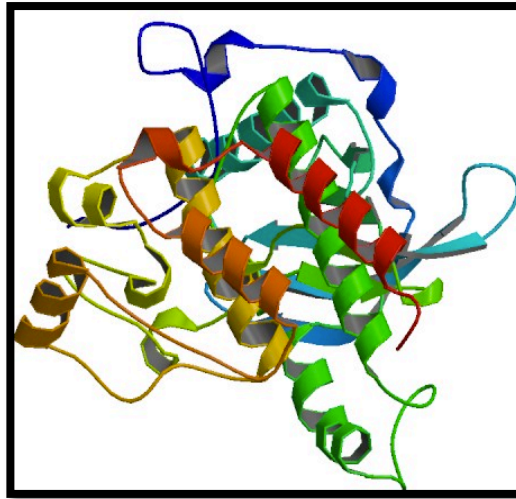


Figura 5. Representación esquemática de la proteína KIT.

1.8 El gen *NPM1*

El gen *NPM1* (localizado en 5q35.1), contiene 11 exones y codifica para una proteína de 294 aminoácidos.¹⁹ La proteína se mueve del núcleo al citoplasma, aunque se localiza principalmente en el núcleo; desempeña un papel importante en diversas funciones celulares: interactúa con p53 en el control de la proliferación celular y apoptosis (figura 6), está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad genómica controlando la reparación del ADN y la duplicación del centrosoma durante la mitosis. Además, desempeña un papel importante en la biogénesis de los ribosomas y la respuesta a estímulos de estrés. Las mutaciones en el gen *NPM1* son las anomalías genéticas más comunes en LMA, ya que se presenta en el 50-60% de los pacientes con LMA con cariotipo normal.²⁶

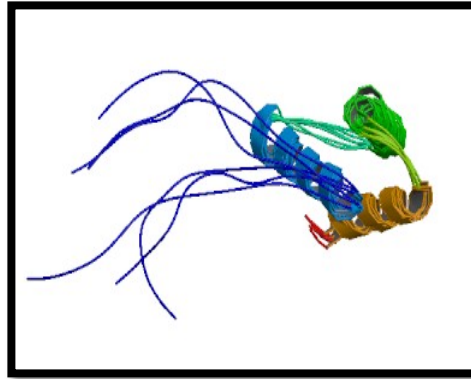


Figura 6. Representación esquemática de la proteína NPM1.

1.9 El gen *C/EBP α*

El gen *C/EBP α* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) el cual carece de intrones, está localizado en el cromosoma 19 (19q13.11)¹⁹ y codifica para un factor de transcripción de la diferenciación granulocítica importante en la regulación de los progenitores mieloides (figura 7).²⁴ Este factor de transcripción implicado en la hematopoyesis normal, está sujeto a mutaciones en ~10% de los pacientes con LMA, siendo más frecuente en pacientes con cariotipo normal. Las mutaciones implican comúnmente la región amino terminal y conducen a la expresión de una proteína trunca, o se producen en el extremo carboxilo terminal, alterando las regiones requeridas para la dimerización y/o unión al ADN. En una proporción significativa de los pacientes con LMA, las mutaciones en *C/EBP α* implican a ambos alelos.²⁷ Varios estudios sugieren que las mutaciones de *C/EBP α* podrían predecir un resultado relativamente

favorable en la LMA; de hecho, en estudios de cohortes grandes se sugiere que este efecto se relaciona con el grupo de mutaciones bialélicas, que tienden a tener un cariotipo normal y no presentan la mutación de FLT3-IDT.²⁸

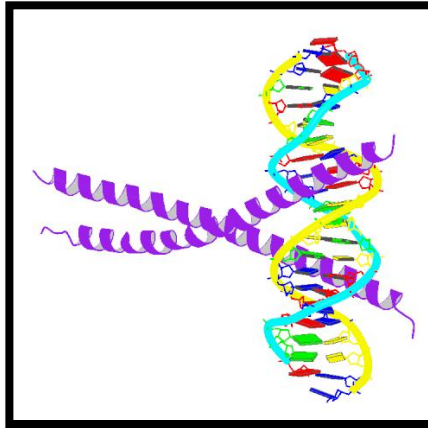


Figura 7. Representación esquemática de la proteína C/EBPA

1.10 Diagnóstico y pronóstico

Actualmente, existen diversas técnicas con las que se realiza el diagnóstico para LMA, como por ejemplo el cariotipo, FISH, PCR y microarreglos de expresión y genotipificación, ya que la detección oportuna de cierta anomalía o alteración cromosómica será de suma importancia clínica, en particular con respecto al tratamiento a seguir.³

1.10.1 Cariotipo

El análisis por cariotipo permite observar alteraciones numéricas o estructurales tales como traslocaciones, deleciones y duplicaciones, las cuales están presentes en casi la mitad de todos los pacientes con LMA.

Los resultados se interpretan en el contexto de las características clínicas e histopatológicas del paciente para ayudar a diagnosticar y clasificar a la LMA. Por ejemplo, la presencia de un cariotipo complejo, el cual por lo general involucra tres o más anormalidades cromosómicas, predice un mal pronóstico en niños y adultos, incluidos aquellos pacientes mayores de 60 años.²⁹

El cariotipo se recomienda a todos los pacientes que se sospeche de LMA para su apropiado diagnóstico y clasificación. Sin embargo, para el análisis completo de un cariotipo se necesita de un mínimo de 20 células en metafase, lo cual requiere de múltiples células en división y generalmente los cultivos de células tumorales son poco exitosos, puesto que dependen de la propia naturaleza proliferativa de dichas células en un medio artificial no estimulado. En adición a esto, los cromosomas metafásicos obtenidos suelen tener un mayor nivel de compactación, haciendo difícil su interpretación. Un cariotipo estándar (400-450 bandas) permite detectar alteraciones cromosómicas con una resolución aproximada de 5 a 10 Mb.^{30,28}

1.10.2 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

La técnica FISH utiliza sondas de ADN marcadas con un fluorocromo para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina.

La técnica de FISH se utiliza para: 1) confirmar un defecto cariotípico relacionado con el tumor que puede ser monitoreado con el tiempo en las muestras de sangre o de médula ósea, 2) detectar traslocaciones crípticas en

un tumor que se sospecha que tienen un defecto en particular sobre la base de los hallazgos clínico-patológicos, 3) detectar una deleción o duplicación no es evidente por el cariotipo y 4) descubrir información citogenética crítica en su defecto en muestras de crecer en medios de cultivo de tejidos.³¹

1.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y qPCR

La PCR es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es amplificar una secuencia específica de ADN, partiendo de un mínimo de templado, puede permitir la identificación de una célula maligna entre 10^4 - 10^6 . La PCR tiene una mayor sensibilidad analítica enorme y se ha convertido en un pilar de la patología molecular.³

1.10.4 Arreglos de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)

La técnica de CGH fue desarrollada como un método de citogenética molecular para la detección y mapeo de alteraciones en el número de copias (CNA) en las células tumorales mediante la comparación del contenido genético y a través de la intensidad de hibridación de una célula tumoral contra una célula normal. Esta metodología permite detectar ganancias o pérdidas de material genético que no se pueden detectar mediante el cariotipo. Recientemente, se mejoró la resolución y sensibilidad de la técnica CGH permitiendo un formato en arreglo (aCGH). Sin embargo, aCGH no detecta traslocaciones balanceadas o inversiones cromosómicas. La aCGH arroja una enorme cantidad de datos y requiere herramientas bioinformáticas para el análisis y presentación de los datos de una manera que facilita la interpretación.³



El interés del uso de análisis moleculares ha ido en aumento para identificar indicadores pronósticos o blancos terapéuticos para la LMA. Un enfoque es la identificación de alteraciones genómicas en clonas asociadas a LMA.³²

Las CNA de ADN, o ganancias y pérdidas cromosómicas, juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica y constituyen un mecanismo fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer.^{30,33}



CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

De las técnicas utilizadas, la citogenética convencional, por medio de bandedo cromosómico, puede detectar anomalías cromosómicas en la mayoría de pacientes LMA; sin embargo, incluso hasta hace una década, aproximadamente un 40% de pacientes presentaban un cariotipo aparentemente normal. Aun cuando este porcentaje ha disminuido con el uso de técnicas citogenético-moleculares complementarias que detectan cambios más pequeños, discrepantemente, el resto de estos pacientes con cariotipo normal presentan un pronóstico intermedio.

Con todo lo anterior, la justificación del presente trabajo recae en la implementación conjunta de pruebas moleculares para identificar mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1*, *IDH1* e *IDH2* (favorable o desfavorable) en aquellos pacientes con cariotipo normal o anormal y realizar un perfil genómico mediante la técnica de aCGH, para determinar algunos otros desbalances que no se detectaron, teniendo con esto un abordaje global-integral que ayude al clínico para dar un mejor enfoque al tratamiento. En adición, debido al mediano éxito de cultivos para cariotipo en otro sector de los pacientes, este abordaje también será útil para esclarecer el componente etio-patogénico de aquellos pacientes sin un análisis citogenético apropiado.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Implementar y evaluar el uso de microarreglos genómicos como herramienta de apoyo para determinar el pronóstico en pacientes con LMA.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de mutaciones en los genes *FLT3*, *NPM1*, , *IDH1* e *IDH2* en pacientes con LMA.
2. Realizar un análisis genómico por microarreglos (aCGH) en el grupo de pacientes con LMA.
3. Asociación de los resultados obtenidos con los datos clínicos de los pacientes para determinar la utilidad de cada metodología.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Estrategia experimental

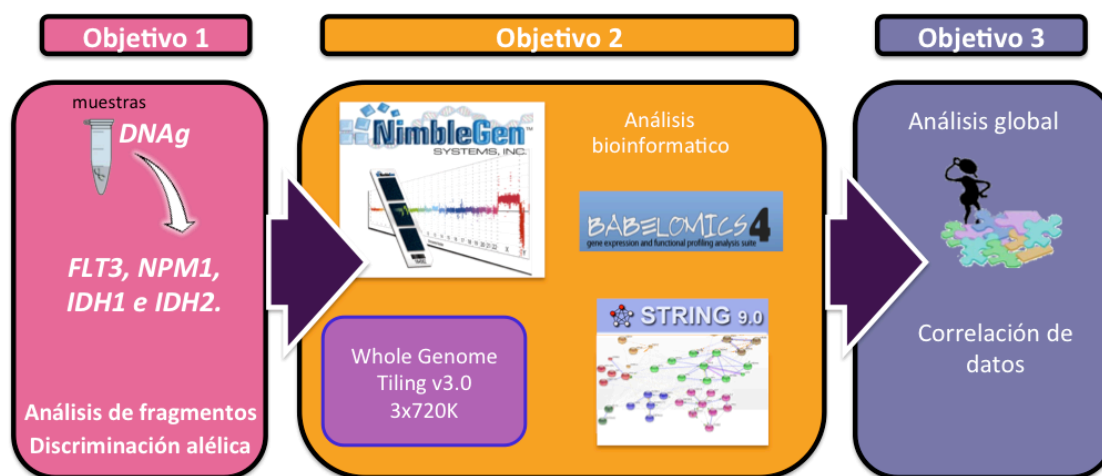


Figura 8. Estrategia General. Se esquematiza el flujograma de trabajo realizado en el presente proyecto, se partió de muestras de ADNg, obtenido de sangre periférica y/o médula ósea, el cual se utilizó para el tamizaje de biomarcadores moleculares mediante técnicas de biología molecular (discriminación alélica y análisis de fragmentos) y genómicas (aCGH), posterior a esto se realizó un análisis global con los hallazgos obtenidos.

4.2 Tipo de estudio

Observacional, transversal, descriptivo y analítico.

4.3 Población de estudio

En este estudio se incluyeron 34 pacientes que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital Universitario “José E. González”, Monterrey, México, durante el periodo comprendido entre Noviembre del 2008 a Mayo del 2011. La información recabada de los pacientes incluyó: edad, género, datos clínicos como hemoglobina, plaquetas, cuenta de glóbulos blancos.

4.3.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con diagnóstico de LMA de cualquier subtipo que cuenten con los siguientes datos epidemiológicos:
 - Edad
 - Sexo
 - Tipo de LMA
 - Cuenta de células blancas
 - Blastos en sangre periférica o en medula ósea
 - Hemoglobina
 - Recuento de plaquetas
 - Remisión/recaída
 - Tratamiento

4.3.2 Criterios de no inclusión

- Muestras con los datos clínicos incompletos

4.3.3 Criterios de eliminación

- Muestras de ADN que no cumplan con la cantidad y calidad necesaria para las plataformas utilizadas.

4.4 Reactivos

Los reactivos utilizados para extracción de ADNg, fue el equipo maxwell (promega, Madison, WI, USA). El procesamiento de ADNs para reacciones de PCR se realizó utilizando el termociclador modelo Veriti (Wattertown, MA, EUA), micropipetas de 0.1-2 μ L, 0.5-10 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L y multicanal de 0.5-10 μ L de la marca Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania), microcentrífuga Eppendorf modelo 5417C (Camibh Göttingen, Alemania).

Para fotodocumentar los geles se utilizó un transiluminador modelo M-26 UVP (Upland, CA, USA). Para los Microarreglos de genotipificación se utilizó el chip whole genome tiling v3.0 Nimblegen (Roche, Madison, WI, EUA).

Los reactivos utilizados para las reacciones de PCR convencional fueron adquiridos de Promega (Madison, WI EUA) y de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK).

Los reactivos utilizados para las reacciones de qPCR (FG, Fast optical-well Rxn Plate de 48 pozos y las FG,-well optical adhesive film para placas de 48 pozos) fueron adquiridos de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK).

4.5 Equipo utilizado

Se emplearon micropipetas de diferentes rangos Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania) y monocanal de diferentes rangos Labnet International, Inc. (Woodbridge, NJ EUA), un Vortex Maxi Mix II modelo M37615 de Barnstead International (Dubuque, IO EUA), un espectrofotómetro Nanodrop, modelo ND-1000 UV/Vis (Wilmington, DE EUA), una campana de PCR CBS Scientific Co. (Del Mar, CA EUA), un termociclador veriti y un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Warrington, WA, UK), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), un horno de microondas General Electric modelo MOM-015 (Fairfield, CA EUA), una cámara de electroforesis Fotodyne Inc (Hartland, WI EUA), una fuente de poder PowerPac BioRad (Hercules, CA EE.UU), un fotodocumentador de geles UVP Mini Darkroom modelo M-26 (Upland, CA EUA), una centrifuga al vacio miVac Duo Concentrator modelo DUC-12060-C00 (marca GeneVac), equipo de Nimblegen set de hibridación HS4 y un escáner MS 200 (Roche Applied Science, Indianápolis, Ind. USA), una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (Camibh Göttingen, Alemania), un termociclador StepOne Real-Time PCR System 48 Well de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK) y un analizador de secuencias

ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (4 Capilares) de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK).

4.6 Programas

La captura de datos y de la tesis se realizó en una computadora MacBook Pro, con el OS X 10.8.3. Para el diseño de los iniciadores se utilizaron los programas Primer Express 3.0, Beacon Designer 7. Para la visualización y análisis de los productos amplificados por tiempo real se utilizaron los programas StepOne Software v2.0, para los análisis de los microarreglos se utilizo el software NimbleScan 2.6 y la aplicación web waviCGH, la aplicacion Babelomics versión 4.2, Bioconductor R2.7.1 y el software Nexus. Para la búsqueda de Información se utilizó la página de Internet del Nacional Center for Biotechnology Information.

4.7 Diseño de los iniciadores

Se realizó el diseño de iniciadores y sondas para las mutaciones incluidas en este trabajo, se utilizaron los software Primers express 3.0 y Beacon Designer 7, las mutaciones detectadas se resumen en la tabla siguiente (tabla 4 y 5).

4.8 Generación de controles

Como no se contaba con controles positivos para la estandarización de las mutaciones incluidas en el trabajo (descritas en la tabla 4), a continuación se describe la metodología que se diseño para la generación de los controles (figura 9). Se amplificaron dos fragmentos de un ADN normal (los tamaños varían dependiendo del gen de interés), uno de los oligos internos lleva la

mutación que se desea insertar, después se hace una segunda PCR utilizando ambos fragmentos como templado, generando un fragmento de mayor tamaño que ya tiene insertada la mutación de interés.

Figura 9. Diagrama del diseño de la estrategia de la generación de los controles.

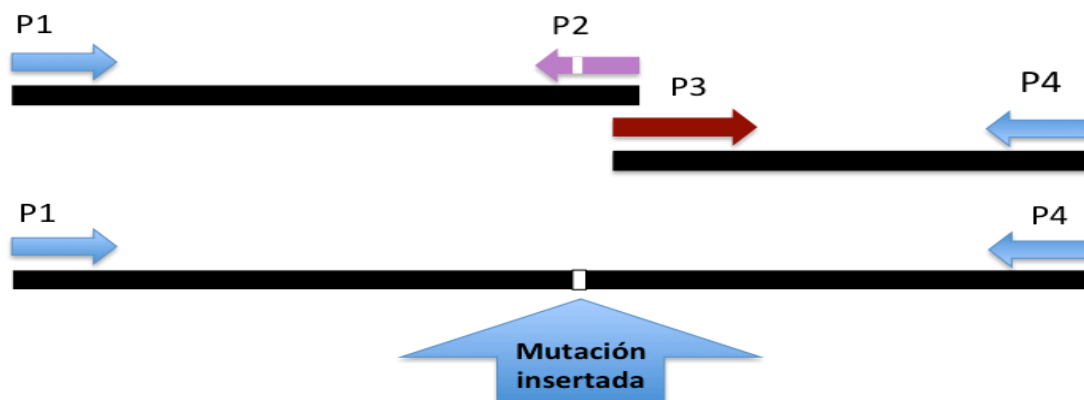


Tabla 4. Características de las mutación incluidas en este trabajo.

Genes	Mutaciones	Tipo de mutación	Metodología de detección
<i>FLT3</i>	FLT3-IDT(40%) D835 (8-10%)	Inserción de 3-400 pb Mutación puntual	Análisis de fragmentos
<i>NPM1</i>	A (TCTG) 75% B (CATG) 15% D (CCTG) 15%	Inserciones de 4 pb	Análisis de fragmentos
<i>IDH1</i>	R132C/R132H	Mutación puntual	Discriminación alélica
<i>IDH2</i>	R149Q (8-10%)	Mutación puntual	Discriminación alélica

GEN	MUTACIÓN		SECUENCIA (5'-3') OLIGONUCLEÓTIDO	AMPLICÓN	
NPM1	WT	F	TTTTCCAGGCTATTCAlIIIIITCTGGCAGT	299	
	mut-A	F	TTTTTCCAGGCTATIIIIATCTCTGtctgG	304	
	mut-B	F	CCAGTTTTTCCAGGCTATTCIIIIICTCTGcatg	308	
	mut-D	F	ACGGCCAGTTTTTTTCCAGGCTATTCIIIICTCTGcctg	312	
	WT	R	ACCACCGCTACTACIIIIICCTATCATAACA		
FLT3	D835 WT	F	ccagtCCTGACAACATAGTTGGAATCIIIIITGATATCTC	146	
	D835Y	F	GCCAGTCCCTGACAACATAGTTGGAATCAIIIIIGATATATCG	149	
	D835 WT	R	TTCTTGACAGTGTGTIIIIIGAGACCTG		
	ITD	F	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	329	
R		CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC			
IDH1	primers	F	GGCTTGTGAGTGGATGGGTAAA	102	
		R	CAACATGACTTACTTGATCCCCATA	120	
	S O N D A S	R132-wt (FAM)	CTATCATCATAGGTCGTCA		
		R132C[C>A] (VIC)	CTATCATCATAGGTAGTCAT		
R132C[C>T-] (VIC)		CTATCATCATAGGTTGTCATG			
IDH2	primers	F	AAGCTGAAGAAGATGTGGAAAAGTC	106	
		R	CGTGGGATGTTTTTGCAGATG	122	
	S O N D A	R140-wt(FAM)	CAATGGAECTATCCGGA		
		R140Q[G>T] (VIC)	CAATGGAECTATCCTGAAC		

Tabla 5. Tabla de los iniciadores utilizados para cada una de las mutaciones tamizadas.

4.9 Procesamiento de las muestras

Se partió de muestras de ADNg que fue extraído mediante una metodología automatizada con el equipo Maxwell 16 System (promega), se realizo una PCR con primers específicos para la deteccion de las mutaciones de los genes *FLT3*

y *NPM1* con las siguientes condiciones de reacción para cada gen respectivamente.

4.9.1 Análisis de fragmentos

Realizar la siguiente reacción de PCR para los genes *FLT3* y *NPM1*.

4.9.1.1 Metodología para la detección de las mutaciones en el gen *FLT3*:

- 1) Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de usarse.
- 2) Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0.2 ó 0.5 mL:

Reacción	[] trabajo	1x
Agua	-----	3.3 µL
Amortiguador 5x	1 x	3.0 µL
MgCl ₂ 25 mM	2 mM	1.2 µL
dNTP's 10 µM	0.2 µM	0.3 µL
R-DPO- wt-D8835-FAM 3.26 pM	0.43 pM	2 µL
F-DPO-D835Y 2.26 pM	0.30 pM	2 µL
F-FLT3-IDT-FAM 1.30 pM	0.43 pM	0.5 µL
R-FLT3-IDT 1.43 pM	0.047pM	0.5 µL
Gotaq flexi 5 U/µL	1 U/µL	0.2 µL
ADN	30-50 ng	2 µL
Volumen final		15 µL

- 3) Mezclar con vortex la muestra brevemente y colectar por centrifugación breve. Incubar en el termociclador como lo indica el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
94 °C	5 min
94 °C	30 seg
60 °C	1 min 40 ciclos
72 °C	30 seg
72 °C	5 min

- 4) Agregar 1 μ L de producto amplificado con 10 μ L de formamida y 0.4 μ L de LIZ e incubar a 95°C por 5 minutos.
- 5) Una vez desnaturalizados los productos, éstos se analizaron en el equipo ABI PRISM® 3130 ADN Analyzer de Applied Biosystem.

4.9.1.2 Metodología para la detección de las mutaciones en el gen *NPM1*

- 1) Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de usarse.
- 2) Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0.2 ó 0.5 mL:

Reacción	[] trabajo	1x
Agua	-----	3.6 µL
Amortiguador 5x	1 x	3.0 µL
MgCl ₂ 25 mM	2 mM	1.2 µL
dNTP's 10 µM	0.2 µM	0.3 µL
R-DPO-wt-NPM1-FAM 3.03 pM	0.20 pM	1 µL
F-DPO- wt-NPM1 3.26 pM	0.17 pM	0.8 µL
F-DPO-NPM1 mut A 3.16 pM	0.42 pM	2 µL
F-DPO-NPM1 mut B 2.81 pM	0.07 pM	0.4 µL
F-DPO-NPM1 mut D 2.45 pM	0.08 pM	0.5 µL
Gotaq flexi 5 U/µL	1 U/µL	0.2 µL
ADN	30-50 ng	2 µL
Volumen final		15 µL

- 3) Mezclar por vortex la muestra brevemente y coleccionar por centrifugación breve. Incubar en el termociclador como lo indica el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo
94 °C	5 min
94 °C	30 sec
60 °C	1.10 min 40 ciclos
72 °C	30 sec
72 °C	5 min

- 4) Agregar 1 μ L de producto amplificado con 10 μ L de formamida y 0.4 μ L de LIZ 500 e incubar a 95°C por 5 minutos.
- 5) Una vez desnaturalizados los productos, éstos se analizaron en el equipo ABI PRISM® 3130 ADN Analyzer de Applied Biosystem.

4.9.2 Discriminación alélica

Realizar la siguiente reacción de PCR para los genes *IDH1* e *IDH2*

4.9.2.1 Metodología para la identificación de las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*

- 1) Descongelar los reactivos y mantenerlos en hielo y protegidos de la luz.
- 2) Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0.1 mL

Componente	1x
TaqMan universal Master mix 2x	5 μ L
Sonda 20x	0.5 μ L
ADN (20 ng)	4.5 μ L
Volumen final	10 μ L

- 3) Mezclar por pipeteo y colectar por centrifugación breve. Realizar la PCR en el equipo step one como lo indica el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	
50 °C	10 min	
95 °C	2 min	
92 °C	15 seg	50 ciclos
56 °C	30 seg	
60 °C	30 seg	

4) Analizar la corrida en el software step one.

4.9.3 Arreglos de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)

A continuación se describe de forma general los pasos a seguir para la realización de los aCGH, ver descripción completa del protocolo en la sección de anexos.

Se utilizo el chip Whole Genome Tiling 3x720 K de la marca Roche utilizando la plataforma de NimbleGen, se partió de una concentración de 0.5 µg de ADNg de la muestra problema y la muestra de referencia, con una calidad y pureza cercana de entre 1.8-2 (valores determinados por espectrofotometría), se adiciona 40 µL de los fluorocromos Cy3 (para muestra problema) y Cy5 (para muestra control) hasta un volumen final de 80 µL.

Se prepara la siguiente reacción y se incuba durante dos horas a 37 °C.

Master mix (dNTP/Klenow) por muestra	Todos los formatos
dNTP Mix (10 mM cada dNTP) (vial 6)	10 μ L
Agua grado PCR (vial 1)	8 μ L
Fragmento Klenow (3'->5' exo-) 50 U/ μ L (vial 5)	2 μ L
Total	20 μ L

Pasado el tiempo de incubación se agrega 21.5 μ L de solución de paro, se agita y luego se agrega 110 μ L de isopropanol, se mezcla y se incuba a 25 °C por 10 minutos para precipitar el ADN marcado, se centrifuga a 12,000 x g por 10 minutos, se realiza un lavado con etanol al 80% y se vuelve a centrifugar a 12,000 x g por 2 minutos. Se secan las pastillas y se rehidrata cada pastilla en 25 μ L con agua grado PCR. Para cuantificar las muestras se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop las muestras, estas deben tener una concentración mayor a 3 μ g en un volumen de 20 μ L para poder proseguir con el ensayo.

Basado en la concentración, se calcula el volumen de la muestra problema y la muestra de referencia requerida para cada hibridación y se combinan ambas muestras en un tubo de 1.5 mL. Secar la pastilla en un centrifuga al vacío, resuspender las muestras en 5.6 μ L de STC (del inglés, Sample tracking control)

Se preparó el master mix de la solución de hibridación de acuerdo a la siguiente tabla.



master mix de la solución de hibridación arreglo CGX-3	
Buffer para hibridación 2x (vial 1)	35 µL
Componente A de hibridación (vial 2)	14 µL
Oligo de alineamiento	1.4 µL
Total	50.4 µL

Mezclar con vortex (aproximadamente 15 segundos) y spin para depositar el contenido en el botón del tubo. Incubar a 95 °C por 5 minutos, protegido de la luz. Colocar los tubos a 42 °C (en el bloque del sistema de hibridación) por lo menos 5 minutos o hasta que esté listo para cargar las muestra. Vortex y spin antes de la carga.

Cargar el chip con 18 µL de la muestra e incubar a 42 °C durante 72 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron los lavados al chip con 3 diferentes amortiguadores, posterior a esto el chip está listo para su escaneo.

4.9.3.1 Análisis

Después de obtener la imagen escaneada se procede a la extracción de los datos del arreglo para esto se utiliza el programa NimbleScan, este software nos proporciona archivos .gff los cuales contiene información acerca de las sondas incluidas en el chip. (figura 10).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	INDEX	X	Y	SEQ_ID	PROBE_ID	POSITION	CHROMO	CHR_POSITIC	EXP_A01533	REF_A01533	RATIO	EXP_SPATIAL	REF_SPATIAL	RATIO_SPAT	EXP_NORM	REF_NORM	RATIO_CORRECTED
2	1952	963	211	chr10:1-135374737	CHR10FS003329896	3329896	chr10	3329896	13.347	13.59	-0.242	12.337	12.626	-0.289	12.342	12.603	-0.261
3	1953	1008	126	chr10:1-135374737	CHR10FS050145841	50145841	chr10	50145841	12.862	12.78	0.082	11.804	11.755	0.049	11.802	11.766	0.036
4	1954	272	346	chr10:1-135374737	CHR10FS005860803	5860803	chr10	5860803	12.824	12.774	0.05	11.817	11.805	0.012	11.815	11.815	0
5	1955	618	494	chr10:1-135374737	CHR10FS071349312	71349312	chr10	71349312	13.341	13.502	-0.161	12.316	12.5	-0.184	12.321	12.486	-0.165
6	1956	439	1235	chr10:1-135374737	CHR10FS054640448	54640448	chr10	54640448	12.681	12.737	-0.056	11.599	11.669	-0.07	11.595	11.681	-0.085
7	1957	811	459	chr10:1-135374737	CHR10FS110690028	110690028	chr10	110690028	12.55	12.645	-0.094	11.418	11.538	-0.12	11.413	11.552	-0.139
8	1958	954	460	chr10:1-135374737	CHR10FS097948305	97948305	chr10	97948305	12.92	12.85	0.071	11.803	11.766	0.037	11.802	11.777	0.024
9	1959	241	1923	chr10:1-135374737	CHR10FS098472615	98472615	chr10	98472615	13.591	13.654	-0.063	12.455	12.502	-0.047	12.463	12.488	-0.025
10	1960	530	292	chr10:1-135374737	CHR10FS130077820	130077820	chr10	130077820	13.389	13.439	-0.05	12.396	12.486	-0.091	12.402	12.474	-0.072
11	1961	190	812	chr10:1-135374737	CHR10FS064671947	64671947	chr10	64671947	12.958	12.973	-0.015	11.922	11.975	-0.053	11.922	11.982	-0.06
12	1962	40	434	chr10:1-135374737	CHR10FS038664141	38664141	chr10	38664141	12.795	12.854	-0.059	11.734	11.811	-0.076	11.732	11.821	-0.089
13	1963	1037	243	chr10:1-135374737	CHR10FS028159067	28159067	chr10	28159067	13.491	13.455	0.036	12.342	12.402	-0.06	12.347	12.393	-0.046
14	1964	807	355	chr10:1-135374737	CHR10FS071152587	71152587	chr10	71152587	12.915	12.953	-0.038	11.786	11.857	-0.071	11.784	11.866	-0.082
15	1965	751	1325	chr10:1-135374737	CHR10FS010624352	10624352	chr10	10624352	13.489	13.473	0.016	12.361	12.362	-0.002	12.366	12.356	0.01
16	1966	315	1271	chr10:1-135374737	CHR10FS021568201	21568201	chr10	21568201	12.99	12.905	0.085	11.855	11.761	0.095	11.854	11.772	0.082

Figura 10. Datos de las sondas incluidas en el chip.

Se genera un archivo en Excel, el cual debe contener datos como la nombre o identificación de las sondas, cromosoma, posición genómica, y los valores de hibridación de cada paciente, este archivo se utiliza en la aplicación web WaviCGH para determinar las regiones mínimas comunes que comparten todos nuestros pacientes.

Se realizaron diferentes combinaciones para realizar análisis como por ejemplo, se compararon los pacientes entre grupos dependiendo del subtipo FAB y también se analizaron a los pacientes que no tuvieron mutaciones, para poder determinar que cromosomas o regiones cromosómicas están afectadas y que genes están participando en vías de señalización importantes en el desarrollo de esta enfermedad.



CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Descripción de la población

En el periodo de recolección de muestras (2008-2011), se captaron un total de 34 muestras de pacientes con diagnóstico de LMA, el 38.7% fueron muestras de sangre periférica (12 pacientes) y el 61.3% fueron de médula ósea (19 pacientes). El rango de edad fue de 16-78 años, con una mediana de 45 años. La distribución por sexo fue de 47% para el sexo femenino y 53% para el masculino. En la tabla 6 se resumen las características de la población de pacientes recolectada.

Características	Frecuencia	
Rango de Edad		
16-26	7	(22.58%)
27-37	4	(13%)
38-59	14	(45.16%)
>60	6	(19.35%)
Sexo		
Femenino	15	(47%)
Masculino	18	(53%)
Clasificación FAB		
M1	2	(6.45%)
M2	16	(51.61%)
M3	3	(9.67%)
M4	6	(19.35%)
M5	4	(12.90%)
Citogenética		
normal	4	(11.7%)
anormalidades		
t(8;21)	3	(8.82%)
t(3;14)	1	(2.9%)
t(15;17)	1	(2.9%)
Sin cariotipo	25	(73.5%)

Tabla 6. Características de la población incluida en el estudio

De los 34 pacientes recolectados se excluyeron 3 muestras debido a que no cumplían con los criterios de calidad y pureza necesarios para la plataforma de microarreglos (concentración $\geq 0.5 \mu\text{g}$ y que contaran con una pureza cercana a 2.0, con base en la relación 260/280 obtenida por espectrofotometría). En la tabla 7 se describen dichas características de las muestras y se enlistan algunas de las muestras utilizadas en el proceso de microarreglos. En adición de este control de calidad se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de las muestras utilizadas en microarreglos (figura 11).

Tabla 7 .Características de concentración y pureza de algunas muestras analizadas.

Simple ID	Conc.	Unidades	260/280	260/230
LMA-1	702.5	ng/ μL	1.77	1.96
LMA-2	109.7	ng/ μL	1.80	1.8
LMA-3	779.7	ng/ μL	1.83	1.61
LMA-4	125.3	ng/ μL	1.79	1.90
LMA-5	133.3	ng/ μL	1.86	1.52
LMA-6	357	ng/ μL	1.85	1.52
LMA-7	133.4	ng/ μL	1,85	2.20
LMA-8	127.9	ng/ μL	1,88	1.95
LMA-9	88.32	ng/ μL	1.70	1.85
LMA-10	999.6	ng/ μL	1.86	1.78
LMA-11	172.1	ng/ μL	1.84	1.53
LMA-12	1099	ng/ μL	1.87	1.94
LMA-13	282.6	ng/ μL	1.77	1.76
LMA-14	236.4	ng/ μL	1.86	1.74

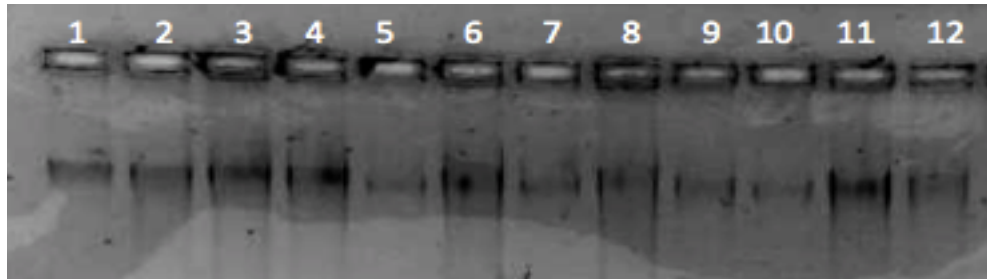


Figura 11. Gel de agarosa al 1% para verificar la integridad de las muestras de ADN (carriles 1-11 muestras LMA, carril 12 ADN control)

5.2 Resultados objetivo 1

5.2.1 Comprobación de la generación de controles positivos

Se secuenciaron los controles positivos para confirmar que tenían las mutaciones insertadas. En la figura 12 se muestran algunos ejemplos de controles con la mutación insertada.

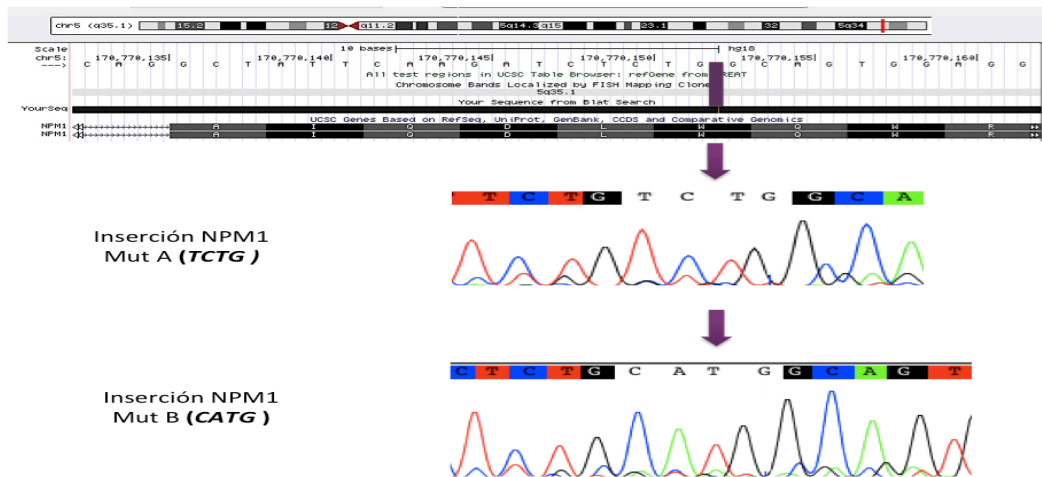


Figura 12. Secuenciación de controles positivos. Comprobación por secuenciación de la inserción de algunas mutaciones deseadas.

5.2.2 Análisis de fragmentos

5.2.2.1 Mutaciones en el gen *NPM1*

Se estandarizó un panel para la identificación de mutaciones en el gen *NPM1* (mutaciones A, B y D). La metodología que se utilizó fue una PCR multiplex y posteriormente una electroforesis capilar; los resultados que se obtuvieron fueron 13 pacientes (42%) positivos para la mutación y 18 pacientes (58%) fue negativos para la mutación. En la figura 13 se muestra un ejemplo de las muestras analizadas.

De los 13 pacientes que presentaron la mutación en el gen *NPM1* se encontró que la mutación más frecuente fue la mutación A con un 54% (7 pacientes), seguida por la mutación B con un 38% (5 pacientes) y solo un pacientes presentó la mutación D como se observa en la figura 14.

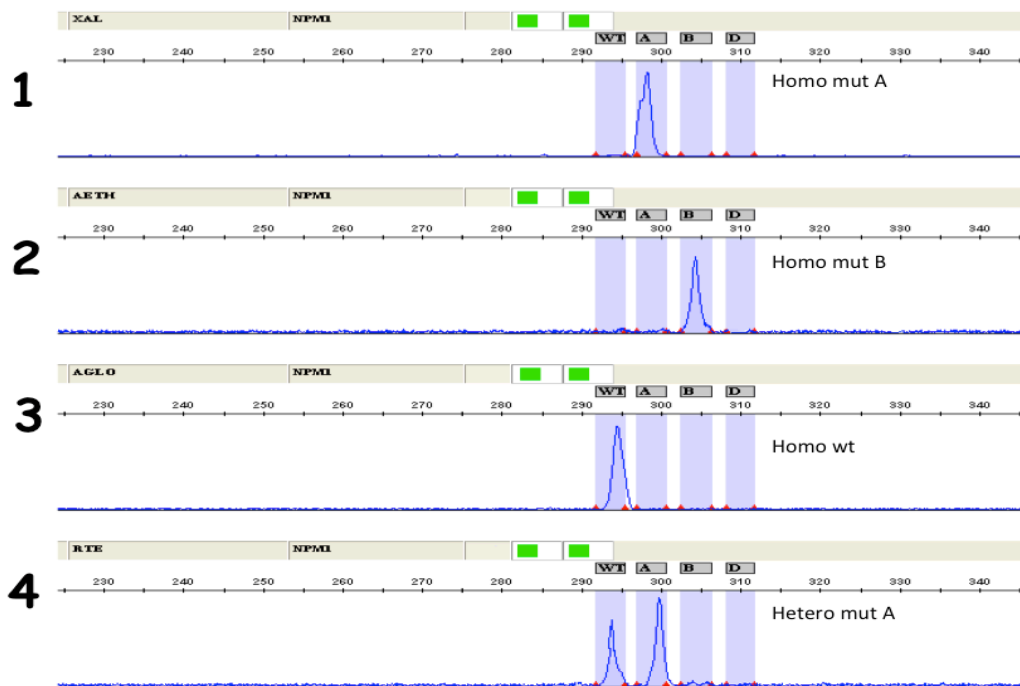


Figura 13. Electroferograma de muestras analizadas con el software genemapper.. Carriles 1-4: Muestras de pacientes.

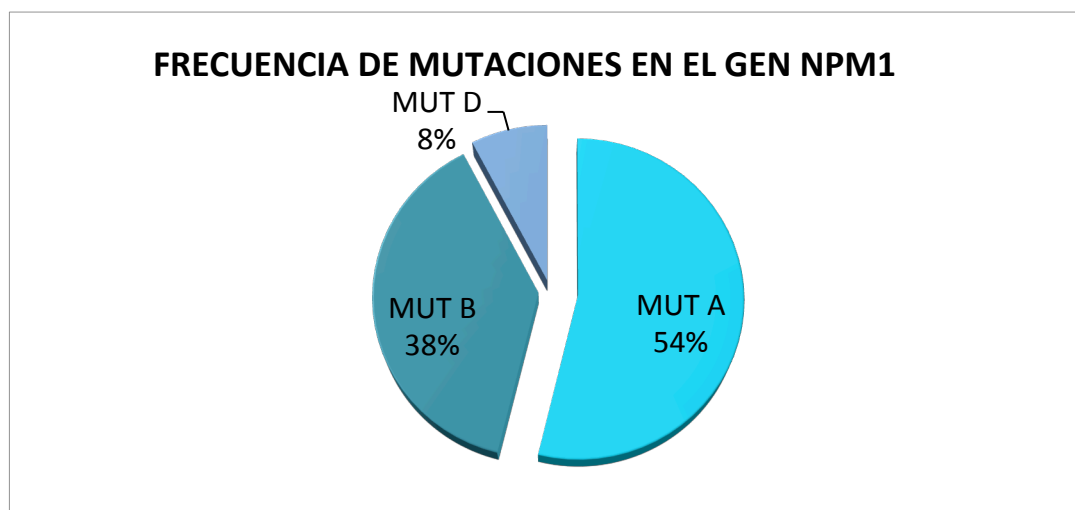


Figura 14. Gráfica de frecuencia de mutaciones en el gen *NPM1*.

5.2.2.2 Mutaciones en el gen *FLT3*

Se implementó un panel para la identificación de mutaciones en el gen *FLT3* (mutaciones D835Y/IDT), la metodología que se utilizó fue una PCR multiplex y posteriormente una electroforesis capilar; los resultados que se obtuvieron fueron 16 pacientes (52%) positivos para la mutación y 15 pacientes (48%) fueron negativos para la mutación. En la figura 16 se muestra un ejemplo de las muestras analizadas.

De 52% de pacientes que presentaron la mutación en *FLT3* se encontró que la mutación más frecuente fue la inserción IDT con un 56%, mientras que la mutación D835Y tuvo una frecuencia de 44% (figura 15).

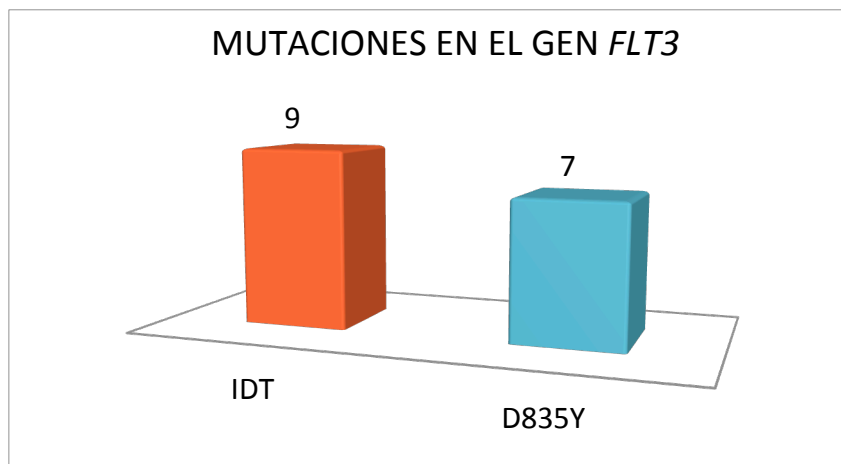


Figura 15. Gráfica de frecuencias de mutaciones en el gen *FLT3*.



Figura 16. Electroferograma de muestras analizadas con el software genemapper. Carril 1 control negativo, carril 2 control positivo para la mutación D835Y, carriles 3 y 4 pacientes.

El grupo de pacientes tamizados ya había sido tamizados anteriormente para las dos mutaciones en el gen *FLT3* (D835Y/IDT), con la implementación de nuestra metodología encontramos un aumento en el número de casos de la mutación *FLT3*-IDT, así como pacientes con la mutación D835Y que anteriormente no había sido encontrada en dichos pacientes, por lo cual se llevo a cabo la secuenciación de algunas muestras positivas y negativas para la mutación D835Y (figura 17).

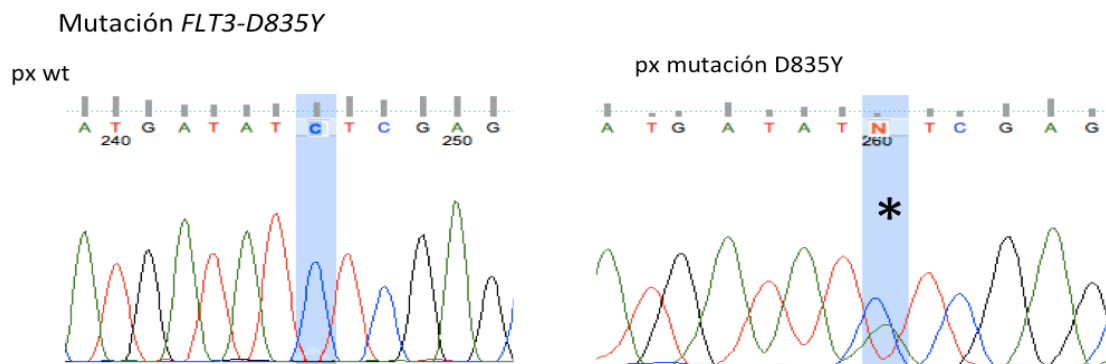


Figura 17. Secuenciación de la mutación D835Y. Secuencias de dos pacientes, en asterisco se muestra la posición donde ocurre la mutación.

5.2.3 Discriminación alélica

Se realizó la genotipificación de las mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2* mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan por PCR en tiempo real. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes; se encontró 1 paciente heterocigoto para la mutación *IDH1* R132H, presentando un 3% de prevalencia (figura 21).

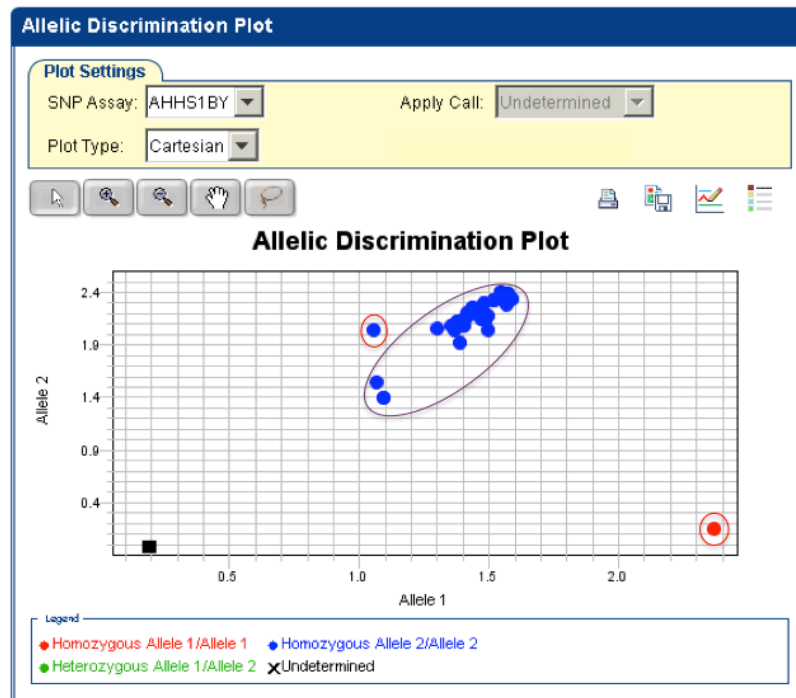


Figura 18 Tabla de discriminación alélica IDH1 (R132C [C>A]). Los círculos de colores encerrados en círculos rojos son los controles positivos: azul control homocigoto normal y rojo control homocigoto mutado.

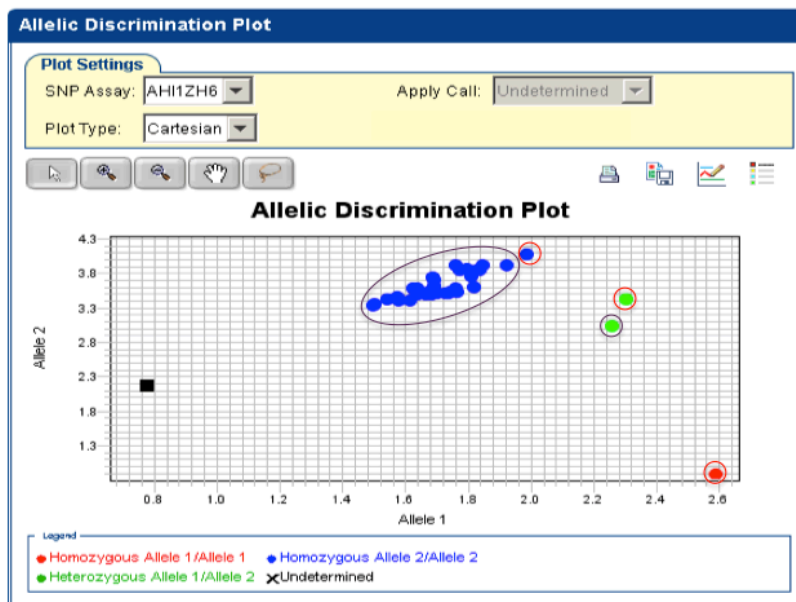


Figura 19. Tabla de discriminación alélica IDH1 (R132H [C>T]). Los círculos de colores encerrados en círculos rojos son los controles positivos: azul control homocigoto normal, verde heterocigoto y rojo control homocigoto mutado.

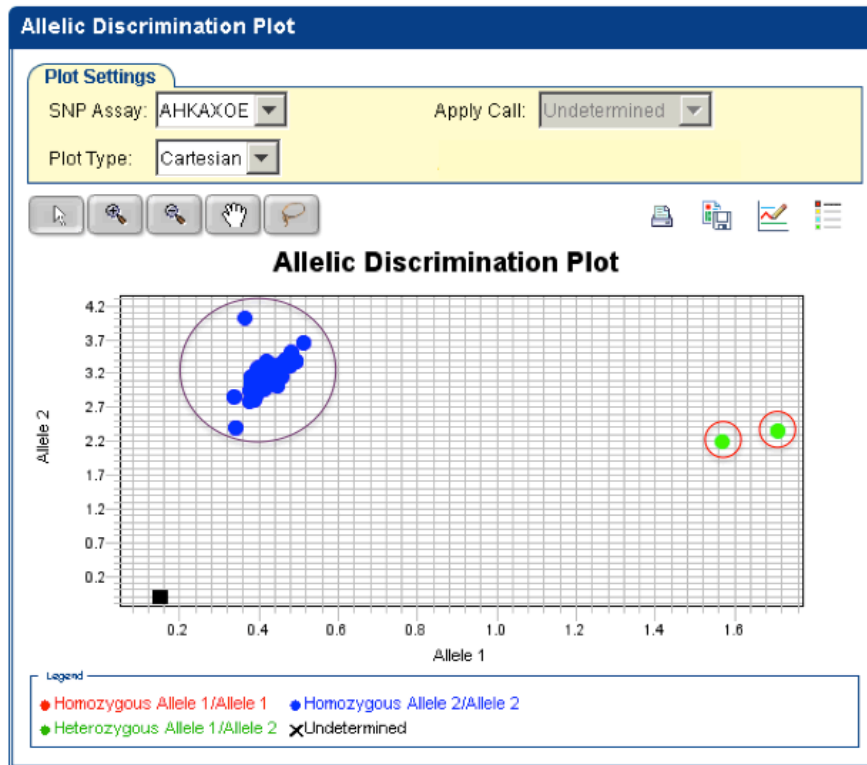


Figura 20. Tabla de discriminación alélica IDH2 R140Q [G>T]. Los círculos de color verde encerrados en círculos rojos son los controles positivos heterocigotos, en azul todos los pacientes tamizados que fueron homocigotos normales para la mutación.

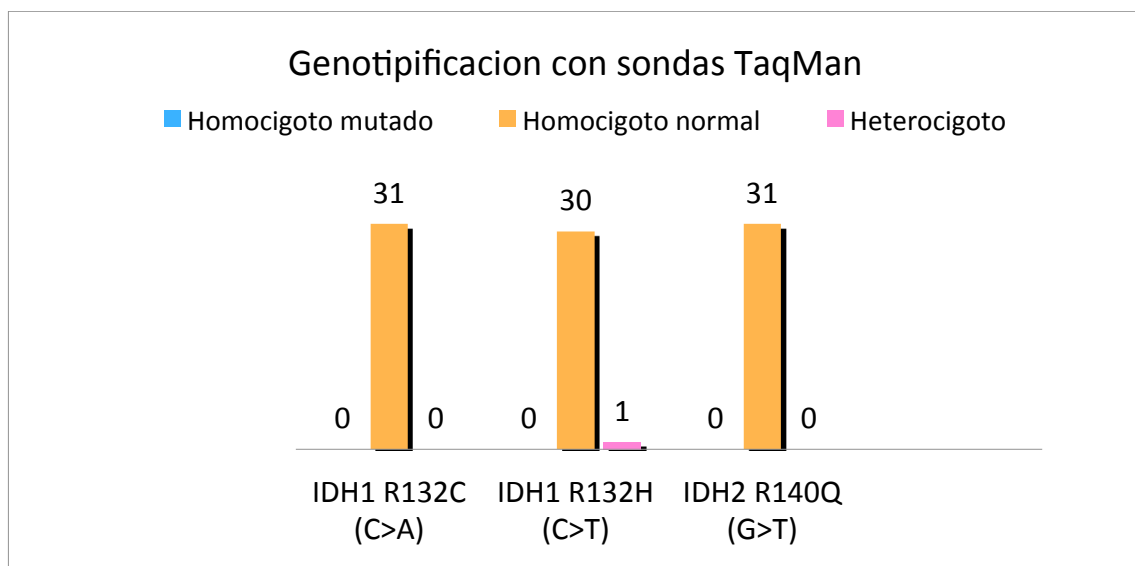


Figura 21. Gráfica de frecuencias para los genes *IDH1* e *IDH2*.

Resultados objetivo 2

5.2.4 Hallazgos a partir de aCGH

De las 34 muestras que fueron incorporadas a este estudio, sólo 31 fueron incluidas para el análisis de variación del número de copias. Una vez realizado el protocolo experimental de Nimblegen para número de copias y escaneado el Chip, los archivos .GFF (Gene-Finding Format) son analizados mediante software NimbleScan v2.1 para el análisis de las intensidades de hibridación. De éste análisis se obtuvieron los CNA presentes en el microarreglo tomándose como normal las intensidades de señal correspondientes a las 2 copias del genoma de las muestras que fueron utilizadas como referencias en cada caso. A partir del resultado del análisis de las intensidades de hibridación y utilizando logaritmo base 2 de las intensidades registradas, podemos observar aquellas regiones que presentan números de copias normales y otras que presentan alteraciones, ya sean amplificaciones o deleciones. Estos resultados fueron por grupos de pacientes (figura 22) o por cromosoma (figura 23).

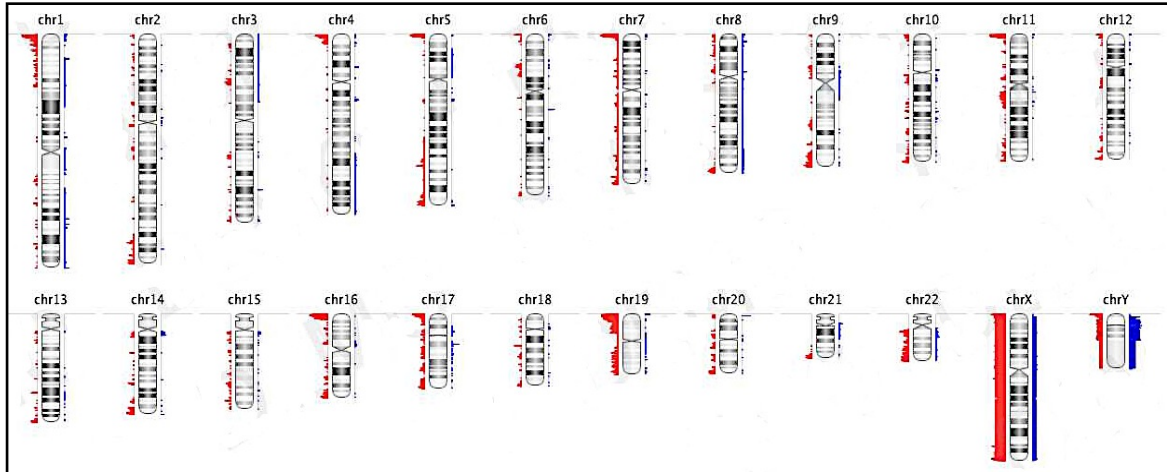


Figura 22. Ideograma obtenido del análisis con el software Nexus. Variaciones en el número de copias por cromosoma de todo el bloque de pacientes analizados, donde los segmentos ganados se observan en azul y los segmentos deletados en rojo.

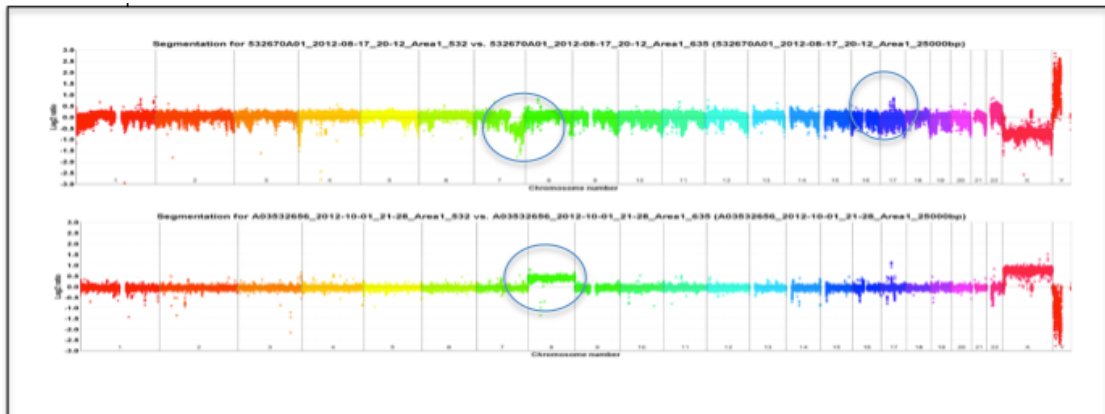


Figura 23. Gráfica de logaritmo base 2. Se observan todos los cromosomas y las deleciones y amplificaciones de los pacientes analizados con aCGH.

En este análisis se obtuvieron 22267 regiones cromosómicas alteradas de las cuales correspondieron 21499 a deleciones y 768 a ganancias (figura 24).



Figura 24. Alteraciones encontradas en los pacientes analizados con microarreglos de aCGH. Se obtuvieron 22267 regiones cromosómicas, siendo la mayoría regiones deletadas.

Se realizó una comparación entre todos los pacientes con lo que se identificaron las regiones mínimas comunes, en estas regiones se encontraron principalmente regiones deletadas en la mayoría de los cromosomas (1q, 4p, 5q, 6p, 7q, 8p, 9q, 10q, 11p, 12q, 14p, 15p, 16p, 17p, 19q, 20q, 21q, 22q) las cuales contienen genes implicados en vías de linaje celular hematopoyético, vías de cáncer y en la vía de la LMA principalmente (tabla 8).

VÍAS	GENES
Interacción receptor citocina-citocina	CEBPA, AMH, ARID3A, CLCF1, CNTFR, FLT3LG, FLT4, FOXL1, IL11, IL12RB1, PDGFA, SPIB, TNFRSF12A, TNFRSF13C, TNFRSF14, TNFRSF18, TNFRSF25, VEGFB
Linaje celular hematopoyético	ARID3A, CD22, CD5, CD7, FLT3LG, FOXL1, IL11, ITGA2B, SPIB
Vías en cáncer	HRAS, APC2, ARID3A, AXIN1, BAD, CTBP1, DAPK3, DVL2, FGF3, FGF4, FGFR3, FLT3LG, FOXL1, ITGA2B, LAMA5, MAP2K2, NFKB2, PDGFA, PIAS4, RAC3, RASSF1, RET, RXRA, SHH, SPIB, VEGFB, WNT10A, WNT3, WNT6, WNT7B
LMA	HRAS, ARID3A, BAD, FOXL1, MAP2K2, RPS6KB2, SPIB
Vías de señalización MAPK	HRAS, ARID3A, CACNA1H, CACNA2D2, EN1, FGF3, FGF4, FGFR3, FLNC, FOXL1, GADD45B, JMJD7, PLA2G4B, MAP2K2, MAP2K7, MAP3K11, MAP3K6, MAPK11, MAPK12, MAPK8IP2, MAPK8IP3, NFKB2, NTF4, PDGFA, RAC3, RASGRP2, RPS6KA4, SPIB
LMC	HRAS, ARID3A, BAD, CTBP1, FOXL1, MAP2K2, SHC2, SPIB
Vías de señalización Jak-STAT	CEBPA, ARID3A, CLCF1, CNTFR, FOXL1, IL11, IL12RB1, PIAS4, SPIB
Vías de señalización p53	ARID3A, BAI1, FOXL1, GADD45B, LRDD, SPIB, TP73, TSC2

Tabla 8. Vías afectadas en genes alterados en el número de copias.

5.2.5 Análisis de vías

A partir de los datos de aCGH, se realizó el análisis de vías mediante el empleo de la base de datos String–protein. Las interacciones fueron determinadas utilizando la aplicación web STRING 9.0 se realizaron gráficos de interacciones entre algunas de las proteínas que participan directa o indirectamente en rutas como por ejemplo de apoptosis, cáncer o de linaje hematopoyético (figura 25).

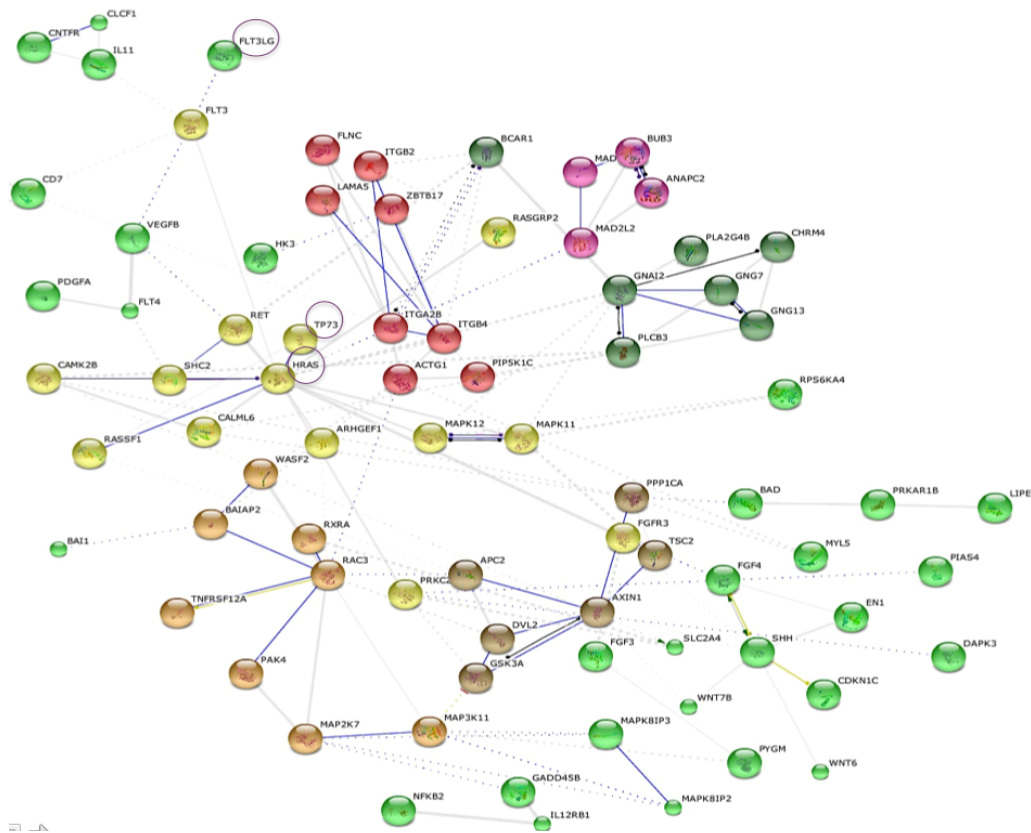


Figura 25. Gráfica de interacción proteína-proteína. Se observan genes encerrados en un círculo, los cuales participan directa o indirectamente en vías relacionadas a hematopoyesis normal (FLT3LG)

Resultados objetivo 3

5.2.6 Asociación de resultados

Se realizó la frecuencia de mutaciones y la combinación de mutaciones con una o más de ellas de los genes tamizados; la única combinación de mutaciones que se encontró fue de los genes *FLT3* con *NPM1* presentándose en un 13% (6 pacientes) de la población estudiada (figura 26).

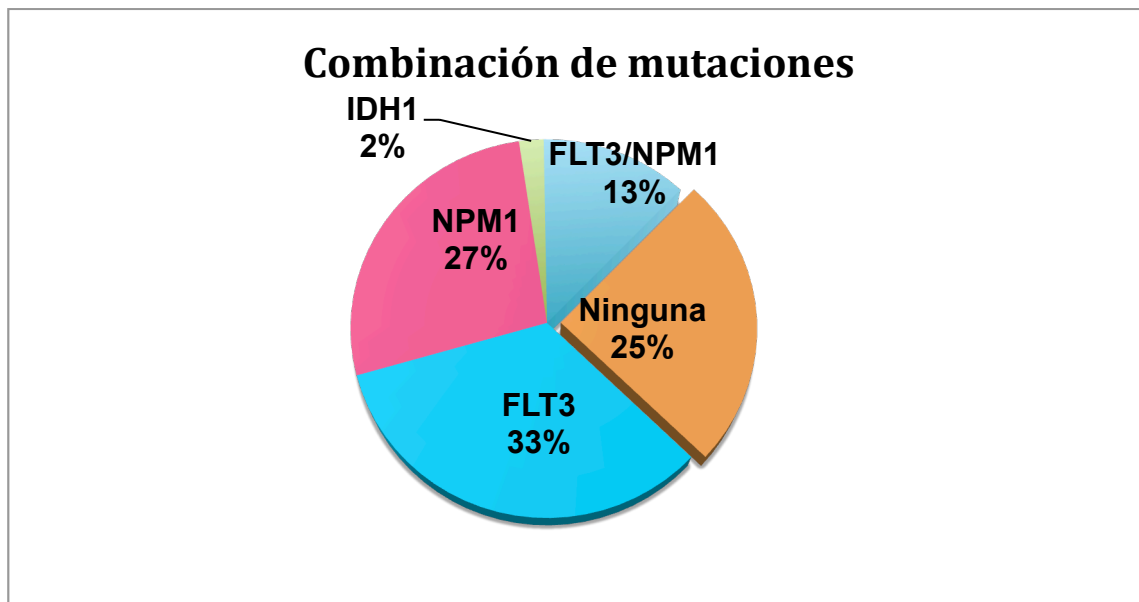


Figura 26. Gráfica de frecuencia de combinaciones de mutaciones.

Se encontró que el 25% (11 pacientes) no tenían ninguna mutación, sin embargo, se pudo identificar mediante el aCGH que en estos pacientes habían regiones deletadas principalmente en los cromosomas 1, 7, 10, 11, 14, 16, 17, 19, 21 y 22; en dichas regiones deletadas encontramos genes asociados a enfermedades como cáncer, aberraciones cromosómicas, malignidades hematopoyéticas y LMA. Interesantemente 4 de estos pacientes tenían una deleción de 3578 pb en el cromosoma 19; incluyendo 385 pb del gen *CEBP α* , reportado en la literatura como un gen de buen pronóstico cuando no hay ninguna otra mutación.

Se realizó una comparación entre subtipos FAB (M1, M2, M3, M4 y M5) en donde se encontró una gran similitud principalmente en los subtipos M1 y M3, los grupos más heterogéneos fueron el M2 y M4 y el grupo en el que menos se

parecen los pacientes entre sí fue el M5; estas características se resumen en la tabla 9.

Subtipo FAB	Características en el aCGH
M1 (2)	Fallecieron (edad >60 años) Regiones similares entre ellos; conteniendo delecciones de los cromosomas 17, 19 y 22 Relacionados a cáncer, LMA, Anemia, Síndrome mielodisplásico, Aberraciones cromosómicas.
M2 (16)	Más heterogéneo (6 fallecieron) Regiones similares entre ellos; conteniendo delecciones de los cromosomas 11, 12, 15, 16, 17, 19, 20 y 22 Relacionados a cáncer, LMA, leucemogénesis y metástasis.
M3(3)	Fallecieron 2 (> 35 años) Regiones similares entre ellos; conteniendo delecciones de los cromosomas 1, 5, 7, 15, 16, 17, 19, 20 y 22 Relacionados a LMA y Síndrome mielodisplásico.
M4(6)	Fallecieron 2 (>35 años) 2 pacientes con trisomía 8 Regiones similares entre ellos; conteniendo delecciones de los cromosomas 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 22 Relacionados a cáncer, LMA, metástasis y tumorigénesis
M5(4)	Grupo que presentó más diferencias Pequeñas similitudes en el cromosoma 22 Relacionados a LMA

Tabla 9. Características clínicas y hallazgos en el aCGH.

El grupo restante de pacientes a los cuales no se les encontró positivos a ninguna mutación, en el aCGH se encontraron regiones deletadas principalmente en los cromosomas 1, 7, 10, 11, 14, 16, 17, 19, 21 y 22, en los cuales encontramos genes asociados a cáncer, aberraciones cromosómicas, malignidades hematopoyéticas y LMA.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La incidencia de la LMA en México es baja con respecto a los reportes de la incidencia mundial.¹¹ Se cree que pudiera ser por las diversas limitantes en nuestro país para la realización de un registro adecuado, es decir, como la falta de reportes de casos en zonas rurales o unidades urbanas, la incorrecta clasificación de los tipos de leucemia o las limitaciones del seguimiento por cambios a otras instituciones.

Las características clínicas de la población con LMA estudiada presentan datos de frecuencia similares a las que se reportan en la literatura.³⁴ Sin embargo, la edad de aparición que presentaron nuestro pacientes es menor a los reportes lo cual podría sugerir que la edad de aparición en nuestro país es en edades más tempranas.

En el presente trabajo se realizó la búsqueda de mutaciones en cuatro genes (*FLT3*, *NPM1*, *IDH1* e *IDH2*), la importancia de la detección de diversos biomarcadores en la LMA radica en que estos pueden darnos una valiosa información con respecto al tratamiento y pronóstico para cada uno de los pacientes. Debido a que la LMA es una enfermedad enormemente heterogénea y variable tanto en la evolución como en la clínica; hay que tomar en cuenta más de una característica para tratar de determinar su evolución o pronóstico (características clínicas, análisis molecular), ya que un solo marcador no nos dará la información necesaria para observar la evolución.

De los datos obtenidos en la búsqueda de las mutaciones las que se presentaron con mayor frecuencia fueron las mutaciones en el gen *FLT3* (*FLT3-IDT* y *D835Y*) con un 29 y 23% de frecuencia respectivamente, lo cual es similar a otros trabajos.^{10,35,36}

Las frecuencia de mutaciones en el gen *NPM1* fue de 42% (13 pacientes positivos) de las cuales la que presentó mayor frecuencia fue la mutación tipo A con 22.5% (TCTG), seguida de la mutación tipo B con 16.12% (CATG) y finalmente la mutación tipo D con un 3.2% (CCTG), las frecuencias de las mutaciones encontradas en los pacientes analizados son similares a lo reportado en la literatura.^{37,24}

En las mutaciones buscadas en los genes *IDH1/2* solo se encontró un paciente heterocigoto a la mutación *IDH1* (R132H), lo que podría sugerir que no tiene relevancia para la evolución de la enfermedad en nuestra población contrario a lo encontrado en la literatura.^{38,39}

El análisis de aCGH en los 31 pacientes con diagnóstico de LMA para tratar de determinar otros hallazgos que nos ayudaran a determinar el pronóstico en la evolución de los pacientes con LMA.

Inicialmente, se realizó una búsqueda de las regiones mínimas comunes que compartían todos nuestros pacientes; del total de nuestros pacientes 14 de ellos tenían un gran número de regiones alteradas 22,267, de las cuales 21,499 correspondían a delaciones (97%) y se encontraron 768 ganancias (3%).

Se encontraron deleciones en la mayoría de los cromosomas, los más afectados fueron 5q, 7, 15, 16, 17, 19 y 22, los cromosomas que presentaron ganancias fueron el 1, 3, 4, 8, 17 y 22, coincidiendo con la literatura en el número de regiones deletadas y con los cromosomas afectados, sin embargo, para las ganancias solo coincidimos con la trisomía del cromosoma 8.^{7,40}

Al evaluar tanto las características clínicas como moleculares y los hallazgos en el aCGH, se pudo observar que en algunos casos la sumatoria de todas las características coinciden con la evolución favorable o desfavorable de nuestros pacientes (ver tabla en anexo 2); sin embargo, en la gran mayoría de ellos no se puede observar una asociación clara de la evolución clínica, lo cual nos habla de la gran heterogeneidad de todas las características (clínica, molecular y genética) que hay en esta enfermedad, y que todas las variables son importantes pero también hay que tener en cuenta la genética y/o metabolismo de cada paciente.

En el grupo restante de pacientes que no se encontraron RMC (asociación de resultados), podemos destacar que tenemos mucha variabilidad y heterogeneidad en cuanto a los resultados que se obtuvieron, ya que muchos pacientes presentaron la mutación en el gen *FLT3* (reportada como de valor pronóstico desfavorable), la mayoría de estos pacientes evolucionó de forma favorable y no presenta correlación con la literatura.^{41,36} En este punto es importante resaltar que estos pacientes tenían una edad entre el rango de 16-35 años, lo que podría sugerir que les confiere una mayor ventaja contra los pacientes con mayor edad.

Un punto muy importante que también hay que resaltar es que la mayoría de los pacientes que tuvieron una evolución desfavorable presentaron deleciones en los cromosomas 5 y 7, reportados en la literatura como indicador de mal pronóstico,^{26,5} coincidiendo que es un indicador de muy mal pronóstico para los pacientes con LMA.

Un ejemplo de la importancia de tomar todas las características que se presentan en la LMA , tanto la clínica, las anormalidades moleculares y los hallazgos en el aCGH que se realizó en este trabajo podría ser resumido en estos dos ejemplos.

Dos de los pacientes (LMA-7) mostraron deleciones en el cromosoma 7; el paciente LMA-4 tuvo una edad avanzada (79 años), no presenta mutaciones en los genes analizados y tuvo una evolución favorable, mientras el paciente 7 es un joven de 22 años que tampoco presentó mutaciones en los genes analizados y evoluciono de forma desfavorable (falleció), al realizar un análisis más detallado en el aCGH se encontraron regiones similares deletadas en ambos pacientes, sin embargo el paciente 7 tiene una región deletadas en el 7q, la cual no la presenta el paciente 4, lo que coincide con la literatura, sugiriendo ser una de las causas de la mala evolución del paciente 7.

Por otra parte, los pacientes LMA-22 y LMA-23 con edades 56 años y 45 años respectivamente, presentaron trisomía del cromosoma 8, el paciente LMA-22 no presento ninguna de las mutaciones analizadas y tuvo una evolución favorable,

contrario al paciente 23 que tuvo la mutación en el gen *FLT3* y además presentó muchas anomalías cromosómicas determinadas por aCGH el cual tuvo una evolución desfavorable (falleció), aunque ambos pacientes presentaron la trisomía del cromosoma 8 (reportada dentro del grupo pronóstico intermedio), en el aCGH del paciente 23 se observaron muchas anomalías (deleciones en la mayoría de los cromosomas), lo que sugiere podría explicar la causa de la evolución desfavorable del paciente.

Con las observaciones anteriores podríamos hablar de que el uso del aCGH como herramienta pronóstica es de gran utilidad en este tipo de enfermedades tan heterogéneas y variables como es la LMA, además que no se puede tomar decisiones con resultados de una sola característica (clínica o cambios moleculares), sin tomar en cuenta un análisis más global o que nos proporcione más información, Sin embargo, es necesario realizar análisis estadísticos con un conjunto de muestras mayor.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Se diseñó, desarrolló e implementó una metodología para la detección de 8 mutaciones de 4 genes diferentes.
2. Se logró la detección de las mutaciones para los genes *FLT3* y *NPM1* mediante un panel por PCR multiplex, logrando identificar 2 y 3 mutaciones respectivamente.
3. Se determinaron las regiones mínimas comunes que comparten 14 de nuestros pacientes en los cuales se encuentran genes que participan directa o indirectamente en cáncer, vías de señalización como MAPK, JAK-STAT, p53, proliferación, supervivencia y apoptosis y LMA.
4. Se encontraron principalmente deleciones (97%) más que amplificaciones, la mayoría de los cromosomas presentan deleciones, los cromosomas más afectados fueron: 5q, 7, 15q, 16q, 17p, 18q, 20q y 22q).
5. Se encontraron hallazgos importantes en el grupo de pacientes que no presentó ninguna mutación (26%), lo cual nos podría dar una orientación para la evolución y entendimiento de la LMA.
6. Se realizó un análisis personalizado para cada uno de los pacientes con lo que observamos cambios significativos importantes lo que podría explicar la evolución favorable/desfavorable de la LMA.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Para una evaluación más completa es necesario analizar un mayor número de muestras para confirmar los resultados obtenidos y compararlos con estudios de expresión para determinar el valor de los genes que se encontraron con la metodología de aCGH, además de definir mejor las variables a tomar en cuenta y un análisis estadístico que apoye todas los hallazgos encontrados.

Por otra parte sería interesante evaluar los genes encontrados persistentemente en los diferentes análisis realizados (SPIB, NOTCH1, NCOR2, IL11, HRAS, TP53, ARID3A, CD4, WNT3, XRCC3, TP73, TNFRSF6B).

Debido a la gran cantidad de información generada mediante los análisis realizados por microarreglos, es necesario un análisis mas profundo para identificar nuevas rutas comunes relacionadas con esta enfermedad y que posiblemente pudieran ser útiles el pronóstico de esta patología.

CAPÍTULO 9

ANEXOS

Anexo 1

Microarreglos de genotipificación

Preparación para el marcaje de muestras

1. Prepare las siguientes soluciones en un tubo de 15 mL.

Random primer buffer	Formatos de todos los arreglos	notas
Random primer buffer (vial 2)	2,200 µL	Prepare buffer cada vez que los primers sean resuspendidos
β-mercaptoetanol*	4 µL	
total	2,204 µL	

*no use β-mercaptoetanol que se haya abierto desde mas de 6 meses.

2. Centrifugue brevemente los random nanomeros Cy3 y Cy5 (viales 3 y 4, respectivamente). Agregar 1,050 µL de buffer random primer con β-mercaptoetanol. Alicuotar 40 µL de volúmenes de reacciones individual en tubos de PCR de 0.2 mL y almacenar a -25°C, protegidos de la luz.
3. Monta el ensayo y la muestra de referencia en tubos de 0.2 mL de PCR

Todos los formatos de arreglos		
Componente	Muestra problema	Muestra de referencia
ADNg de muestra problema (preparada en el capítulo 2)	0.5 µg	0.5 µg
Diluir random nanomeros Cy3 del paso 2	40 µL	
Diluir random nanomeros Cy5 del paso 2		40 µL
LHC-1 (opcional)*	2 µL	
LHC-2 (opcional)*		2 µL
Agua grado PCR (vial 1)	Para un volumen de 80 µL	Para un volumen de 80 µL
Total	80 µL	80 µL

*Los controles de marcaje e hibridación LHC-1 y LHC-2 son compatibles con arreglos CGX-6 y CGX-12 (pero no CGX-3). La adición de LHC es opcional, pero recomendada para todos los diseños de arreglos que incluyen el LHC.

4. Desnaturalizar las muestras en un termociclador a 98 °C por 10 minutos. Enfriamiento rápido en hielo por 2 minutos.
5. Prepare el siguiente master mix (dNTP/Klenow) para cada muestra preparada en el paso 4.



Mantenga todos los reactivos del master mix (dNTP/klenow) en hielo.

Nota: No agite después de la adición de Klenow.

master mix (dNTP/Klenow) por muestra	Todos los formatos de arreglos
dNTP Mix (10 mM cada dNTP) (vial 6)	10 µL
Agua grado PCR (vial 1)	8 µL
Fragmento Klenow (3'→5' exo-) 50 U/µL (vial 5)	2 µL
Total	20 µL

6. Adicionar 20 µL dNTP/klenow master mix preparada en el paso 5 para cada una de las muestras desnaturalizadas preparadas en el paso 4.

Nota: Mantenerlas en hielo.

Todos los formatos de arreglos		
Componente	Muestra problema	Muestra de referencia
Volumen de reacción del paso 4	80 µL	80 µL
dNTP/klenow master mix del paso 5	20 µL	20 µL
total	100 µL	100 µL

7. Mezclar bien con la pipeta hacia arriba y hacia abajo 10 veces.

Nota: No agitar con vortex después de agregar Klenow.

8. Dar un spin para depositar el contenido en el fondo del tubo.
 9. Incubar por 2 horas a 37 °C en un termociclador con tapa caliente, protegido de la luz.
 10. Parar la reacción agregando la solución Stop.

Todos los formatos de arreglos		
Componente	Muestra problema	Muestra de referencia
Volumen de reacción del paso 10	100 µL	100 µL
Solución Stop	21.5 µL	21.5 µL
total	121.5 µL	121.5 µL

11. Agite brevemente, centrifugue y transfiera todo el contenido a un tubo de 1.5 mL conteniendo isopropanol.

Todos los formatos de arreglos		
Componente	Muestra problema	Muestra de referencia
Volumen de reacción del paso 10	121.5 µL	121.5 µL
Isopropanol	110 µL	110 µL
Total	231.5 µL	231.5 µL

12. Mezclar bien. Incubar a 15 a 25 °C por 10 minutos, protegidos de la luz.
13. Centrifugar a 12,000 x g por 10 minutos, remover el sobrenadante con una pipeta. La pastilla podría ser rosa (Cy3) o azul (Cy5) dependiendo del dye.
14. Lavar pastillas con 500 µL de etanol al 80% frio. Despegar la pastilla de la pared del tubo por pipeteo pocas veces.
15. Centrifugar a 12,000 x g por 2 minutos. Remover el sobrenadante con una pipeta.
16. Secar el contenido en un concentrador de ADN al vacío a calor bajo hasta que se seque (aproximadamente 5 minutos), protegido de la luz.
17. PUNTO DE PARO: Continuar con el paso 18 o almacenar las muestras marcadas de -15 a -25 °C (hasta un mes), protegido de la luz.
18. Centrifugue brevemente el tubo antes de abrir. Rehidrate cada pastilla en 25 µL con agua grado PCR (vial 1) por reacción.
19. Vortex por 30 segundos y spin para depositar el contenido en el botón del tubo. Continúe con vortex o deje reposar a 15 a 25 °C, protegidos de la luz, por aproximadamente 5 minutos o hasta que la pastilla este completamente rehidratada, después vortex y spin otra vez.
20. Cuantifique cada muestra:

Si usa un NanoDrop espectrofotómetro, referir a las instrucciones del fabricante para asegurar la exactitud de la cuantificación.

21. Basado en la concentración, calcule el volumen de la muestra problema y la muestra de referencia requerida para cada hibridación para la siguiente tabla y combine ambas muestras la de prueba y la de referencia en un tubo de 1.5 mL.

Requerimientos de la muestra	Arreglo CGX-3	Arreglo CGX-6	Arreglo CGX-12
Muestra problema	31 µg	25 µg	20 µg
Muestra de referencia	31 µg	25 µg	20 µg

22. Secar el contenido en un concentrador de ADN al vacío a calor bajo, protegido de la luz.

23. PUNTO DE PARO: Continuar con el capítulo 4 o almacenar las muestras marcadas a -25 °C (hasta un mes), protegido de la luz.

Hibridación y lavado

PASO 1: Preparación de las muestras para la hibridación

1. Prender el sistema de hibridación a 42 °C, con la tapa cerrada, por lo menos 3 horas antes de su uso para estabilizar la temperatura.

Tenga en cuenta que la temperatura del sistema de hibridación podría variar durante la estabilización.

2. Resuspenda las pastillas de las muestras secas en los controles de seguimiento de muestras (SCT) de acuerdo a la siguiente tabla. Use un único STC para resuspender cada muestra para ser hibridada. Tomar nota que cada STC es usado para cada muestra.

Si no está usando los SCT, resuspenda las pastillas de las muestras secas en un volumen equivalente de agua.



componente	Cada muestra para un arreglo CGX-3	Cada muestra para un arreglo CGX-6	Cada muestra para un arreglo CGX-12
Reactivo para resuspensión	SCT	SCT	SCT
Volumen para añadir a muestras marcadas con Cy del paso 23 del capítulo 3	5.6 µL	4.1 µL	3.3 µL

3. Mezclar y centrifugar para depositar el contenido en el fondo del tubo.
4. Vortex a cada componente del kit de NimbleGene Hybridization (aproximadamente 15 segundos) y spin para depositar el contenido en el fondo del tubo.
5. Prepare el master mix de la solución de hibridación de acuerdo a la siguiente tabla. La cantidad listada es suficiente para hibridar todos los arreglos en una laminilla. Para hibridar múltiples laminillas, ajustar las cantidades.

master mix de la solución de hibridación para hibridar una sola laminilla	arreglo CGX-3	arreglo CGX-6	arreglo CGX-12
Buffer para hibridación 2x (vial 1)	35 µL	55.4 µL	88.5 µL
Componente A de hibridación (vial 2)	14 µL	22.1 µL	35.4 µL
Oligo de alineamiento	1.4 µL	2.3 µL	3.6 µL
total	50.4 µL	79.8 µL	127.5 µL

6. Adicionar las cantidades adecuadas de solución de hibridación a cada par de muestras de acuerdo a la siguiente tabla.

componente	Cada par de muestras para un arreglo CGX-3	Cada par de muestras para un arreglo CGX-6	Cada par de muestras para un arreglo CGX-12
Muestras resuspendidas del paso 2	5.6 µL	4.1 µL	3.3 µL
Solución de hibridación del paso 5	14.4 µL	10.9 µL	8.7 µL
total	20 µL	15 µL	12 µL

- Vortex (aproximadamente 15 segundos) y spin para depositar el contenido en el botón del tubo. Incubar a 95 °C por 5 minutos, protegido de la luz.
- Colocar los tubos a 42 °C (en el bloque del sistema de hibridación de la muestra o en termo-bloque) por lo menos 5 minutos o hasta que esté listo para cargar las muestra. Vortex y spin antes de la carga.

PASO 2: Preparación del mixer

- Localizar los mixer adecuados. Remover de su empaque.

Cargue las muestras dentro de los 30 minutos de la apertura de los paquetes del mixer, evitar la formación de burbujas durante la carga y / o hibridación.

Formato de arreglo	Mezcla
arreglo CGX-3	HX3 mixer
arreglo CGX-6	HX6 mixer
arreglo CGX-12	HX12 mixer

- Coloque la herramienta de alineamiento del mezclador de precisión (PMAT) con la bisagra a la izquierda. Abra la PMAT (Figura 3).

3. Ajustar el mixer sobre los dos pasadores de alineación en la tapa de la PMAT con la lengüeta en el extremo del mixer hacia el interior de la bisagra y el conjunto adhesivo del mixer hacia afuera (Figura 3).
4. Empujando hacia atrás el resorte de plástico con el pulgar, colocar la laminilla en la base del PMAT de modo que el código de barras este a la derecha y la esquina de la laminilla se asienta contra el resorte de plástico. El logotipo y el número de código de barras de NimbleGen debe ser legible. Retire el dedo pulgar y asegúrese de que el resorte este presionando la esquina de la laminilla y el registro de la laminilla debe estar en el borde derecho de la PMAT y más cercano a usted. Además, asegúrese de que la laminilla está ajustada al PMAT.

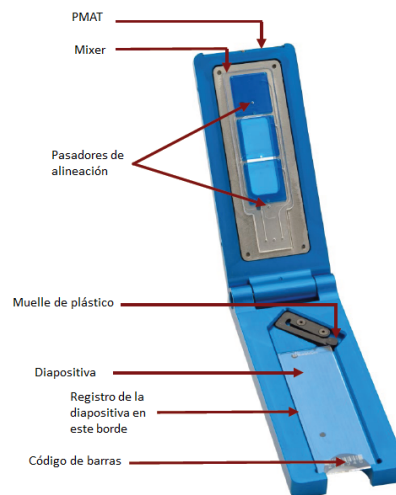


Figura 3. PMAT con HX3 mixer y laminilla. Para propósitos de fotografía, el color azul fue utilizado para mostrar la ubicación de las cámaras de hibridación del mixer.

Usando pinzas, retirar el apoyo del conjunto adhesivo del mixer y cerrar la tapa de la PMAT a modo que el conjunto haga contacto con la laminilla.

5. Remueva el conjunto mixer-laminilla de la PMAT.

6. Coloque el conjunto mixer-laminilla en la parte posterior de un termo-bloque 42 °C durante 5 minutos para facilitar la adhesión del mixer a la laminilla.
7. Frote el mixer brayer sobre el mixer con presión moderada para adherir el conjunto adhesivo y remover las burbujas. Para los mixers HX3, HX6 y HX12, primero utiliza un extremo del mixer brayer para frotar los límites entre el arreglo y la laminilla y luego frotar alrededor del exterior de los arreglos. El conjunto adhesivo se aclarara cuando este completamente adherida a ambas superficies.
8. Coloque el conjunto mixer-laminilla en el puerto de la laminilla en el sistema de hibridación.

PASO 3: Carga e hibridación de muestras

1. Usando la pipeta apropiada (Gilson Microman), dispensar el volumen apropiado de la muestra en el orificio de llenado. para cada formato de arreglo:

Componente	arreglo CGX-3	arreglo CGX-6	arreglo CGX-12
Ejemplo de volumen de carga	18 µL	12 µL	6 µL
Punta de la pipeta	CP100	CP100	CP10*
*La puntilla CP10 es delgada flexible. Coloque el pulgar y el dedo índice de su mano libre en la punta para guiarla al orificio de llenado			

2. Cerrar la tapa.
3. Encienda el panel de mezcla en el sistema de hibridación, en modo de mix B, y presione el botón de mix para empezar a mezclar. Confirme que

el sistema de hibridación reconozca la laminilla en cada puerto ocupado por la laminilla (la luz se vuelve verde).

4. Aproximadamente 10 minutos después de comenzar el sistema de hibridación.
 - Asegúrese de que el modo de mezcla se ajusta a B.
 - Asegúrese de que la luz verde se muestra para todas las estaciones ocupadas.
5. Las muestras se hibridan a 42 °C por 40-72 horas.

Nota: NimbleGen Roche ha encontrado que tiempos más largos de hibridación generan una mayor señal, lo que puede ser beneficioso para algunos experimentos.

PASO 4: Lavado de arreglos hibridados

1. Localizar los componentes de buffer de lavado del kit de NimbleGene.

Antes del primer uso del kit de solución de lavado, reconstituya el DTT. En una campana de extracción, prepare la solución de DTT 1M mediante la adición de 1.2 mL de agua (vial 5) a cada tubo de DTT seco (vial 4). Después de la reconstitución, almacenar las soluciones de DTT 1M a -25 °C.

2. Antes de retirar el mixer de laminillas del sistema de hibridación, preparar las soluciones de lavado I, II y III de acuerdo a las siguientes tablas. Tenga en cuenta de preparar dos recipientes de solución de lavado I.

Lavado de varias laminillas	Wash I	Wash I, II y III
Agua VWR	243 mL	243 mL
Buffer de lavado 10x I, II o III (vial 1, 2 o 3)	27 mL	27 ml
Solución 1M DTT del paso 1	27 mL	27 ml
total	270 mL	270 ml

Lavado de una laminilla	Wash I	Wash I, II y III
Agua VWR	243 mL	24.3 mL
Buffer de lavado 10x I, II o III (vial 1, 2 o 3)	27 mL	2.7 ml
Solución 1M DTT del paso 1	27 mL	2.7 ml
total	270 mL	27 ml

3. Para facilitar la eliminación de la mezcla, calentar la solución de lavado a 42°C, colocar el Wash I en un plato poco profundo. Mantenga las otras tres soluciones de lavado a temperatura ambiente (15-25 °C).
4. Inserte la herramienta de desmontaje del mixer en el plato hondo que contiene el Wash I a 42 °C.
5. Retirar el conjunto de mixer-laminilla del sistema de hibridación y cargarlo en la herramienta de desmontaje de mezclas sumergido en el plato hondo que contiene el wash I a 42 °C.
6. Con el conjunto mixer-laminilla sumergida, quite con cuidado el mixer fuera de la laminilla. Es importante sostener la herramienta de desmontaje del mixer mientras se elimina el mixer y evitar cualquier movimiento horizontal o raspado con mixer a través de la laminilla. No toque la superficie de la laminilla.

El mixer es extremadamente flexible. Jalar el mixer poco a poco para no romper la laminilla.

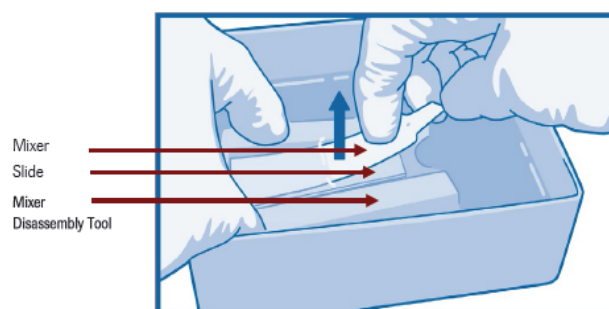


Figura 7. Usando la herramienta de desmontaje del mixer remueva la laminilla del mixer.

7. Trabaje rápidamente, deseche el mixer y remueva la laminilla de la herramienta de desmontaje del mixer.
8. Agitar suavemente la laminilla durante 10-15 segundos en el plato hondo que contiene wash I a 42 °C para eliminar rápidamente el buffer de hibridación.

Los usuarios de racks de laminillas: Para garantizar la alta calidad de datos, asegúrese de que el área del microarreglo de la laminilla permanezca húmedo todo el tiempo durante todos los pasos de lavado.

9. Lavar durante otros 2 minutos con wash I a temperatura ambiente con agitación vigorosa, constante. Si es necesario lavar varias laminillas, mover la parrilla hacia arriba y hacia abajo con agitación suficiente para hacer espuma. Si lava una laminilla, agitar el envase de laminillas por lo menos 20 veces cada 10 segundos.

No permita que las laminillas se sequen entre los pasos de lavado.

10. Traslade la laminilla(s) a la solución de lavado III y lave durante 15 segundos con agitación constante y vigorosa.
11. Retire la laminilla(s) de la solución de lavado III. Inmediatamente centrifugar en una secadora de microarreglos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante durante 30 segundos.
12. Retire la laminilla(s) de la secadora de microarreglos. Secar los bordes con papel sin pelusa para eliminar la humedad residual de los bordes de las laminillas.
13. Proceder de inmediato a los pasos para la digitalización del arreglo(s).

Anexo 2

	DATOS CLÍNICOS										MUTACIONES GENES					
	Edad	FAB	Leucos	Hb	Plao	Dx de novo	Citogenética	Estatus	IDT	FLT3	NPM1			IDH1	IDH2	aCGH
											WT	A	B			
LMA-1	32	M5	8400	12.9	250000	SI	NO	vivo	neg. neg.	D835Y	SI	POS	HN	HN	HN	PAR 14, 15, 16, 17
LMA-2	18	M2	8350	13.4	26100	NO	NO	vivo	neg. neg.		SI		HN	HN	HN	PAR 9, 17, 22
LMA-3	27	M5	6010	13	25300	NO	NO	vivo	neg. neg.			POS	HN	HN	HN	NO
LMA-4	79	M4	DN	DN	DN	SI	NO	vivo	neg. neg.		SI	POS	HN	HN	HN	DEL 7/C. COMPLEJO
LMA-5	41	M2	1630	6.5	27400	NO	t(8:21)	muerto	neg. neg.		SI		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-6	36	M3	32800	8.6	46000	NO	NO	muerto	neg. neg.		SI	POS	HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-7	22	M2	6780	5.7	24400	SI	NO	muerto	neg. neg.		SI		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-8	47	M4	700	4.7	15000	SI	NO	muerto	pos		SI		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-9	45	M2	1360	4.71	24400	SI	NO	vivo	neg. neg.		si		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-10	59	M3	2650	4.2	15000	SI	NO	muerto	neg. neg.		si		HN	HN	HN	PAR 16, 17, 18, 19, 22
LMA-11	25	M2	1530	8.7	5400	NO	NO	muerto	pos			pos	HN	HN	HN	PAR 14, 15, 16, 17
LMA-12	27	M2	48890	9.4	30000	SI	NO	muerto	neg. pos			pos	HN	HN	HN	DUP PAR 1,2,3,4,5
LMA-13	17	M3	>10000	15.1	5000	SI	t(15:17)	vivo	neg. pos		si		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-14	52	M2	7370	16.2	67000	SI	47,XY t(3:14)	vivo	neg. neg.		si		HN	HN	HN	PAR 1, 2, 14, 15, 16, 17
LMA-15	49	M2	1330	8.2	126400	SI	NO	vivo	pos. neg.		si	pos	HN	HN	HN	PAR 1, 8, 16, 17
LMA-16	34	M2	DN	DN	DN	NO	NO	vivo	neg. neg.		SI		HN	HN	HN	C. COMPLEJO



LMA-17	78	M5	DN	DN	DN	SI	NO	vivo	pos	pos	SI		POS	HN	HN	HN	PAR 1,9,17
LMA-18	52	M2	23130	8.6	14980	NO	NO	vivo	pos	pos		pos		HN	HN	HN	PAR 14, 15, 16, 17
LMA-19	70	M2	DN	DN	DN	NO	NO	vivo	pos	pos	SI			HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-20	39	M5	700	5.5	12000	NO	NO	muerto	DEG.	DEG.	SI			HN	HN	HN	PAR 9,14, 15, 16
LMA-21	25	M2	2960	10.3	81000	NO	NORMAL	vivo	pos	DEG.	SI			HN	HN	HN	NO
LMA-22	56	M4	ND	ND	ND	SI	NO	vivo	DEG.	DEG.	SI			HN	HN	HN	TRI 8
LMA-23	45	M4	ND	ND	ND	SI	NO	vivo	pos	DEG.	SI		POS	HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-24	63	M1	198000	4.11	50000	SI	NORMAL	muerto	DEG.	DEG.	SI			HN	Hetero	HN	PAR 19, 22
LMA-25	16	M4	ND	ND	ND	SI	NO	muerto	DEG.	DEG.		pos		HN	HN	HN	PAR 4,8,10,19,22
LMA-26	71	M1	233600	12.1	31400	SI	NO	muerto	DEG.	DEG.		pos		HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-27	39	M2	17400	5.4	18900	SI	NO	muerto	DEG.	DEG.	SI			HN	HN	HN	PAR 8, 15, 16, 17
LMA-28	16	M2	29700	6.3	15000	SI	NORMAL	vivo	DEG.	DEG.	SI			HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-29	56	M4	4000	3.7	11000	NO	NORMAL	vivo	DEG.	DEG.	SI	pos		HN	HN	HN	NO
LMA-30	45	M2	2600	8.2	45000	NO	45 X-Y (18-21)	vivo	pos	DEG.	SI			HN	HN	HN	C. COMPLEJO
LMA-31	68	M2	60570	12.3	70000	NO	NO	muerto	pos	DEG.	SI	pos		HN	HN	HN	PAR 1, 16, 17, 18, 19

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

1. De Jonge, H. J. M., Huls, G. & De Bont, E. S. J. M. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia. *The Netherlands journal of medicine* **69**, 167–76 (2011).
2. Lichtman MA, L. J. Acute Mielogenous Leukemia; Acute lymphoblastyc leukemia. *En Williams Hematology*. 1048–1143 (2001).
3. Gulley, M. L., Shea, T. C. & Fedoriw, Y. Genetic tests to evaluate prognosis and predict therapeutic response in acute myeloid leukemia. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **12**, 3–16 (2010).
4. Vucic, E. A., Thu, K. L., Williams, A. C., Lam, W. L. & Coe, B. P. Genetic Variation. **628**, 103–117 (2010).
5. Byrd, J. C. *et al.* Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, 4325–36 (2002).
6. Haferlach T, Kern W, Schnittger S, S. C. Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* **56**, 223–234 (2005).
7. Itzhar, N. *et al.* Chromosomal minimal critical regions in therapy-related leukemia appear different from those of de novo leukemia by high-resolution aCGH. *PloS one* **6**, e16623 (2011).
8. Leone, G., Pagano, L., Ben-Yehuda, D. & Voso, M. T. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* **92**, 1389–1398 (2007).
9. Stone, R. M., Donnell, M. R. O. & Sekeres, M. A. Acute Myeloid Leukemia.
10. Kumar, C. C. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes & cancer* **2**, 95–107 (2011).
11. SEER cancer statistics. at <<http://seer.cancer.gov/statistics/>>



12. Gomez, L. T. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *cancerología* **2**, 109–120 (2007).
13. Gilliland, D. G., Jordan, C. T. & Felix, C. a The molecular basis of leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 80–97 (2004).doi:10.1182/asheducation-2004.1.80
14. Neame, P. B. *et al.* Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood* **68**, 1355–62 (1986).
15. Ballabio, E. *et al.* Genomic imbalances are confined to non-proliferating cells in paediatric patients with acute myeloid leukaemia and a normal or incomplete karyotype. *PloS one* **6**, e20607 (2011).
16. Verhaak, R. G. W. *et al.* Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukbased on gene expression profiling. *Haematologica* **94**, 131–4 (2009).
17. Takahashi, S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology* **4**, 36 (2011).
18. Fröhling, S. *et al.* Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. 1909–1918 (2008).
19. Ensemble. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sum
20. Keith W. Pratz¹ and Mark J. Levis¹, * Bench to Bedside Targeting of FLT3 in Acute Leukemia. *Curr Drug Targets* **7**, 781–789. (2010).
21. Mark Levis, keith P. K. & Bench to Bedside Targeting of FLT3 in Acute Leukemia. *Curr Drug Targets* **11 (7)**, 781–789 (2010).
22. Gilliland, D. G. & Griffin, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532–42 (2002).
23. Peng, H.-L. *et al.* Fms-like Tyrosine Kinase (FLT) 3 and FLT3 Internal Tandem Duplication in Different Types of Adult Leukemia: Analysis of 147 Patients. *Croatian Medical Journal* **49**, 650–659 (2008).

24. Hatzimichael, E., Georgiou, G., Benetatos, L. & Briasoulis, E. Gene mutations and molecularly targeted therapies in acute myeloid leukemia. *American journal of blood research* **3**, 29–51 (2013).
25. Kristensen, T., Vestergaard, H. & Møller, M. B. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **13**, 180–8 (2011).
26. Foran, J. M. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2010**, 47–55 (2010).
27. Dufour, A. *et al.* Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 570–7 (2010).
28. Grimwade, D. & Hills, R. K. Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 385–95 (2009).doi:10.1182/asheducation-2009.1.385
29. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, V. Z.-B. S., Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, Nieuwint A, Jotterand M, H. & A, Beverloo HB, L. B. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* **26**, 4791–4797 (2008).
30. Shao, L. *et al.* Array comparative genomic hybridization detects chromosomal abnormalities in hematological cancers that are not detected by conventional cytogenetics. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **12**, 670–9 (2010).
31. Mullighan CG, Goorha S, R. I. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764 (2007).
32. Eklund, E. A. Genomic Analysis of Acute Myeloid Leukemia; Potential for New Prognostic Indicators. *NIH Public Access* **17**, 75–78 (2010).

33. Geng, H., Iqbal, J., Chan, W. C. & Ali, H. H. Virtual CGH: an integrative approach to predict genetic abnormalities from gene expression microarray data applied in lymphoma. *BMC medical genomics* **4**, 32 (2011).
34. BOB LÖWENBERG, J. R. D. A. A. B. Acute Myeloid Leukemia. *Medical progress* **341-14**, 1051–1062 (2005).
35. Levis, M. & Small, D. FLT3: ITDoes matter in leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **17**, 1738–52 (2003).
36. Wagner, K. *et al.* FLT3-internal tandem duplication and age are the major prognostic factors in patients with relapsed acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica* **96**, 681–6 (2011).
37. Verhaak, R. G. W. *et al.* Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* **106**, 3747–54 (2005).
38. Keane, M. Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms Responses to 2009 H1N1 Vaccine in Children 3 to 17 Years of Age. 369–370 (2010).
39. Chotirat, S., Thongnoppakhun, W., Promsuwicha, O., Boonthimat, C. & Auewarakul, C. U. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *Journal of hematology & oncology* **5**, 5 (2012).
40. Parkin, B. *et al.* Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **116**, 4958–67 (2010).
41. Park, S. H. *et al.* Prognostic significance of the FLT3 ITD mutation in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia in relapse. *The Korean journal of hematology* **46**, 88–95 (2011).