


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on a white horse, holding a staff. Above him is a golden crown with a cross on top. To the left and right are golden pillars topped with crowns. The background is a light blue sky with a golden lion rampant on the right. The entire scene is set against a green landscape with two hills. The Latin motto "CETERA SORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.


DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL TRANSCRITO AML1-ETO POR RT-PCR EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA PROCEDENTES DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA).

LUISA FERNANDA ROSALES HERNÁNDEZ

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, MARZO DE 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man on a white horse, holding a staff and a banner. Above him is a golden dome with a cross, flanked by two golden lions. The background is blue with green hills at the bottom. The Latin motto "CETERAS CRIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Determinación de la frecuencia del transcrito *AML1-ETO* por RT-PCR
en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia
mieloide aguda (LMA).**

Informe de Tesis

Presentado por

Luisa Fernanda Rosales Hernández

Para optar al título de

Química Bióloga

Guatemala, marzo de 2019

JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A veces volteo al cielo, sonrío y digo, “Yo sé que fuiste Tú”. Gracias por ser la guía en mi camino.

A MIS PADRES

Por su apoyo incondicional. Gracias por ayudarme a salir adelante.

A INVEGEM

Por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, que contribuyó en mi formación profesional.

A LA FUNDACIÓN ROZAS BOTRÁN

Por su apoyo e impulso para fundar INVEGEM, por creer en los profesionales guatemaltecos.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

En especial a la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por brindarme la preparación adecuada para la formación como profesional.

A MIS ASESORAS DE TESIS

Por su guía en la realización de esta investigación.

A MI REVISORA

Por su apoyo para culminar esta investigación.

A MIS COMPAÑEROS DE INVEGEM

Por su apoyo y acompañamiento.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Por ser unos padres amorosos, que con su ejemplo nos guían a ser mejores personas.

A MIS HERMANOS

Por su apoyo cuando lo necesité.

A MIS HIJOS

Por ser la fuerza que impulsa mi diario vivir.

A SAMUEL

Por ser la persona con la que puedo confiar incondicionalmente, por nuestra gran amistad y por todo el amor entre nosotros.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	5
II.	INTRODUCCIÓN	7
III.	ANTECEDENTES	9
A.	Clasificación de la leucemia mieloide aguda (LMA).....	10
1.	Clasificación de la LMA según el sistema FAB.....	11
2.	Clasificación de la LMA según la OMS	11
B.	Diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA)	12
C.	Genética de la leucemia mieloide aguda (LMA).....	13
1.	Mutación <i>AML1-ETO</i>	14
D.	Características de LMA con <i>AML1-ETO</i> positivo.....	16
E.	Pronóstico de pacientes con LMA	17
F.	Tratamiento de la LMA.....	19
IV.	JUSTIFICACIÓN	21
V.	OBJETIVOS	23
A.	Objetivo general	23
B.	Objetivos específicos	23
VI.	HIPÓTESIS.....	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
A.	Universo (población).....	25
B.	Muestra	25
1.	Criterios de inclusión	25
2.	Criterios de exclusión	25
C.	Materiales	25
1.	Consentimiento informado.....	25
2.	Equipos	26
3.	Reactivos	26
4.	Insumos	27

D.	Métodos.....	28
1.	Solicitud de información y consentimiento informado	28
2.	Recolección de las muestras:	28
3.	Separación de glóbulos blancos	28
4.	Extracción de ARN	29
5.	Cuantificación de ARN.....	30
6.	Retrotranscripción (RT-PCR).....	31
7.	Realización de PCR de punto final	32
c)	Electroforesis en gel de agarosa	35
E.	Diseño del estudio	36
1.	Tipo de estudio	36
2.	Tipo de muestreo:	36
F.	Análisis de datos	36
1.	Descripción de las características de la muestra	36
2.	Descripción de la presencia o ausencia del gen quimérico <i>AML1-ETO</i>	36
VIII.	RESULTADOS.....	37
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
X.	CONCLUSIONES.....	44
XI.	RECOMENDACIONES	45
XII.	REFERENCIAS.....	46
XIII.	ANEXOS	54

I. RESUMEN

En Guatemala se inició recientemente la caracterización genética de los pacientes con LMA, ya que, debido a la variabilidad étnica y al mestizaje de la población del país, se hace necesario generar este tipo de información, la cual incide sobre el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de cada paciente, con el propósito de lograr un buen manejo del tratamiento personalizado.

Como parte de esta iniciativa se realizó este estudio, cuyo objetivo fue determinar la frecuencia del apareamiento del transcrito *AML1-ETO* por RT-PCR en muestras de médula ósea de 150 pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) procedentes de diferentes regiones del país.

La translocación $t(8;21)(q22;q22)$ origina el gen quimérico *AML1-ETO*. Es utilizada como marcador de pronóstico y permite la clasificación de riesgo, ya que su presencia se asocia a un pronóstico favorable y menores tasas de recaídas en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA).

Las muestras de médula ósea fueron referidas por los hospitales nacionales al INVEGEM, donde se les realizó la separación y almacenamiento de glóbulos blancos para su posterior extracción de ARN, el cual se realizó según el método de precipitación con Trizol®. Luego se cuantificó el material genético extraído a través de espectrofotometría de fluorescencia, posteriormente se realizó la detección del transcrito *AML1-ETO* y del gen control *ABL* por medio de RT-PCR; finalmente los productos fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con GelRed®.

El análisis de los resultados del estudio mostró que la frecuencia de aparición del transcrito *AML1-ETO* fue de 18.7% IC95% [12.3, 25.0], lo cual concuerda con estudios internacionales que reportan frecuencias similares. Así mismo, el análisis de la relación entre la frecuencia del transcrito del gen quimérico *AML1-ETO* y las características hematológicas estableció que existe una diferencia significativa ($p= 0.007$) entre los recuentos plaquetarios de los pacientes que presentan el transcrito *AML1-ETO* y los que no lo presentan. Este hallazgo es frecuente en este tipo de pacientes y no es específico de la población guatemalteca, ya que en condiciones normales el gen *AML1* codifica para la proteína CBF α , que junto a la proteína CBF β forman el complejo CBF (factor de unión nuclear) que es un factor de transcripción esencial para una adecuada hematopoyesis.

En la población estudiada no se encontró asociación significativa entre la presencia del transcrito del gen quimérico *AML1-ETO* y las características demográficas de los pacientes, sin embargo, la frecuencia de la enfermedad fue mayor en el sexo femenino y pacientes originarios del suroccidente del país. Otro hallazgo interesante fue que el transcrito se detectó más frecuentemente en niños de 0-17 años, a diferencia de otras etnias en las que aparece principalmente en edad adulta.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la población guatemalteca con LMA presenta el transcrito *AML1-ETO* con una frecuencia similar a la reportada en otros países, aunque aparece más frecuentemente en la niñez, a diferencia de otras etnias. Así mismo, en concordancia con estudios realizados internacionalmente, se encontró que la presencia de dicho transcrito no presenta una asociación estadísticamente significativa de los conteos leucocitarios ni eritrocitarios y que está asociado con trombocitopenia.

Los hallazgos de este estudio demuestran la necesidad de realizar análisis moleculares en la población leucémica guatemalteca, ya que, conocer de las características genéticas específicas del país permitirán al médico tratante orientar el tratamiento y al pronóstico del paciente de forma personalizada desde el principio, lo cual mejorará considerablemente sus posibilidades de recuperación y supervivencia.

II. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la patogénesis de las neoplasias hematológicas permite orientar el pronóstico de la enfermedad y la terapia que debe administrarse. La aplicación de técnicas de biología molecular que permitan identificar marcadores genéticos es cada vez más útil y necesaria en estas enfermedades, ya que permiten la detección de diversas alteraciones en los cromosomas, tanto del tipo numéricas como estructurales, implicadas en el desarrollo de la enfermedad (Contreras, Silva, & Mateus, 2009).

Durante la década de 1960 las alteraciones en cromosomas se detectaban por cariotipo usando la tinción de Giemsa o Wright. Sin embargo, en los últimos 20 años los avances clínicos, biomoleculares y citogenéticos han permitido desarrollar técnicas con mayor sensibilidad, tales como la hibridación *in-situ* fluorescente (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última la más sensible de todas (Mrózek et al., 2001).

La leucemia mieloide aguda (LMA) constituye un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas con diversas anomalías genéticas, las cuales presentan diferencias en la respuesta al tratamiento (Löwenberg, Griffin, & Tallman, 2003). En 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la integración de la citogenética junto con la biología molecular a las técnicas clásicas (citología e inmunología) para la clasificación de las neoplasias hematológicas, con el fin de identificar marcadores genéticos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Swerdlow et al., 2016).

La patogénesis de la LMA está asociada a diversas mutaciones genéticas; según Ferrara y Del Vecchio (2002) las mutaciones más frecuentes son la translocación $t(8;21)(q22;q22)$, presente en un 12% de los casos, la translocación $t(15;17)(q22;q11-12)(PML-RAR\alpha)$ presente en un 10-15% de los casos y la inversión del cromosoma 16 $inv(16)(p13q22)$ en un 5% de los pacientes.

La translocación $t(8;21)(q22; q22)$, producida entre el cromosoma 8 y el cromosoma 21, genera la fusión de los genes *AML1* y *ETO* y la producción de la proteína AML1-ETO, que tiene un papel inhibitorio en la diferenciación hematopoyética normal (Dunne et al., 2010). Recientemente se ha utilizado como un marcador genético asociado a bajo riesgo de recaída y a un pronóstico favorable

en pacientes con LMA (Yu et al., 2018), reportándose tasas de remisión de la enfermedad de 87% después del tratamiento en los pacientes que la presentan (Llimpe et al., 2013).

La incidencia de la LMA se ha reportado con mayor frecuencia en la edad adulta, por ejemplo, en Estados Unidos reportan 2.4 casos al año por 100,000 habitantes y en México se reporta una incidencia de 0.7 casos por 100,000 habitantes por año (Crespo-Solís, 2010).

Desde el año 2012 se han iniciado en Guatemala la caracterización genética de la población con LMA, y como parte esta caracterización el presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la frecuencia del gen quimérico *AML1-ETO* en pacientes guatemaltecos con la enfermedad. Además, se determinó la asociación existente entre la presencia del transcrito *AML1-ETO* y las características hematológicas y demográficas, con la finalidad de generar información que servirá de referencia a la comunidad médica y científica interesada en el tema.

III. ANTECEDENTES

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica que se caracteriza por un incremento superior al 20% de células mieloides inmaduras (blastos) y por la rápida proliferación de células anormales que se acumulan en la médula ósea, lo que frecuentemente conlleva a una insuficiencia hematopoyética, granulocitopenia, trombocitopenia o anemia, con o sin leucocitosis (Döhner et al., 2010), sin embargo la presencia de la mutación *AML1-ETO* se ha reportado en porcentajes menores de blastos (Arber, Stein, Carter, & Slovak, 2003).

Las manifestaciones clínicas y síntomas relacionados con la LMA son diversos e inespecíficos. Los principales síntomas incluyen fatiga, fiebre, dificultad respiratoria, aparición de hematomas, alteraciones en la coagulación y aumento del riesgo de infección. Los síntomas son directamente atribuidos a la invasión de células cancerígenas a la médula ósea, lo cual conlleva a un descenso de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos normales en sangre (Jaffe, Harris, Stein, & Vardiman, 2001).

La propagación extramedular de las células leucémicas ocasiona alteraciones inespecíficas en diversos tejidos como el hígado (hepatomegalia), bazo (esplenomegalia), piel (cutis leucémico), nódulos linfáticos (linfadenopatía), huesos (dolor óseo), gingiva y sistema nervioso central, que pueden causar diversos síntomas asociados (Reikvam et al., 2011).

Existen factores de riesgo asociados al desarrollo de LMA (Tabla 1), dentro los cuales se pueden mencionar desórdenes genéticos, exposiciones a agentes físicos o químicos, quimioterapias, exposición a radiación (Kelly & Gilliland, 2002).

La LMA presenta mayor incidencia en adultos, aproximadamente de 2-3/100,000 casos año, con un incremento progresivo asociado a la edad, hasta alcanzar un pico de 12.6/100,000 casos en pacientes mayores de 65 años (Harrison et al., 2010; Yu et al., 2018).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a LMA

Tipo	Factor
Genético	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Down • Síndrome de Klinefelter • Síndrome de Patau • Ataxia telangiectasia • Síndrome de Schwachman • Síndrome de Kostman • Neurofibromatosis • Anemia de Fanconi • Síndrome Li-Fraumeni
Exposición a agentes físicos y químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Benceno • Drogas como pipobromano • Pesticidas • Humo de cigarrillo • Fluidos de embalsamiento • Herbicidas
Quimioterapia	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes alquilantes • Inhibidores de la topoisomerasa II • Antraciclinas
Exposición a radiación	<ul style="list-style-type: none"> • No terapéutica • Radiación terapéutica

Fuente: Kelly, L., & Gilliland, D. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 179-198.

A. Clasificación de la leucemia mieloide aguda (LMA)

Las LMA se pueden clasificar según dos criterios; el primero fue propuesto en la década de los 70's por el sistema Franco-Américo-Británico (FAB), el cual se basa en criterios morfológicos y citoquímicos. El segundo criterio surgió en el año 1999, el cual fue propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS); éste incorpora las anomalías genéticas asociadas con los subgrupos de LMA, además de las características morfológicas y citoquímicas (Harris et al., 2000).

1. Clasificación de la LMA según el sistema FAB

Como se observa en la tabla 2, en este sistema la LMA se clasifica en 8 subtipos, desde M0 al M7, basándose en el tipo de células leucémicas y el grado de madurez. Los subtipos M0 al M5 comienzan todos en los precursores de los glóbulos blancos. La LMA M6 comienza en formas muy tempranas de glóbulos rojos, mientras que la LMA M7 se inicia en formas tempranas de células que producen plaquetas (Bennett et al., 1985).

Tabla 2. Clasificación según el sistema FAB de la LMA

Clasificación	Morfología	Frecuencia (%)
M0	*LMA sin diferenciación	3
M1	LMA sin maduración	15-20
M2	LMA con maduración granulocítica	25-30
M3 y M3 variante	**LPA hipergranular y LPA hipogranular	5-10
M4 y M4Eo	LMA mielomonocítica sin y con eosinófilos (Eo)	25-30
M5a y M5b	LMA monoblástica y LMA monocítica	2-10
M6	LMA eritroide	3-5
M7	LMA megacarioblástica	3-12

Fuente: Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, h., & Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann.Intern.Med*, 103, 620-625. *LMA: Leucemia mieloide aguda; ** Leucemia promielocítica aguda.

2. Clasificación de la LMA según la OMS

En 1999 la OMS realizó cambios en la clasificación de la LMA, se conservaron los elementos de la clasificación FAB (morfología, inmunofenotipo, citoquímica, características clínicas) pero estableció que debe existir un 20% de blastos en médula ósea para realizar el diagnóstico de LMA; otro de los principales cambios realizados fue el incluir las anomalías genéticas (tabla 3) asociadas con la LMA (Harris et al., 2000).

Tabla 3. Clasificación según la OMS de la LMA

Clasificación	Subgrupo	Frecuencia (%)
*LMA con alteraciones citogenéticas recurrentes	• LMA con $t(8;21)(q22;22)(AML1-ETO)$	5-12
	• LMA con $t(15;17)(q22;q11-12)(PML-RAR\alpha)$ y variantes	
	• LMA con $inv(16)(p13;q22)$ o $t(16;16)(p13;q11)(CBF\beta-MYH11)$	10-15
	• LMA con anomalías de $11q23 (MLL)$	5
LMA con displasia multilineal	• Con **SMD previo	3-5
	• Sin SMD previo	10-15
LMA y SMD relacionados con tratamiento	• Agentes alquilantes inhibidores de la topoisomerasa II	5-10
LMA no clasificable	• LMA mínimamente diferenciada	40-50
	• LMA sin maduración	
	• LMA con maduración	
	• Leucemia aguda mielomonocítica	
	• Leucemia aguda monoblástica o monocítica	
	• Leucemia aguda eritroide	
	• Leucemia aguda megacarioblástica	
	• Leucemia aguda basofílica	
• Panmielosis aguda con mielofibrosis		
• Sarcoma mieloide		
Leucemia aguda bifenotípicas		<5

Fuente: (Harris, N., Jaffe, E., Dieblod, J., Flandrin, G., Mueller-Hermelink, H., Vardiman, J. et al. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House. *J. Clin. Oncol.*, 17, 3835-3849). * LMA: Leucemia mieloide aguda, ** Síndrome mielodisplásico.

B. Diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA)

El diagnóstico primario de LMA parte de alteraciones en el hemograma, observación de mieloblastos en preparaciones de extendidos de sangre periférica y de médula ósea teñidos con coloración de Wright o Giemsa. Estas células están caracterizadas por presentar un núcleo redondo

a irregular, en el citoplasma frecuentemente contiene finos gránulos azurófilos y un número variable de cuerpos de Auer (Bennett et al., 1985).

Es necesario realizar un diagnóstico diferencial de la LMA con la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y de los síndromes mielodisplásicos (SMD) o LMA secundaria a un SMD, ya que las estrategias terapéuticas y pronóstico varía considerablemente en estas patologías. La LMA se puede distinguir de la LLA por la demostración del compromiso definitivo para el linaje mieloides a través del uso de la morfología, inmunohistoquímica e inmunofenotipo (Harris et al., 2000)

C. Genética de la leucemia mieloides aguda (LMA)

Las alteraciones genéticas pueden ser detectadas por medio de un cariotipo convencional, por la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), siendo esta última la más específica (Mrózek et al., 2001).

Alrededor de un 45% de los pacientes con LMA presentan un cariotipo anormal con alteraciones cromosómicas numéricas (hiploidia o hiperloidia) y/o estructurales, de los cuales un 15% de pacientes con LMA presentan 3 o más anomalías, conocida como LMA con cariotipo complejo (Mrózek, Heerema, & Bloomfield, 2004; Owen & Fitzgibbon, 2010). La presencia de estas alteraciones tiene valor pronóstico y diagnóstico (Berger et al., 1982).

Las alteraciones estructurales implican el intercambio de material genético entre cromosomas, generando proteínas quiméricas. Este intercambio puede ser de dos tipos: translocación balanceada o equilibrada donde no se produce aumento ni pérdida de material cromosómico, y la translocación desequilibrada o no balanceada, en la cual si se produce aumento o pérdida de material cromosómico. Éstas alteraciones generalmente implican genes reguladores de la transcripción, donde estos reordenamientos alteran la función de uno o de ambos genes involucrados (Nimer & Moore, 2004).

Los genes afectados en la LMA están vinculados en partes claves que participan en la regulación celular, proliferación y la diferenciación hematopoyética. Estos hallazgos han conllevado al planteamiento de dos clases de mutaciones vinculadas a la leucemogénesis (Ishikawa et al., 2009).

Las mutaciones involucradas en la LMA se han clasificado como de clase I y clase II, según su mecanismo de acción. Las mutaciones de clase I (FLT3, KIT, NRAS/KRAS y PTPN11) favorecen la proliferación y supervivencia por inhibición de apoptosis, afectando usualmente componentes clave de las vías de señalización de las quinasas, a lo que se le atribuye la progresión de la LMA (Kelly & Gilliland, 2002).

Por otra parte, las mutaciones de clase II (CEBPA, NPM1 y las translocaciones cromosómicas recurrentes/ inversiones) conducen a la alteración de la diferenciación mieloide al afectar a genes implicados en la regulación transcripcional. Éstas se producen en el inicio de la leucemia y son estables a lo largo del curso de la enfermedad, se ha propuesto que son mutaciones iniciadoras. Cada mutación es asociada con las características clínico-patológicas, lo que sugiere que cada una define una única forma biológicamente distinta de la enfermedad (Renneville et al., 2008).

Las mutaciones de la clase I y II pueden ocurrir simultáneamente en patrones específicos, FLT3 con NPM1 representa una colaboración tanto de una mayor proliferación (clase I) y un bloque en la diferenciación (clase II) (Renneville et al., 2008).

Existen evidencias de que son necesarias mutaciones en dos o más genes para causar una LMA a diferencia de la LMC (Kelly & Gilliland, 2002; Speck & Gilliland, 2002). La mayoría de los oncogenes resultantes de una translocación balanceada, como la $t(8;21)(q22;q22)$ *AML1-ETO*, no son suficientes por sí mismos para inducir una LMA en modelos murinos (Dunne et al., 2010; Higuchi et al., 2002).

1. Mutación *AML1-ETO*

En estudios realizados en distintas partes del mundo se han reportado diferentes valores de la prevalencia de *AML1-ETO* pacientes con LMA. Por ejemplo, en estudios pediátricos realizados en Cuba se reporta un 15% de casos positivos para el transcrito quimérico (Menéndez et al., 2012); en los Estados Unidos se reporta un 8-15% de casos anuales (American Center Society INC, 2014); en el Reino Unido se reportan 12-14% de casos positivos (Grimwade & Hills, 2009; Harrison et al., 2010); en India 14.58% de casos positivos en adultos y 30% en niños con LMA (Arora & Arora, 2016); en China se reporta un 13.3% de casos positivos en la población con LMA (Cheng et al., 2009; Shen et

al., 2011); y en Irán 5 a 10% de casos en la población afectada (Ghazaey Zidanloo & Hosseinzaeh Colagar, 2014).

Generalmente las alteraciones cromosómicas asociadas con LMA involucran reguladores de la transcripción, los cuales dan origen a genes híbridos que codifican proteínas de fusión con funciones alteradas (Kelly & Gilliland, 2002).

La translocación $t(8;21)(q22;q22)$ es una de las primeras alteraciones genéticas asociadas como un cambio específico en LMA. Fue descrita por primera vez por Kamada en 1968, como una translocación de dos cromosomas de los grupos C y G (Anexo 1, tabla 18). En 1991 se realizaron estudios en los que se clonó molecularmente la $t(8;21)(q22;q22)$, en los cuales se demostró la existencia del rearrreglo del gen *AML1* en el cromosoma 21 y el gen *ETO* en el cromosoma 8, lo cual genera el gen quimérico *AML1-ETO* (Mrózek et al., 2001). El gen *AML1* es expresado en células mieloides y el gen *ETO* es expresado normalmente en el cerebro, testículos y ovarios pero no en el linaje mieloide (Andrieu et al., 1996; Downing, 1999)

El gen *AML1* (*acute myeloid leukemia 1*, por sus siglas en inglés), se denomina también *RUNX1* (factor de transcripción 1 relacionado a *runt*); *CBFA2* (factor de unión nuclear A2), *PEBaB* (promotor de la proteína de unión poliomavirus aB); se encuentra localizado en el cromosoma 21q22. Está conformado por nueve exones que abarcan una región de 150 kilobases (kb) (Ptasinska et al., 2012).

En condiciones normales el gen *AML1* codifica para la proteína CBF α , que junto a la proteína CBF β forman el complejo CBF (factor de unión nuclear) que es un factor de transcripción esencial para una adecuada hematopoyesis (Speck & Gilliland, 2002; Owen & Fitzgibbon, 2010). La subunidad CBF α se une al ADN y también se une a la subunidad CBF β ; el dominio *AML1* es requerido para esta unión del ADN y su heterodimerización. El CBF β no es capaz de unirse directamente al ADN sino mediante el gen *AML1*. Este dominio está presente en la proteína quimérica derivada *AML1-ETO*, pero con un funcionamiento anormal, lo que conlleva a una activación transcripcional alterada así como una localización subnuclear (Dunne et al., 2010).

El gen *ETO* (*eight twenty one*, por sus siglas en inglés) conocido también como *RUNX1T1*, codifica para una proteína nuclear que funciona como represor transcripcional mediante su unión a la

desacetilasa de histonas y otros factores transcripcionales. El gen *ETO* está conformado por trece exones que abarcan una región de 87kb (Ptasinska et al., 2012).

La fusión del gen *AML1* con el gen *ETO* generalmente ocurre con un punto de ruptura entre los exones 5-6 del gen *AML1* y los exones 1a-2 del gen *ETO* (Ferrara & Del Vecchio, 2002).

La proteína quimérica resultante de la combinación *AML1-ETO* conlleva a la supresión de algunos genes promotores, la localización fuera del microambiente nuclear normal, reducción en la movilidad y por tanto, la imposibilidad para su unión con otros genes diana, lo cual afecta la diferenciación mieloide (Higuchi et al., 2002).

La proteína quimérica derivada *AML1-ETO* consta de 177 aminoácidos de *AML1* fusionados a 575 aminoácidos de *ETO*. La translocación $t(8;21)(q22;q22)$ genera una proteína de fusión que contiene en el extremo amino-terminal aminoácidos de la proteína *AML1* y en el extremo carboxilo-terminal aminoácidos de la proteína *ETO* (Reikvam, Hatfield, Kittang, Hovland, & Bruserud, 2011).

La expresión de genes y la función ribosomal en las células con la $t(8;21)(q22;q22)$ están afectadas, la proteína quimérica derivada *AML1-ETO* reduce la reparación del ADN que al combinarse con una disminución en la expresión del gen *p53* (gen de supresión tumoral), provoca un incremento del riesgo a nuevos eventos leucemogénicos (Reikvam et al., 2011).

La proteína generalmente causa alteraciones que favorecen la proliferación y supervivencia de las células y una disminución en la diferenciación; sin embargo, se ha reportado también que la proteína de fusión puede tener efectos opuestos, lo que sugiere que la proteína *AML1-ETO* de forma aislada no es capaz de inducir la transformación leucémica (Mrožek et al., 2012).

D. Características de LMA con *AML1-ETO* positivo

Como se mencionó anteriormente el criterio diagnóstico para la LMA es la presencia de más del 20% de blastos en la médula ósea, sin embargo la LMA con *AML1-ETO* positivo con maduración morfológica de la estirpe mieloide, puede llegar a tener porcentaje de blastos menor, en dichos casos deben ser tratados como LMA y no como síndromes mielodisplásicos (Arber et al., 2003).

La presencia de esta alteración molecular se a descrito en el 10 al 22% de casos de LMA con maduración M2 de la clasificación FAB, sin embargo existen casos reportados con maduración del tipo M1, M4, M5 y M6 (Reikvam, Hatfield, Kittang, Hovland, & Bruserud, 2011; Andrieu et al., 1996).

La LMA M2 está caracterizada por presentar bastones de Auer, una intensa positividad a la mieloperoxidasa, vacuolización citoplasmática y prominente eosinofilia, también se caracteriza por la positividad al marcador asociado a células B: CD19 así como a CD13, CD34 y CD56 (Thalhammer-Scherrer et al., 2002).

La morfología de los blastos en este tipo de LMA se caracterizan por citoplasma basófilo, frecuentemente numerosos gránulos azurófilos que pueden llegar a ser grandes (pseudo Chédiak-Higashi) y un halo perpendicular. Los bastones de Auer pueden ser detectados comunmente en blastos y en los neutrófilos inmaduros, pueden observarse también promielocitos, mielocitos como signos de displasia. En algunos casos puede haber un incremento de los precursores eosinófilos, basófilos y mastocitos, las series eritroide y megacariopoyética son morfológicamente normales (Andrieu et al., 1996).

Entre las manifestaciones clínicas relacionadas son similares a las demás LMA, presentando mayor intensidad en las citopenias y en la infiltración extramedular. El sarcoma mieloides está descrito en pacientes con LMA $t(8;21)(q22;q22)$; sin embargo, estudios recientes califican como una alteración citogenética relativamente rara en el sarcoma mieloides, con una incidencia del 2 al 3 % de los casos (Reikvam et al., 2011).

No hay una relación preponderante clara en cuanto a la presencia del transcrito *AML1-ETO* con el sexo del individuo afectado, se ha descrito una prevalencia masculina en algunas series pero no justificada por otros estudios (Marcucci et al., 2005; Mertens, Johansson, & Mitelman, 1993).

E. Pronóstico de pacientes con LMA

Existe una clasificación de los pacientes con LMA según los hallazgos genéticos más frecuentes (tabla 4), dentro de la cual la translocación $t(8;21)(q22;q22)$ está clasificada en el grupo de riesgo favorable (Berger et al., 1982).

Sin embargo, existen factores asociados que pueden ser adversos para pacientes con LMA $t(8;21)(q22;q22)$, entre ellos se pueden mencionar la alta celularidad en la médula ósea, la presencia de un cariotipo aparentemente normal pero con un resultado positivo de amplificación de transcripción reversa (RT-PCR) para la mutación $t(8;21)(q22;q22)$, leucemia con estadio extramedular, expresión de CD56, conteo elevado de leucocitos en el momento del diagnóstico y un pobre estado general (Reikvam et al., 2011).

El conocer la presencia de los distintos marcadores genéticos mencionados permite clasificar al paciente con LMA en uno de los grupos de riesgo para escoger un tratamiento más adecuado (Downing, 1999).

Tabla 4. Clasificación de la LMA según el grupo de riesgo

Grupo	Alteración genética
Riesgo favorable	<ul style="list-style-type: none"> $t(15;17)(q22;q12-21)$
Rearreglos estructurales balanceados	<ul style="list-style-type: none"> $t(8;21)(q22;q22)$ $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(q13;q22)$
Riesgo intermedio	<ul style="list-style-type: none"> Cariotipo normal
Rearreglos estructurales balanceados	<ul style="list-style-type: none"> $t(9;11)(p22;q23)$
Rearreglos estructurales desbalanceados	<ul style="list-style-type: none"> $del(7q); del(9q); del(11q); del(20q)$
Alteraciones numéricas	<ul style="list-style-type: none"> $-Y; +8; +11; +13; +21$
Riesgo desfavorable	<ul style="list-style-type: none"> Cariotipo complejo
Rearreglos estructurales balanceados	<ul style="list-style-type: none"> $Inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$ $t(6;9)(p23;q34)$ $t(6;11)(q27;23)$ $t(11;19)(q23;p13.1)$
Rearreglos estructurales desbalanceados	<ul style="list-style-type: none"> $del(5q)$
Alteraciones numéricas	<ul style="list-style-type: none"> -5 -7

Fuente: Berger, R., Bernheim, A., Daniel, M., Valensi, F., Sigaux, V., & Faldrin, G. (1982). Citologic characterization and significance of normal karyotypes in $t(8;21)$ acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 59: 171-178.

La información genética asociada con la LMA en el momento del diagnóstico constituye el factor pronóstico más importante para predecir la evolución clínica de los pacientes. Los principales factores clínicos que influyen en el tratamiento de la LMA son la edad, la cifra de leucocitos al diagnóstico, el estar enfrentando una LMA *de novo* o secundaria (tabla 5) (Döhner et al., 2010).

En las LMA asociadas con transcritos de buen pronóstico, principalmente en la *t(8;21)(q22;q22)* se ha descrito la utilidad del índice leucocitario, este es el producto del recuento de glóbulos blancos en la sangre periférica por la de ratio de blastos en médula ósea [índice leucocitario= recuento de glóbulos blancos en sangre periférica x (% blastos en médula ósea/100)] (Nguyen et al., 2002).

Tabla 5. Factores pronósticos en la leucemia mieloide aguda

	Favorable	Desfavorable
Factores clínicos	LMA de novo Niños y adultos jóvenes Recuento de glóbulos blancos normal	LMA secundaria Adultos de edad avanzada (>60 años) Leucocitosis intensa (>50-100X10 ⁹ /L)
Clasificación FAB	LMA promielocítica LMA con eosinofilia	LMA indiferenciada, monocítica, eritroide, megacarioblástica
Citogenética / molecular	Mutaciones NPM1 Mutaciones CBPA <i>t(8;21)</i> , <i>t(15;17)</i> , <i>inv(16)/t(16;16)</i> (incluso con alteraciones adicionales)	Mutaciones FLT3 Reordenamientos MLL Alt* 3q, -5 o 5q-, -7, <i>t(9;11)</i> , alteraciones múltiples.
Respuesta al tratamiento	RC* tras un ciclo de QT* ≤20% blastos en MO* tras 1 ciclo de QT RC inmunofenotípica tras QT	RC con ≥ 2 ciclos de QT ≥20% blastos en MO tras 1 ciclo de QT Persistencia de ERM* por inmunofenotipo tras la inducción y/o consolidación

Fuente: Grimwade, D., & Hills, R. K. (2009). Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 385–95. doi:10.1182/asheducation-2009.1.385. *Alt: alteraciones, ERM: enfermedad residual mínima, MO: médula ósea, RC: remisión completa.

F. Tratamiento de la LMA

La caracterización genética del paciente con LMA es importante para la selección de la terapia. (Bloomfield et al., 1998). En estudios con pacientes jóvenes y adultos con LMA *de novo* se ha obtenido

de un 85-90% de tasa de remisión completa después de ser sometidos a tratamiento (Slovak et al., 2000).

El tratamiento de LMA comprende por lo general tres fases:

- Fase de inducción: cuyo objetivo es eliminar las células leucémicas y normalizar los conteos celulares tanto en la sangre como en la médula ósea a lo que se conoce como remisión. Se espera encontrar menos del 5% de blastos en la médula ósea. La remisión de la enfermedad incluye la ausencia de afección en el sistema nervioso central, para lo cual se suministra medicamentos quimioterapéuticos dirigidos a eliminar las células leucémicas que permanecen en el cerebro y la médula espinal después de una quimioterapia estándar (Slovak et al., 2000).
- Fase de consolidación o de intensificación de la terapia: se aplica un tratamiento intensivo para liberar el cuerpo de las células leucémicas restantes que podrían comenzar a crecer y causar la reaparición de la leucemia (recaída), esta fase se inicia cuando la remisión ha sido confirmada. Existen estudios que indican que ante la presencia de la $t(8;21)(q22;q22)$ es necesario la aplicación de altas dosis de citarabina para alcanzar la remisión completa (Bloomfield et al., 1998; Narimatsu et al., 2007; Slovak et al., 2000) (Bloomfield et al., 1998; Slovak et al., 2000; Narimatsu et al., 2008).
- Mantenimiento: es utilizado para asegurar que no se esté ante una aparente remisión completa, es necesario realizar reevaluaciones frecuentes para la detectar una posible recaída, los tratamientos de mantenimiento tienen un periodo de duración de por lo menos dos años (Berger et al., 1982; Chen et al., 2007).

IV. JUSTIFICACIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica del linaje mieloide, caracterizada por una proliferación celular acelerada y un arresto a la diferenciación celular, acumulando así células poco funcionales dentro de la médula ósea que posteriormente pasaran a circular dentro del torrente sanguíneo (Vardiman et al., 2009).

Los avances en las técnicas de biología molecular en el estudio de neoplasias hematológicas permiten conocer mejor la patogénesis de la enfermedad y hacen posible la detección de la presencia de alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales (Harris et al., 1999). En 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la integración de la citogenética, junto con la biología molecular, a las técnicas clásicas de citología e inmunología, para la clasificación de algunas neoplasias hematológicas, con el fin de identificar marcadores genéticos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Mrózek et al., 2012).

La LMA está asociada a diversas alteraciones genéticas, existen alteraciones genéticas que orientan a una terapia específica, es por ello que resulta cada vez más importante la caracterización genética de los pacientes con LMA. Actualmente los pacientes con la alteración $t(8;21)(q22;q22)$ son sometidos ciclos de quimioterapia establecidos para la LMA, en estudios reportan que la aplicación de altas dosis de citarabina en la fase de consolidación ha dado resultados muy favorables en los pacientes, reportando un 87% de remisión completa de la enfermedad (Chen et al., 2007; Harris et al., 1999).

La técnica RT-PCR se considera como una herramienta altamente sensible y específica para la determinación de alteraciones estructurales (Mrózek et al., 2001), es por ello que en el presente estudio se utilizará como técnica de diagnóstico para detectar la presencia de la alteración $t(8;21)(q22;q22)$.

En Guatemala se ha iniciado recientemente la caracterización genética de la población con LMA. Como parte de esta iniciativa, en el presente estudio se determinó la frecuencia de la alteración $t(8;21)(q22;q22)$. Debido a que los estudios realizados en la población guatemalteca han demostrado que existen características genéticas distintas relacionadas con la diversidad étnica que existe en

nuestro país (Carranza et al., 2013; Carranza et al., 2015), en este proyecto se determinó la asociación existente entre la presencia del transcrito *AML1- ETO* y las características hematológicas y demográficas en nuestra población, con la finalidad de generar información que servirá de referencia a la comunidad médica y científica interesada en el tema para tomar las decisiones más acertadas en cuanto a la estrategia de diagnóstico y tratamiento a seguir con pacientes guatemaltecos.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la frecuencia del transcrito *AML1-ETO* por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), para contribuir a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca.

B. Objetivos específicos

1. Determinar la expresión del transcrito del gen quimérico *AML1-ETO* por medio de la técnica molecular RT-PCR en pacientes con LMA, para establecer su frecuencia en la población guatemalteca.
2. Establecer la relación existente entre la presencia del transcrito del gen quimérico *AML1-ETO* y las características hematológicas y demográficas en la población guatemalteca con LMA.

VI. HIPÓTESIS

Por ser este un estudio de tipo descriptivo no aplica la elaboración de hipótesis en el estudio

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo (población)

Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda (LMA) referidos por los hospitales nacionales al Instituto para la Investigación Científica y la Educación acerca de las Enfermedades Genéticas y Metabólicas Humanas (INVEGEM), ubicado en el Campus Médico San José Km. 28.5 carretera a Bárcenas, Santa Lucía, Milpas Altas, Sacatepéquez.

B. Muestra

Se tomaron por conveniencia en función de la investigación, pacientes con diagnóstico positivo de LMA, referidos por los hospitales nacionales al INVEGEM, para un total de 150 pacientes, los cuales cumplieron con los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico positivo para LMA.
- Consentimiento informado, donde se acepta participar en la investigación.
- Pacientes con ficha de recolección de datos clínicos.

2. Criterios de exclusión

- Pacientes que estén bajo tratamiento para LMA.
- Negativa de participación en la investigación sin consentimiento informado aprobado.

C. Materiales

1. Consentimiento informado

- Hoja de consentimiento informado (anexo 8)
- Boleta impresa de recolección de datos (anexo 9)

2. Equipos

- Balanza analítica
- Cabina de extracción de gases
- Cabina de seguridad biológica clase II, Tipo A2
- Centrífuga con rotores para tubos de 50ml, 15ml, 4ml y microtubos de 1.5ml, temperatura ajustable.
- Centrífuga para microtubos de 0.2mL y 0.6mL
- Congelador a -20°C
- Fluorómetro, Quantus™ Fluorometer, Promega®
- Fuente de alimentación eléctrica (electroforesis)
- Microondas
- Micropipetas (0.1-1µl, 0.5- 10µl, 10-100 µl y 100-1000µl)
- Refrigerador a 4°C
- Sistema de electroforesis horizontal: cámara de electroforesis, peine de 14 pozos.
- Termociclador
- Termobloque
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Vórtex

3. Reactivos

- Agarosa
- Agua destilada
- Agua grado biología molecular
- Buffer para PCR 10X
- Buffer de lisis (cloruro de amonio 155 mmol/L; carbonato ácido de sodio 10 mmol/L; ácido etildiaminotetraacético 0.1 mmol/L)
- Buffer TE 1X
- Cebadores del gen ABL: 400nM (concentración final) (Tabla 8)
- Cebadores de la translocación *AML1-ETO*: 400nM (concentración final) (Tabla 9)
- Cloro: 0.5%

- Cloroformo
- dNTPs: 200 μ M (concentración final)
- Enzima Taq polimerasa (5 U/ μ l)
- Etanol 70 y 75%
- GelRed®
- Isopropanol
- Kit de cuantificación de ARN, Promega®: colorante de ARN (492nmEx/540nmEm), estándar de ARN (100mg/ml)
- Kit retrotranscripción Applied biosystems®: *RT Buffer 10X*, *Random primers 10X*, dNTP mix 25X (100mM), *MultriScribe® Reverse Transcriptase* (50 U/ μ l)
- Marcador de peso molecular: Perfect DNA™ 50bp ladder
- MgCl₂: 2.5mM
- NucleoClean®
- RNAlater, Ambion®
- RNAzap, Ambion®
- Solución de TAE 10X (tris base-ácido acético glacial-EDTA)
- Solución salina isotónica (cloruro de sodio 0.9 %)
- Trizol Ambion®

4. Insumos

- Aguja para biopsia de médula ósea de 0.8 mm de diámetro
- Microtubos estériles (0.2ml, 0.5ml y 1.5 ml)
- Papel aluminio
- Pipetas Pasteur plásticas de 3ml
- Puntas estériles para pipetas (0.1-1 μ l, 0.5- 10 μ l, 10-100 μ l y 100-1000 μ l)
- Tubos tipo Falcón cónicos estériles de 15ml y/o 50ml
- Tubo plástico para recolección de muestras con anticoagulante EDTA (4ml)

D. Métodos

1. Solicitud de información y consentimiento informado

Previo al estudio se solicitó el consentimiento escrito por parte del paciente informando la aceptación de participar y proporcionar los datos necesarios para su ejecución. En el caso de tratarse de menores de edad, el encargado y/o tutor responsable del paciente debe firmar el consentimiento.

2. Recolección de las muestras:

Las muestras se tomaron mediante punción aspirativa de un aproximado de 3cm³ de médula ósea (proveniente de la cresta ilíaca posterosuperior o del esternón), para lo que se utilizó una aguja de 0.8 mm de diámetro. La muestra se recolectó en tubos plásticos con anticoagulante EDTA, los cuales se mezclaron por inversión y se almacenaron a 4°C hasta procesamiento. Posteriormente, las muestras y boletas se trasladaron de manera adecuada bajo las condiciones requeridas para el efecto al INVEGEM por personal de mensajería propia del instituto, en donde se realizó el estudio.

3. Separación de glóbulos blancos

Las muestras de médula ósea contenidas en tubos con EDTA, fueron sometidas a una serie de lavados con una solución hipotónica (buffer de lisis), con el fin de separar los glóbulos blancos de los demás componentes de la médula ósea (Carlile, Rojas-Duran, & Gilbert, 2001).

Procedimiento

- Enfriar la centrifuga a una temperatura de 4°C
- Trasvasar la muestra a tubo tipo falcón de 15mL.
- Aforar con buffer de lisis
- Homogenizar por inversión
- Incubar por 10 minutos a 4°C
- Centrifugar a 1500rpm durante 10 minutos
- Observar el precipitado (glóbulos blancos)
- Descartar el sobrenadante

- Aforar nuevamente con buffer de lisis el tubo tipo falcón de 15 mL
- Homogenizar por inversión
- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos
- Observar el precipitado (glóbulos blancos)
- Descartar el sobrenadante
- Aforar con solución salina isotónica el tubo tipo falcón de 15 mL
- Centrifugar a 1500rpm durante 10 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Observar el precipitado (glóbulos blancos)
- Agregar 1mL de RNAlater, Ambion®
- Homogenizar, colocar en tubo de 1.5mL
- Almacenar a -20°C hasta que se realice la extracción de ARN.

4. Extracción de ARN

Se llevó a cabo la extracción de ARN total a los glóbulos blancos almacenados, se utilizó el método de precipitación descrito en 1987 por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 2006).

Procedimiento

- Enfriar la centrifuga a una temperatura de 4°C
- Centrifugar la muestra (tubo de 1.5mL, leucocitos obtenidos en el paso anterior).
- Descartar el sobrenadante.
- Homogenizar el precipitado (leucocitos) con 0.75mL de Trizol®
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Agregar 0.2mL de cloroformo
- Mezclar vigorosamente por inversión durante 15 segundos
- Incubar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos
- Centrifugar a la muestra a 12,000 x g durante 15 minutos
- Remover la fase acuosa (fase superior, fase incolora) y colocarla en un tubo de 1.5mL
- Agregar 0.5mL de isopropanol a la fase acuosa

- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Centrifugar a la muestra a 12,000 x g durante 15 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Agregar 1mL de etanol al 75%
- Aplicar vórtex a la muestra
- Centrifugar a la muestra a 7,500 x g durante 5 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Dejar secar el precipitado durante 5-10 minutos.
- Agregar agua grado biología molecular al precipitado (ARN), homogenizando por pipeteo.
- Incubar en el termobloque a 55-60°C durante 10-15 minutos.
- Almacenar a -20°C hasta que se realice el siguiente paso.

5. Cuantificación de ARN

Para la cuantificación de ARN se utilizó espectrofotometría de fluorescencia, utilizando el fluorómetro QuantiFluor® (Promega), según las instrucciones del fabricante (Promega, Technical Manual, QuantiFluor® RNA System).

Procedimiento

- Cubrir las soluciones de trabajo con papel aluminio y protegerlas de la luz.
- Preparación de la solución colorante de ARN: preparar 100 µL para cada una de las muestras a cuantificar, más un volumen de 200 µL correspondiente al blanco y al estándar. Preparar una dilución 1:200 del colorante con buffer TE 1X.
- Rotular los tubos a utilizar, blanco, estándar y uno por cada muestra, cubrir los tubos con papel aluminio.
- Preparación de las muestras: diluir la muestra con buffer TE 1X para un volumen final de 100 µL (dependiendo de la concentración del ARN, alta o baja). Agregar 100 µL de la solución de colorante de ARN anteriormente preparado. Homogenizar por pipeteo.
 - Para muestras de ARN de alta concentración (10-2,500ng/ml o 2 – 2.5ng/tubo) preparar 100µL de la solución estándar de ARN tomando 95 µL de buffer TE 1X y 5 µL del estándar concentrado para

obtener una concentración de 250ng de ARN en el tubo. Agregar la misma cantidad de estándar (5 μ L) de cada una de las muestras en el tubo correspondiente.

▪ Para muestras de ARN de baja concentración (0.5-50ng/ml o 0.1-10 ng/tubo) preparar 100 μ L de solución estándar tomando 99.9 μ L de buffer TE y 0.1 μ L del estándar concentrado para obtener una concentración de 10ng de ARN por tubo. Agregar la misma cantidad de estándar (0.1 μ L) de cada una de las muestras en el tubo correspondiente.

- Colocar en vórtex por 15 segundos para homogenizar.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Medir la fluorescencia en el canal óptico azul del equipo Quantus™ Fluorometer. que tiene la capacidad de medir la excitación y emisión a las longitudes de onda apropiadas 492nm/540nm respectivamente.

6. Retrotranscripción (RT-PCR)

Se utilizó el kit de Retrotranscripción (Applied biosystems®), para la obtención de ADNc a partir del ARN extraído, para lo cual se utilizaron cebadores al azar (*random primers*) en su mayoría hexámeros. Posteriormente este ADNc se amplificó en una PCR de punto final (Pallisgaard, Hokland, Riishøj, Pedersen, & Jørgensen, 1998).

Procedimiento

Preparar la cantidad de reactivos necesarios de acuerdo a la cantidad de muestras según la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes para la preparar mezcla de reactivos del RT-PCR

Reactivo	Concentración final	Volumen (μ L)
RT Buffer 10x	2X	2.0
dNTP mix 25X (100mM)	8mM	0.8
Random primers 10X	2X	2.0
MultriScribe® Reverse Transcriptase (50 U/ μ L)	5U/ μ L	1.0
Agua grado biología molecular		3.2
Volumen total por reacción:		10

Fuente: (Applied biosystems® (S.F). *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* Cat# 4368814. Consultado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>).

- Agregar 10 µL de la mezcla de reactivos a cada tubo de 0.2 mL.
- Agregar 10 µL de muestra a cada tubo correspondiente
- Centrifugar los tubos.
- Colocar los tubos en el termociclador utilizando el programa descrito en la Tabla 7.

Tabla 7. Programación del termociclador para realizar la reacción de RT-PCR

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞

Fuente: (Applied biosystems® (S.F). *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* Cat# 4368814. Consultado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>).

7. Realización de PCR de punto final

a) Amplificación por PCR del gen control ABL1

Se utilizó el gen ABL1 como control interno, para validar la extracción de ARN y validar el proceso de retrotranscripción. El *ABL1* es un proto-oncogén que codifica una proteína tirosina quinasa citoplasmática y nuclear que se ha implicado en procesos de diferenciación celular, división celular, adhesión celular y la respuesta al estrés (Stanoszek et al., 2013). El gen *ABL1* está presente en varios tejidos humanos, entre ellos la médula ósea (ver anexo 3, figura 3). Para su determinación se utilizaron dos cebadores: un cebador de inicio con dirección hacia delante (*forward*) (ABL-F) y el otro cebador de inicio con dirección reversa (*reverse*) (ABL-R), con los cuales se esperaba un producto de amplificación que origina una banda de un peso aproximado de 270 pares de bases (pb) (van Dongen et al., 1999).

Tabla 8. Secuencia de los cebadores del control interno gen *ABL-1*

Cebador	Secuencia
ABL-F	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G-3'
ABL-R	5'-TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T-3'

Fuente: Artigas, C., Melo, A., Roa, J., Páez, E. Vittini, C., Arriagada, M. et al., (2002). Detección de secuencias del gen *BCR-ABL* mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX Región: Chile. *Revista Médica de Chile*, 130(6), 623-630.

Posterior a la validación de la calidad del ADNc, se procedió con la amplificación del gen *AML1-ETO*.

b) Amplificación por PCR del gen *AML1-ETO*:

La translocación *AML1-ETO* se origina por la fusión del exón 5 del gen *AML1* con el exón 2 del gen *ETO*. Los puntos de ruptura del gen *AML1* están localizados entre el exón 5 y el exón 6, en el gen *ETO* los puntos de ruptura se encuentran en el exón 2 (anexo 4, figura 4). Para esta PCR (Tabla 9) se utilizarán tres cebadores: dos con dirección hacia delante (*forward*) (*AML1-C* y *AML1-E5*) y el tercero con dirección reversa (*reverse*) (*ETO-D*) (Tabla 9). El producto de amplificación de *AML1-ETO* por RT-PCR usualmente se presenta como una única banda, en el presente trabajo la utilización de dos cebadores *forward* permite la obtención de dos bandas que difieren en cantidad de pares de bases según la localización de los mismos en el exón 4 (Tabla 10), cada uno de los cebadores confieren distinta sensibilidad en la detección de la translocación *AML1-ETO*, el nivel de sensibilidad se expresa en el rango de detección de una célula mutada en 10^3 a 10^4 células hematopoyéticas normales de médula ósea (referido como los recíprocos, 10^{-3} a 10^{-4}) (tabla 10) (Lo Coco et al., 1991; Miller et al., 1992; van Dongen et al., 1999).

Tabla 9. Secuencia de los cebadores que se utilizarán para detectar la translocación *AML1-ETO* en muestras clínicas.

Cebador	Posición 5* (tamaño pb**)	Secuencia
AML1-C (<i>forward</i>)	920 (22)	5'-ATG ACC TCA GGT TTG TCG GTC G-3'
AML1-E5' (<i>forward</i>)	842 (24)	5'-TGG CTG GCA ATG ATG AAA ACT ACT -3'
ETO-D (<i>reverse</i>)	396 (22)	5'-TGA ACT GGT TCT TGG AGC TCC T-3'

Fuente: adaptada de: van Dongen, J., Macintyre, E., Gabert, J., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., . . . Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1. Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1901-1928. * Posición de inicio del cebador dentro del gen en estudio, ** tamaño del cebador en pb (pares de bases).

Tabla 10. Tamaño de productos esperados de RT-PCR del gen *AML1-ETO*

	AML1-C ↔ ETO-D	AML1-E5' ↔ ETO-D
Tamaño de producto,	260 pb*	338 p*b
Sensibilidad**	-4	-3

Fuente: adaptada de: van Dongen, J., Macintyre, E., Gabert, J., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., . . . Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of th BIOMED-1. Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1901-1928. *pb: pares de bases, **sensibilidad en escala logarítmica.

Procedimiento

- Limpiar áreas de trabajo antes de iniciar (cloro 0.5%, etanol 70%, NucleoClean®).
- Mezcla los reactivos en un tubo de 0.5 mL (Descrito en Tabla 11)
- Homogenizar bien la mezcla de reactivos (vórtex)
- Agregar la muestra cADN.
- Seguir el procedimiento en el termociclador (descrito en la Tabla 12)

Tabla 11. Componentes para la preparar mezcla de reactivos de PCR punto final

Reactivo	Cantidad (µL)
H ₂ O	11.5
Buffer PCR (20nM Tis HCl, 50mM KCl, pH 8.3)	2.5
Cebadores (400nM)	4.5
dNTP (200 M)	2.5
MgCl₂ (2.5 mM)	1.
Enzima Taq polimerasa (50 U/µL)	1
ADNc*	2
Volumen final	25

Fuente: van Dongen, J., Macintyre, E., Gabert, J., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., . . . Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of th BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1901-1928. *ADNc obtenido en la retrotranscripción.

Tabla 12. Programación del termociclador para ejecutar la PCR punto final.

	35 ciclos				
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
Temperatura (°C)	95	94	65	72	16
Tiempo	30 segundos	30 segundos	60 segundos	60 segundos	∞

Fuente: van Dongen, J., Macintyre, E., Gabert, J., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., . . . Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1901-1928.

c) Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite analizar los fragmentos de ADN obtenidos por la PCR.

Procedimiento

- Preparar el sistema de electroforesis horizontal: cámara de electroforesis, peine de 14 pozos.
- Pesar la agarosa
- Agregar la solución de TAE 10X
- Fundir la solución de agarosa
- Dejar enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente
- Verter la agarosa sobre la cámara de electroforesis
- Colocar el peine
- Dejar polimerizar durante 30 minutos.
- Añadir solución de TAE 10X para cubrir el gel de agarosa.
- Se mezcla 2 µL de buffer de carga con 10 µL del producto de PCR.
- Se carga en los pozos del gel.
- Se coloca 10 µL de marcador de peso molecular de ADN de 50pb.
- Luego se tapa la cámara y se programa para que corra a 100 voltios/400mA durante 90 minutos.
- Se procede a teñir el gel con GelRed® durante 20 minutos.
- Se coloca el gel ya teñido en el transiluminador de luz ultravioleta.

E. Diseño del estudio

1. Tipo de estudio

Descriptivo de corte transversal.

2. Tipo de muestreo:

No probabilístico, por conveniencia

F. Análisis de datos

1. Descripción de las características de la muestra

Se realizó la descripción de las características de la muestra, separando según el tipo de variable:

- Variables cualitativas: sexo, lugar de procedencia, edad.
- Variables cuantitativas: generales y específicas de los análisis efectuados; media +/- desviación estándar y/o mediana (rango).

2. Descripción de la presencia o ausencia del gen quimérico *AML1-ETO*

Se tabularon los datos en una hoja electrónica de Excel y fueron trasladados a SPSS 23 para su análisis.

Los datos fueron resumidos a través de frecuencias absolutas y relativas, y las variables cuantitativas, debido a la existencia de varios valores atípicos se resumieron a través de medianas y cuartiles.

Dependiendo de la frecuencia de los casos asociados con la presencia del gen quimérico *AML1-ETO*, se cruzó esta variable con las variables hematológicas y demográficas, efectuando comparaciones pareadas con la prueba de Mann Whitney o la prueba de chi cuadrado de Pearson, para determinar si hay alguna relación estadística. Los resultados con un $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS

Se analizaron 150 muestras de médula ósea provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de LMA. El 53 % de los pacientes incluidos en el estudio fueron del sexo femenino, con una mayor frecuencia de pacientes pediátricos (53%) que adultos. La Tabla 13 muestra la distribución por sexo, edad y la región departamental de origen de los pacientes, siendo el área suroccidental del país la de mayor reporte de casos (27.3 %).

Tabla 13. Características demográficas de los pacientes con LMA analizadas en el estudio.

Variables	Frecuencia (%) n=150
Sexo	
Femenino	80 (53) ^b
Masculino	70 (47)
Edad	
Niños	80 (53)
Adultos	70 (47)
Región de origen^a	
Metropolitana	34 (22.7)
Norte	9 (6)
Nororiental	19 (12.7)
Suroriental	17 (11.3)
Central	14 (9.3)
Suroccidental	41 (27.3)
Noroccidental	12 (8)
Petén	4 (2.7)

^aRegiones: Metropolitana (Guatemala), Norte (Alta Verapaz y Baja Verapaz), Nororiental (Chiquimula, El Progreso, Izabal y Zacapa), Suroriental (Jutiapa, Jalapa y Santa Rosa), Central (Chimaltenango, Sacatepéquez y Escuintla), Suroccidental (Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Suchitepéquez y Sololá), Noroccidental (Huehuetenango y Quiché). Regionalización según Decreto 70-86 del Congreso de la República de Guatemala. ^bporcentaje de la frecuencia.

El transcrito *AML1-ETO* fue detectado utilizando la técnica molecular RT-PCR para amplificarlo por retrotranscripción en forma de ADNc, seguida por electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos obtenidos, tanto del transcrito *AML1-ETO* (260 y 338 pb) como del gen constitutivo *ABL* (270 pb), utilizado como control de amplificación. En la figura 1 se muestra un gel de agarosa representativo.

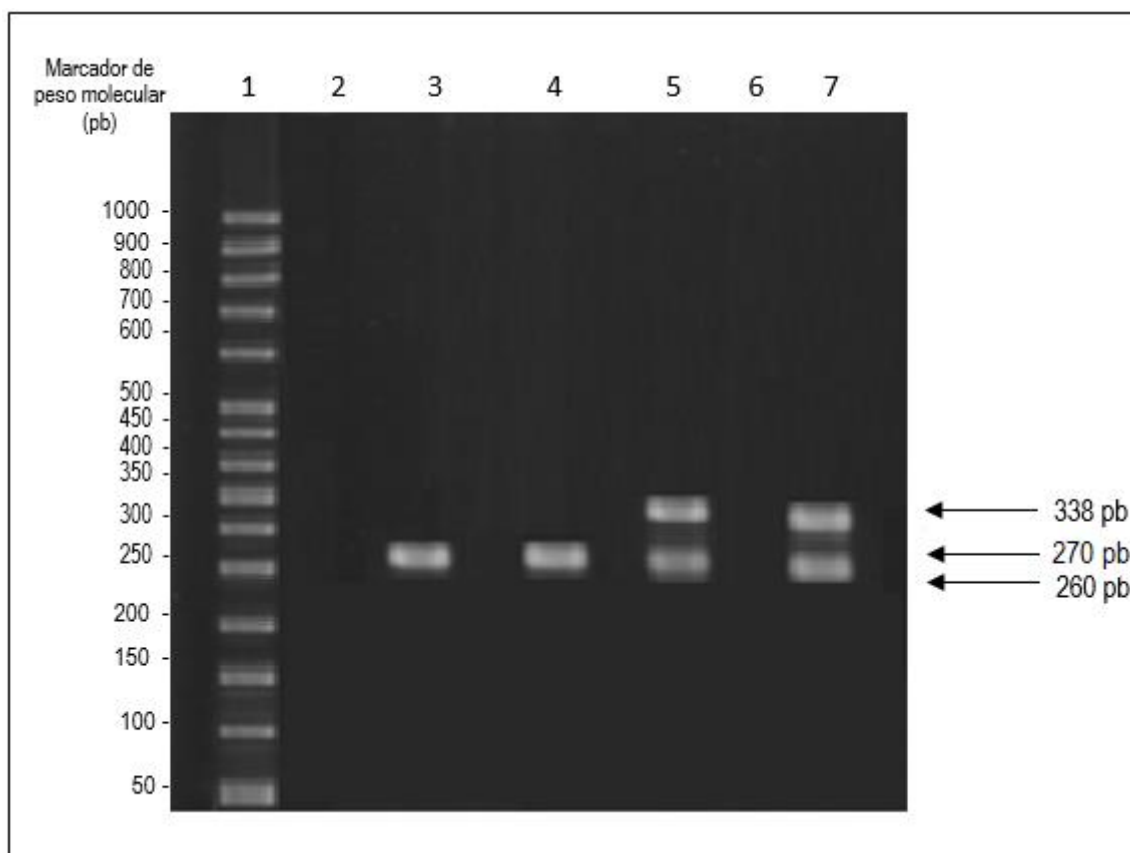


Figura 1. Detección del transcrito *AML1-ETO* en muestras clínicas por el ensayo de RT-PCR. Después de la amplificación, los productos se analizaron en un gel de agarosa al 2%. Línea 1: marcador de peso molecular (*Perfect DNA 50pb Ladder, Novagen®*); línea 2: blanco de reactivos; línea 3: gen *ABL* de muestra analizada; línea 4: control positivo para el gen *ABL*; línea 5: resultado positivo para el transcrito *AML1-ETO* de muestra analizada; línea 6: columna vacía; línea 7: control positivo para el transcrito *AML1-ETO*.

El transcrito *AML1-ETO* se detectó en el 18.7 % de los pacientes analizados, como se muestra en la tabla 14 y en el anexo 7. En la tabla 16 se muestra la distribución del transcrito *AML1-ETO* por edad y sexo en la población estudiada.

Tabla 14. Frecuencia del transcrito *AML1-ETO*

	Total de pacientes (n=150)	Frecuencia del transcrito
Positivos	28	18.7%
Negativos	122	81.3%

Tabla 15. Frecuencia del transcrito *AML1-ETO* en relación al sexo

Sexo	Transcrito <i>AML1- ETO</i>		Total de pacientes (n=150)	Valor p*
	Negativos	Positivos		
Femenino	66 (82.5%)	14 (17.5%)	80	0.695
Masculino	56 (80.0%)	14 (20.0%)	70	

* El valor de p se calculó utilizando el chi cuadrado.

Tabla 16. Distribución del transcrito *AML1-ETO* por edad y sexo en la población de estudio.

Grupo etario ^a	Sexo masculino		Sexo femenino		Total de pacientes que presentan el transcrito (n=28)	
	Número de pacientes	Frecuencia	Número de pacientes	Frecuencia		
Niños	9	56%	7	44%	16	57%
Adultos	5	45%	6	55%	11	39%
Adulto mayor	0	0%	1	100%	1	4%
	14	50%	14	50%	28	100%

^aGrupo etario: niños: 0-17 años, adultos 18-59 años, adultos mayores a partir de 60 años.

Los pacientes en los que se detectó el transcrito *AML1-ETO* presentaron recuentos celulares con una mediana de $14.9 \times 10^9/L$ para glóbulos blancos; $2.9 \times 10^{12} /L$ para glóbulos rojos y $16.0 \times 10^9/L$ para plaquetas. La tabla 17 muestra los valores obtenidos para otros parámetros hematológicos, y los valores presentados por los pacientes en los que no se detectó el transcrito.

El análisis estadístico con el test de Mann-Whitney U para variables continuas determinó que no hay diferencia en el recuento de glóbulos blancos y glóbulos rojos presentados por los pacientes que portan el transcrito y los que no. Se estableció que solamente existe una relación estadísticamente

significativa entre la presencia del transcrito *AML1-ETO* y el recuento plaquetario bajo ($p=0.007$). Es decir que los pacientes que presentan el transcrito presentan trombocitopenia, tal y como muestra la tabla 16.

Tabla 17. Características hematológicas de los pacientes con relación a la presencia del transcrito *AML1-ETO*

Variables	Transcrito <i>AML 1-ETO</i>	Mediana (rango) n=150	Valor p^*
Recuento eritrocitario	Ausente	3.0 (1.3-7.9)	0.517
	Presente	2.9 (1.4-8.9)	
Recuento leucocitario	Ausente	9.3 (1.0-950.0)	0.202
	Presente	14.9 (2.3-93.3)	
Recuento plaquetario	Ausente	29.0 (3-577.6)	0.007
	Presente	16.0 (3-61.9)	
Hemoglobina	Ausente	8.8 (4.2-19)	0.321
	Presente	8.6 (4.2-13.0)	
Hematocrito	Ausente	25.6 (13.1-52.8)	0.240
	Presente	24.0 (12.5-35.7)	

* El valor de p se calculó utilizando el chi cuadrado para variables categóricas y la prueba de Mann-Whitney U para las variables continuas relacionadas en base a la presencia o ausencia del transcrito *AML1-ETO*.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de esta investigación mostraron que la frecuencia del transcrito *AML1-ETO* fue de 18.7% en la población de estudio. Dicho hallazgo concuerda con estudios en los que se reportan frecuencias similares, como los realizados en Cuba (15%); Estados Unidos (8-15%), Reino Unido (12-14%) y en China (13.6%) (tabla 19, anexo 8) (American Cancer Society, 2014; Chen et al., 2007; Grimwade & Hills, 2009; Higuchi et al., 2002).

La leucemia mieloide aguda (LMA) es reportada internacionalmente con mayor frecuencia en adultos con una edad media de 64 años y como una enfermedad poco frecuente en niños y adolescentes (Marcucci et al., 2005). Sin embargo, como se puede observar en la tabla 13, el 53% de los pacientes guatemaltecos analizados en este estudio, son pacientes pediátricos (menores de 18 años). Esto indica que en nuestro país la edad de aparición de la enfermedad es menor en comparación a otros reportes internacionales (Santoyo-Sánchez et al., 2017), lo cual es un hallazgo importante desde el punto de vista médico.

Se detectó la presencia del transcrito *AML1-ETO* en 14 pacientes de sexo masculino y 14 de sexo femenino (tabla 15), cifra que indica una distribución equitativa de los sexos asociada con la positividad del transcrito; otros estudios han reportado una mayor prevalencia masculina relacionada con la presencia del transcrito (Mertens et al., 1993; Nguyen et al., 2002; Santoyo-Sánchez et al., 2017).

Con respecto al lugar de origen de los pacientes, se detectó una mayor frecuencia de la enfermedad en la región suroccidental (27.3%), seguida de la región metropolitana (22.7%). Sin embargo, el análisis de varianza demostró que no existe una diferencia significativa entre la frecuencia de la enfermedad entre las regiones del país ($p=0.731$).

La LMA se caracteriza por la proliferación de células blásticas anormales de estirpe mieloide en la médula ósea y menor producción de células hemáticas normales, condicionando anemia y trombocitopenia en los pacientes afectados. En este estudio se determinó la relación entre las características hematológicas y la presencia del transcrito *AML1-ETO*, y se observó que tanto los

pacientes con la presencia o ausencia del transcrito presentaron anemia con valores disminuidos en el recuento eritrocitario, valores de hemoglobina y hematocrito, lo cual confiere un factor de riesgo en la respuesta a la quimioterapia (Dicato, Plawny, & Diederich, 2010).

El recuento leucocitario elevado en las primeras etapas de la LMA indica un mayor riesgo relativo en comparación con los grupos que presentan recuentos menores (Nguyen et al., 2002). En este estudio se demostró que la mediana del recuento leucocitario de los pacientes evaluados se encuentra dentro del rango de referencia, tanto en casos que presentan el transcrito como en los que no. Además, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.202$) entre los recuentos leucocitarios de ambos grupos. Sin embargo, cabe mencionar que se obtuvieron recuentos extremos en los dos grupos, ya que se registraron conteos de 2.3 hasta 93.3 $\times 10^9/L$ en los casos en los que se encontraba presente el transcrito y conteos de 1.0 a 950 $\times 10^9/L$ en su ausencia. Este hallazgo sugiere la necesidad de considerar el recuento leucocitario de manera individual para evaluar el pronóstico de los pacientes de forma más precisa.

La actividad trombocitopoyética influye en el curso de la enfermedad, ya que está asociado con un riesgo relativo en la sobrevida de la enfermedad cuando se encuentra en recuentos menores a los valores de referencia. Se define como trombocitopenia una cifra plaquetaria inferior a 150.000/ μL ; esta a su vez está clasificada como: leve (100.000 a 150.000/ μL), moderada (50.000 a 99.000/ μL) y severa (inferior a 50.000/ μL) (Buckley MF, 2000; Dacie JV, 1991; Pujol-Moix N, 2002). En el presente trabajo se obtuvieron rangos de recuento plaquetario que oscilan entre 3-61.9 $\times 10^9/L$ en los pacientes que presentaron el transcrito (Tabla 17), lo cual indica que todos presentan trombocitopenia. Por otra parte, en la misma tabla se muestra que los pacientes con ausencia del transcrito presentaron recuentos plaquetarios en varía de 3-577.6 $\times 10^9/L$, dentro de este grupo de pacientes algunos presentaron trombocitopenia, sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.007$) con relación a los pacientes que presentaron el transcrito (grafica 2, anexo 9). Este hallazgo es frecuente en pacientes que presentan el transcrito *AML1-ETO*, ya que, en condiciones normales, el gen *AML1* codifica para la proteína $CBF\alpha$, que junto a la proteína $CBF\beta$ forman el complejo CBF (factor de unión nuclear) que es un factor de transcripción esencial para una adecuada hematopoyesis (Owen & Fitzgibbon, 2010; Speck & Gilliland, 2002). Diversos estudios realizados internacionalmente también han reportado la presencia de trombocitopenia con la presencia del transcrito *AML1-ETO*, lo

cual pone de manifiesto que no es una característica única de la población guatemalteca (Arora & Arora, 2016; Wang, Ye, Yang, Lu, & Ying, 2016).

El análisis global de los resultados obtenidos en este estudio demuestra que la población guatemalteca con LMA presenta el transcrito *AML1-ETO* con una frecuencia similar a la reportada en otros países, aunque aparece más frecuentemente en la niñez, a diferencia de otras etnias. Así mismo, en concordancia con estudios realizados internacionalmente, se encontró que la presencia de dicho transcrito no presenta una asociación estadísticamente significativa de los conteos leucocitarios ni eritrocitarios, y que está asociado con trombocitopenia.

Los hallazgos de este estudio, así como los reportados por Morales (2012) y Oliva (2016), demuestran la necesidad de realizar análisis moleculares en la población leucémica guatemalteca, ya que, conocer de las características genéticas específicas del país permitirán al médico tratante orientar el tratamiento y al pronóstico del paciente de forma personalizada desde el principio, lo cual mejorará considerablemente sus posibilidades de recuperación y supervivencia.

X. CONCLUSIONES

- El transcrito *AML1-ETO* fue detectado en el 18.7% en los pacientes con LMA, lo cual concuerda con estudios internacionales que reportan frecuencias similares.
- La presencia del transcrito *AML1-ETO* se asocia de forma significativa con un recuento plaquetario bajo, en concordancia a lo reportado en otras poblaciones.
- No se detectó una diferencia significativa en los recuentos de leucocitos y eritrocitos determinados entre los pacientes que presentan el transcrito *AML1-ETO* y en aquellos que no lo presentan.
- No se estableció una diferencia estadísticamente significativa que evidenciara una asociación entre las características demográficas evaluadas y la presencia del transcrito *AML1-ETO*.
- Aunque la leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad que se caracteriza por aparecer con mayor frecuencia en adultos (edad media de 64 años) y poco frecuente en niños y adolescentes el 53% de los pacientes guatemaltecos de este estudio fueron menores de 18 años sugiriendo una aparición de la enfermedad a edad más temprana en nuestra población.

XI. RECOMENDACIONES

- Dar a conocer la información generada en este estudio a los médicos oncólogos tanto del área de adultos como en pediatría, para que tomen en consideración el estudio de transcrito *AML1-ETO* como parte de los exámenes de diagnóstico.
- Realizar un estudio con una población más grande para obtener resultados más representativos de todas las etnias del país.
- Continuar realizando estudios sobre otras alteraciones genéticas presentes en pacientes con leucemia mieloide aguda para brindar al médico y al paciente información más completa que incidirá sobre el pronóstico y tratamiento de la enfermedad.
- Implementar un sistema de monitoreo de la expresión del transcrito *AML1-ETO* en los pacientes portadores para evaluar la respuesta al tratamiento.
- Promover la introducción en el pensum de la carrera de Medicina un módulo sobre las pruebas de biología molecular, para dar a conocer temas de actualidad como lo es el manejo de enfermedades hematológicas orientadas por marcadores genéticos.
- Elaborar un sitio web dirigido a pacientes, familiares o a personas fuera del ámbito médico, donde se brinde información accesible sobre la importancia de las pruebas moleculares disponibles en Guatemala para el manejo de enfermedades hematológicas, con posibilidad de un chat para resolución de dudas respaldado por médicos especialistas.

XII. REFERENCIAS

- American Cancer Society. (2014). Cancer Facts & Figures 2014. *Cancer Facts and Figures*, 1–72. <http://doi.org/10.1177/0300985809357753>
- Andrieu, V., Radford-Weiss, I., Troussard, X., Chane, C., Valensi, F., Guesnu, M., ... Macintyre, E. (1996). Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *British Journal of Haematology*, 92(4), 855–865.
- Arber, D., Stein, A., Carter, N., & Slovak, M. (2003). Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *American Journal of Clinical Pathology*, 119(5), 672–8. <http://doi.org/10.1309/EM7K-CQR4-GLMH-RCX4>
- Arora, R. S., & Arora, B. (2016). Acute leukemia in children: A review of the current Indian data. *South Asian Journal of Cancer*, 5(3), 155–160. <http://doi.org/10.4103/2278-330X.187591>
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal ...*, 103(4), 620–625. Retrieved from <http://annals.org/article.aspx?articleid=699999>
- Berger, R., Bernheim, A., Daniel, M. T., Valensi, F., Sigaux, F., & Flandrin, G. (1982). Cytologic characterization and significance of normal karyotypes in t(8;21) acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 59(1), 171–8.
- Bloomfield, C. D., Lawrence, D., Byrd, J. C., Carroll, A., Pettenati, M. J., Tantravahi, R., ... Mayer, R. J. (1998). Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Research*, 58(18), 4173–4179.
- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., & Gilbert, W. V. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* (Vol. 112). <http://doi.org/10.1002/0471142727.mb0425s112>

- Carranza, C., Granados, L., Morales, O., Jo, W., Villagran, S., Tinti, D., ... Silva, G. (2013). Frequency of the ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, TCF3-PBX1, and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations. *Cancer Genetics*, 206(6), 227–32. <http://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.05.017>
- Carranza, C., Menendez, I., Herrera, M., Castellanos, P., Amado, C., Maldonado, F., ... Tekin, M. (2015). A Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala. *Clinical Genetics*, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1111/cge.12676>
- Chen, C.-C., Gau, J.-P., Yu, Y.-B., Lu, C.-H., Lee, K.-D., & You, J.-Y. (2007). Prognosis and treatment outcome in patients with acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Advances in Therapy*, 24, 907–920. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901040>
- Cheng, Y., Wang, Y., Wang, H., Chen, Z., Lou, J., Xu, H., ... Jin, J. (2009). Cytogenetic profile of de novo acute myeloid leukemia: A study based on 1432 patients in a single institution of China. *Leukemia*. <http://doi.org/10.1038/leu.2009.107>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Contreras, N., Silva, C., & Mateus, H. (2009). *Citogenética aplicada a la medicina*. Bogotá: Editorial Universidad del Rosario.
- Crespo-Solís, E. (2010). Epidemiología de las leucemias agudas. *Hematología*, 11(Supl 1): 37-39.
- Dicato, M., Plawny, L., & Diederich, M. (2010). Anemia in cancer. In *Annals of Oncology* (Vol. 21). <http://doi.org/10.1093/annonc/mdq284>
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., ... Bloomfield, C. D. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453–474. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>
- Downing, J. R. (1999). The *AML1-ETO* chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia:

- biology and clinical significance. *British Journal of Haematology*, 106(2), 296–308. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01377.x>
- Dunne, J., Gascoyne, D. M., Lister, T. A., Brady, H. J. M., Heidenreich, O., & Young, B. D. (2010). AML1/ETO proteins control POU4F1/BRN3A expression and function in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, 70(10), 3985–95. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3604>
- Ferrara, F., & Vecchio, L. Del. (2002). Acute myeloid leukemia with t(8;21)/AML1/ETO: a distinct biological and clinical entity. *Haematologica*, 87, 306–19. Retrieved from <http://www.haematologica.it/content/87/3/306.short>
- Ghazaey Zidanloo, S., & Hosseinzadeh Colagar, A. (2014). Geographic heterogeneity of the AML1-ETO fusion gene in Iranian patients with acute myeloid leukemia. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 3(1), 7–13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989731>
- Grimwade, D., & Hills, R. K. (2009). Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 385–95. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.385>
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., ... Bloomfield, C. D. (2000). The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematology Journal*. <http://doi.org/10.1038/sj.thj.6200013>
- Harrison, C. J., Hills, R. K., Moorman, A. V, Grimwade, D. J., Hann, I., Webb, D. K. H., ... Gibson, B. E. S. (2010). Cytogenetics of Childhood Acute Myeloid Leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2674–2681. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.8997>
- Higuchi, M., O'Brien, D., Kumaravelu, P., Lenny, N., Yeoh, E. J., & Downing, J. R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 1(1), 63–74. [http://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00016-8](http://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00016-8)

- Ishikawa, Y., Kiyoi, H., Tsujimura, A., Miyawaki, S., Miyazaki, Y., Kuriyama, K., ... Naoe, T. (2009). Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 83(2), 90–8. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01261.x>
- Jaffe, E. Harris, N., Stein, H., & Vardiman, J. (2001). *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press.
- Kelly, L. M., & Gilliland, D. G. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3, 179–198.
- Lo Coco, F., Avvisati, G., Diverio, D., Petti, M. C., Alcalay, M., Pandolfi, P. P., ... Moleti, M. L. (1991). Molecular evaluation of response to all-trans-retinoic acid therapy in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 77(8), 1657–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849758>
- Löwenberg, B., Griffin, J. D., & Tallman, M. S. (2003). Acute Myeloid Leukemia and Acute Promyelocytic Leukemia. *ASH Education Program Book*, 2003(1), 82–101. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2003.1.82>
- Marcucci, G., Mrozek, K., Ruppert, A. S., Maharry, K., Kolitz, J. E., Moore, J. O., ... Bloomfield, C. D. (2005). Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*, 23(24), 5705–5717. <http://doi.org/23/24/5705> [pii]r10.1200/JCO.2005.15.610
- Mertens, F., Johansson, B., & Mitelman, F. (1993). Age- and gender-related heterogeneity of cancer chromosome aberrations. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 70(1), 6–11.
- Miller, W. H. J., Kakizuka, A., Frankel, S. R., Warrell, R. P. J., DeBlasio, A., Levine, K., ... Dmitrovsky, E. (1992). Reverse transcription polymerase chain reaction for the rearranged retinoic acid receptor alpha clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2694–2698.

- Morales, O. (2012). *Determinación de la frecuencia de los transcritos de fusión de BCR-ABL (ela2,b2a2 y b3a2) por RT_PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo b (LLA-B)*. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mrózek, K., Heerema, N. A., & Bloomfield, C. D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews*, 18(2), 115–36. [http://doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00040-7](http://doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00040-7)
- Mrózek, K., Marcucci, G., Nicolet, D., Maharry, K. S., Becker, H., Whitman, S. P., ... Bloomfield, C. D. (2012). Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 30(36), 4515–4523.
- Mrózek, K., Prior, T. W., Edwards, C., Marcucci, G., Carroll, A. J., Snyder, P. J., ... Bloomfield, C. D. (2001). Comparison of Cytogenetic and Molecular Genetic Detection of t(8;21) and inv(16) in a Prospective Series of Adults With De Novo Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*, 19(9), 2482–2492. Retrieved from <http://jco.ascopubs.org/content/19/9/2482.abstract>
- Narimatsu, H., Yokozawa, T., Iida, H., Tsuzuki, M., Hayakawa, M., Takeo, T., ... Sugiura, I. (2007). Clinical characteristics and outcomes in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia in Japan. *Leukemia*, 22(2), 428–432. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404905>
- Nguyen, S., Leblanc, T., Fenaux, P., Witz, F., Blaise, D., Pigneux, A., ... Dombret, H. (2002). A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood*, 99(10), 3517–23. <http://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3517>
- Nimer, S. D., & Moore, M. A. S. (n.d.). Effects of the leukemia-associated AML1-ETO protein on hematopoietic stem and progenitor cells. *Oncogene*, 23(24), 4249–4254. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207673>
- Oliva, A. (2016). *Determinación de la frecuencia de mutaciones en los exones 8 y 17 del pro-oncogén KIT por PCR de punto final y secuenciación de ADN en pacientes con leucemia mieloide aguda*

(LMA). Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Owen, C. J., & Fitzgibbon, J. (2010). The Genetics of Acute Myeloid Leukemias. In *Molecular Hematology: Third Edition*. <http://doi.org/10.1002/9781444318531.ch4>
- P, C., & N, S. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-. *Anal Biochem*, 162(1), 156–159. <http://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Pallisgaard, N., Hokland, P., Riishøj, D. C., Pedersen, B., & Jørgensen, P. (1998). Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood*, 92(2), 574–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9657758>
- Ptasinska, A., Assi, S. A., Mannari, D., James, S. R., Williamson, D., Dunne, J., ... Bonifer, C. (2012). Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*, 26(8), 1829–1841. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2012.49>
- Reikvam, H., Hatfield, K. J., Kittang, A. O., Hovland, R., & Bruserud, Ø. (2011). Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: clinical consequences and biological implications. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 104631. <http://doi.org/10.1155/2011/104631>
- Renneville, a, Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., & Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, 22(5), 915–31. <http://doi.org/10.1038/leu.2008.19>
- Santoyo-Sánchez, A., Ramos-Peñañiel, C. O., Saavedra-González, A., González-Almanza, L., Martínez-Tovar, A., Olarte-Carrillo, I., & Collazo-Jaloma, J. (2017). Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia en dos centros de referencia del valle de México. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(1), 44–48.
- Shen, Y., Zhu, Y.-M., Fan, X., Shi, J.-Y., Wang, Q.-R., Yan, X.-J., ... Chen, S.-J. (2011). Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1,185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/early/2011/08/30/blood-2011-03->

343988.abstract

- Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., ... Appelbaum, F. R. (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 96(13), 4075–4083. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005538>
- Speck, N. a, & Gilliland, D. G. (2002). Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 2(7), 502–513. <http://doi.org/10.1038/nrc840>
- Stanoszek, L. M., Crawford, E. L., Blomquist, T. M., Warns, J. A., Willey, P. F. S., & Willey, J. C. (2013). Quality control methods for optimal BCR-ABL1 clinical testing in human whole blood samples. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 15(3), 391–400. <http://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.02.004>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., ... Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), blood-2016-01-643569. <http://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Thalhammer-Scherrer, R., Mitterbauer, G., Simonitsch, I., Jaeger, U., Lechner, K., Schneider, B., ... Schwarzinger, I. (2002). The Immunophenotype of 325 Adult Acute Leukemias: Relationship to Morphologic and Molecular Classification and Proposal for a Minimal Screening Program Highly Predictive for Lineage Discrimination . *American Journal of Clinical Pathology* , 117(3), 380–389. Retrieved from <http://ajcp.ascpjournals.org/content/117/3/380.abstract>
- van Dongen, J. J., Macintyre, E. a, Gabert, J. a, Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., ... Biondi, a. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, 13(12), 1901–1928.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., ... Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid

neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937 LP-951.
Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/114/5/937.abstract>

Yu, G., Yin, C., Jiang, L., Xu, D., Zheng, Z., Wang, Z., ... Meng, F. (2018). Amyloid precursor protein has clinical and prognostic significance in AML1-ETO-positive acute myeloid leukemia. *Oncology Letters*, 15(1), 917–925. <http://doi.org/10.3892/ol.2017.7396>

XIII. ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 18. Clasificación de los cromosomas humanos

Grupo	Cromosomas	Clasificación
A	1, 2, 3	Metacéntricos
B	4, 5	Submetacéntricos
C	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	Submetacéntricos
D	13, 14, 15	Acrocéntricos
E	16, 17, 18	Submetacéntricos
F	19, 20	Submetacéntricos
G	21, 22	Acrocéntricos

Fuente: Contreras , N., Silva, C., & Mateus, H. (2009). *Citogenética aplicada a la medicina*. Bogotá: Editorial Universidad del Rosario.

Anexo 2

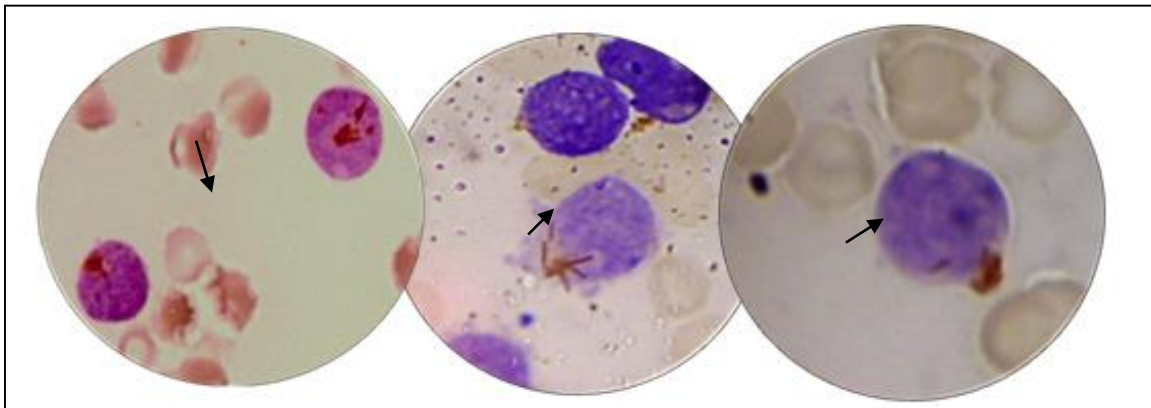


Figura 2. Aspirado de médula ósea con blastos mieloperoxidasa (MPOX) positivos y bastones de Auer, LMA subtipo M2. La figura señala la presencia de bastones de Auer en blastos de muestras de médula ósea teñidas con mieloperoxidasa. Fuente: Espínola, A., Rodríguez, M., Campos, S., Ferreira, J., Noguera J, & Figueredo, S. (2011). Leucemia mieloide aguda con $t(8;21)(q22;2q2)$. Reporte de casos. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 64-71.

Anexo 3

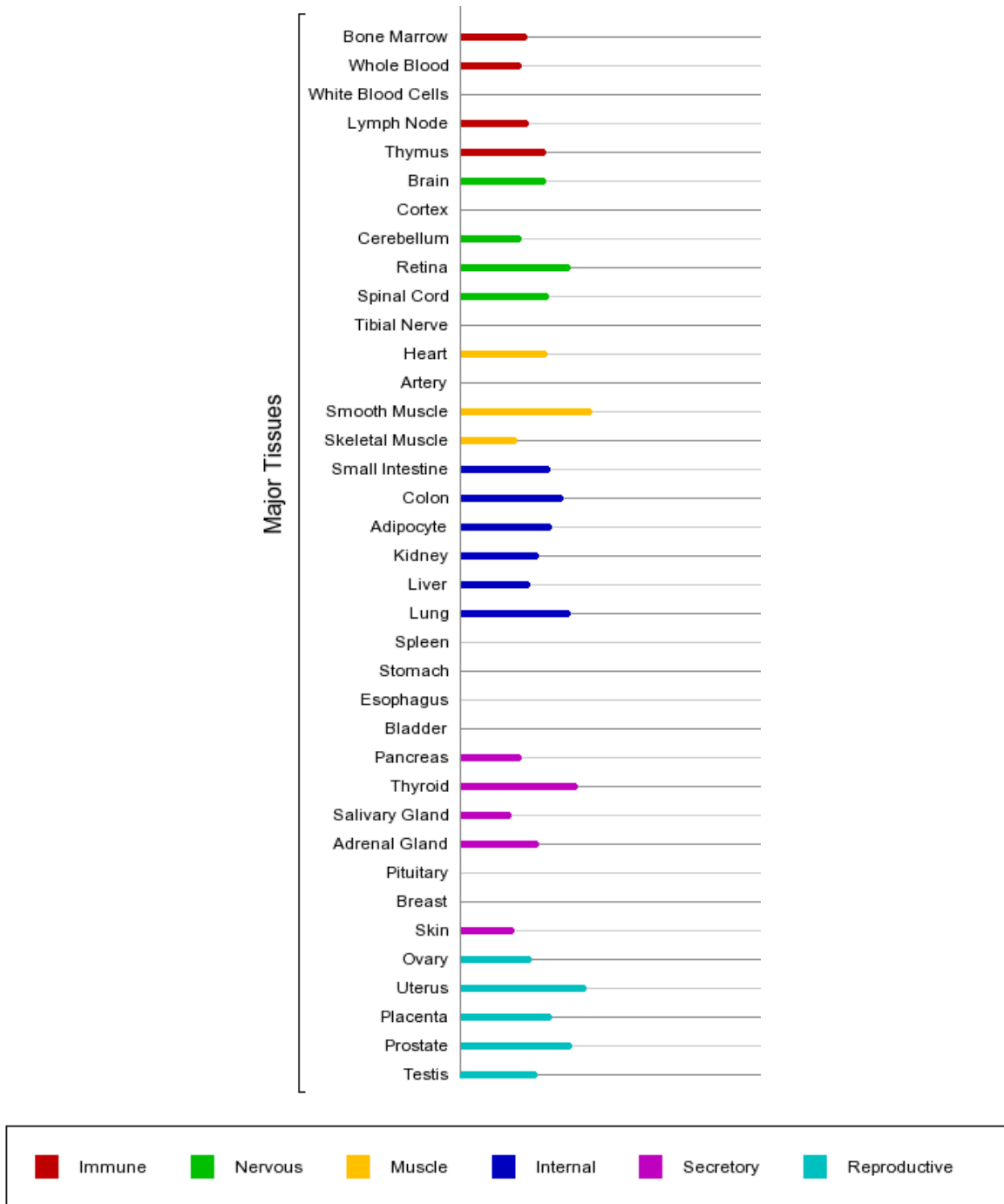


Figura 3. Expresión normal del gen *ABL1* en tejidos humanos.

Fuente: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABL1>, obtenido el 11 de marzo de 2016

Anexo 4

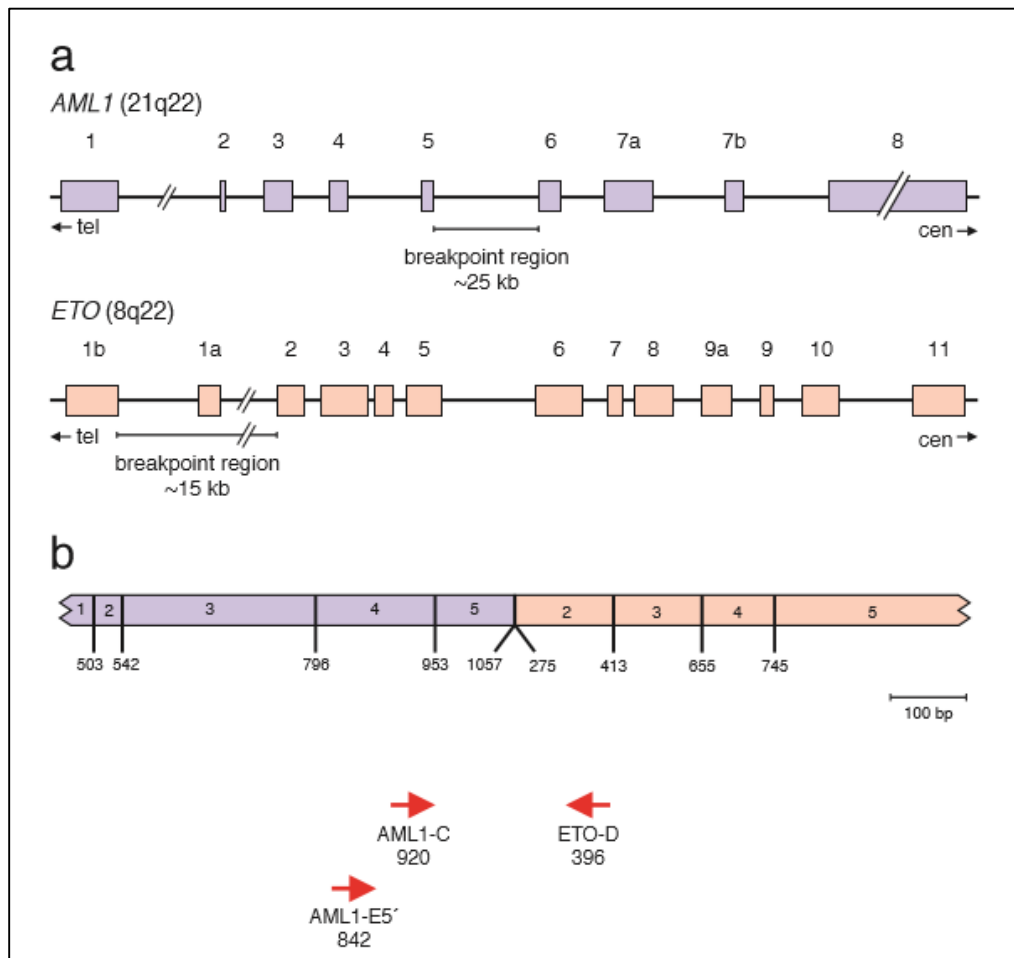


Figura 4. Diagrama esquemático de los genes *AML1*, *ETO* y del transcrito *AML1-ETO*, cebadores utilizados para su amplificación. *Nota.* **a.** Diagrama esquemático de los puntos de corte de los genes *AML1* y *ETO* implicados en la $t(8;21)(q22;q22)$, la numeración de los exones está orientada según la posición centrómero (cen), telomero (tel). **b.** Diagrama esquemático del transcrito *AML1-ETO*, los números bajo el gen de fusión corresponden a los nucleótidos implicados de cada exón (5'). Se señala la posición de cada uno de los cebadores utilizados en la amplificación del transcrito de fusión.

Fuente: Modificado de: van Dongen, J. J., Macintyre, E. a, Gabert, J. a, Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., ... Biondi, a. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 13(12), 1901–1928.

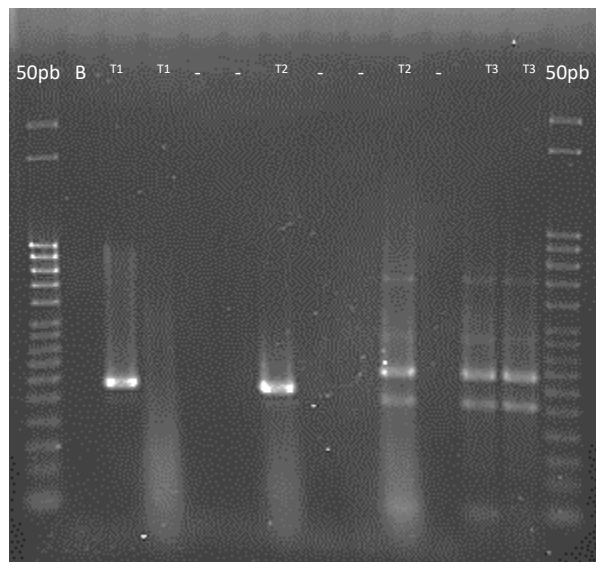
Anexo 5

Figura 5. Estandarización de la técnica RT-PCR para el transcrito *AML1-ETO*: electroforésis de la estandarización de la RT-PCR para el transcrito *AML1-ETO*, para dicha estandarización se probaron tres temperaturas de hibridación (T: 64.3, 65.3, 66.7°C), tomando la temperatura de 65°C como óptima.

Anexo 6

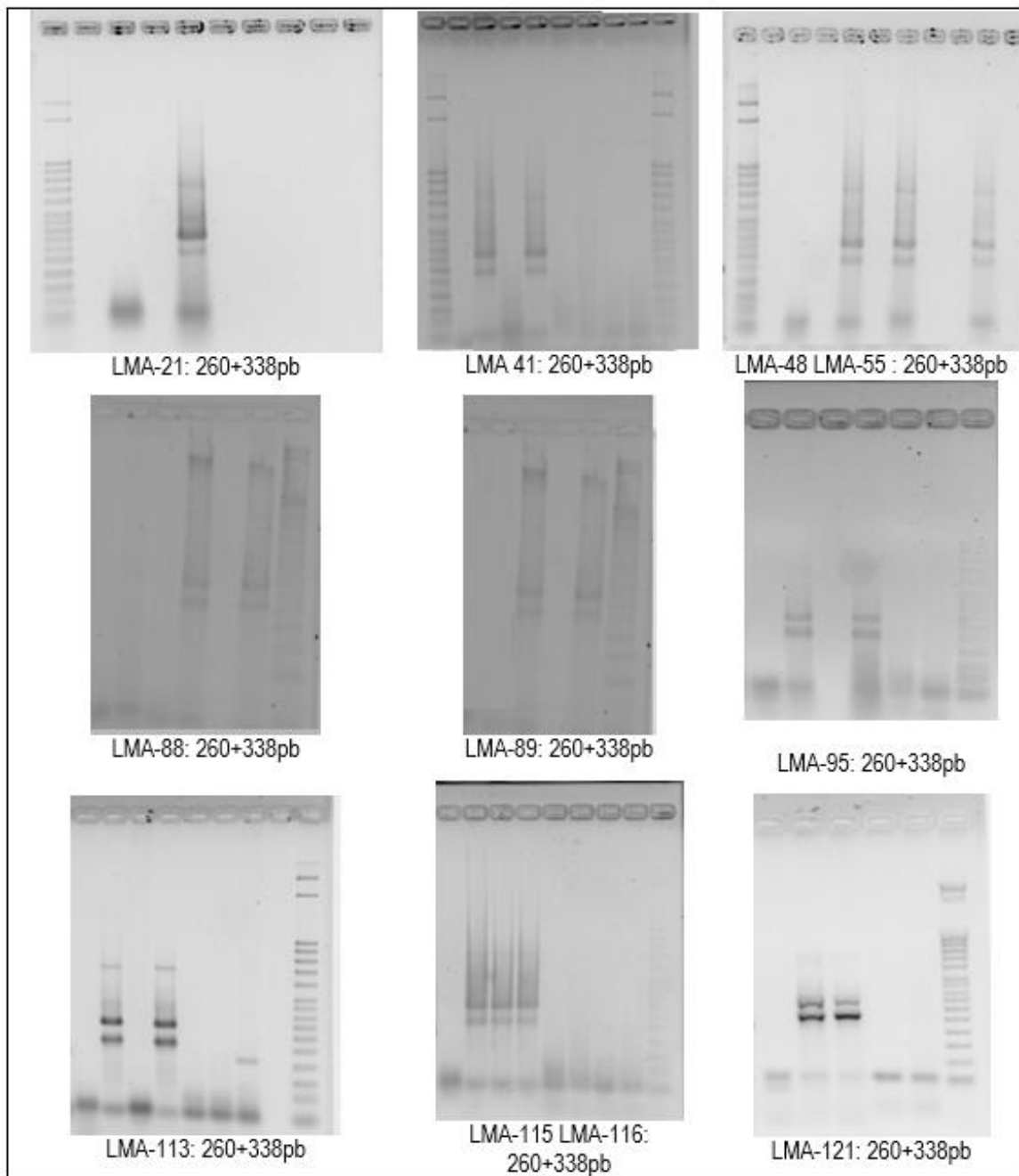


Figura 6. Resultados de electroforesis de la RT-PCR para el transcrito *AML1-ETO*, en todas las amplificaciones se puede observar la presencia de dos bandas de 260 y de 338 pb, muestras positivas LMA 21-121.

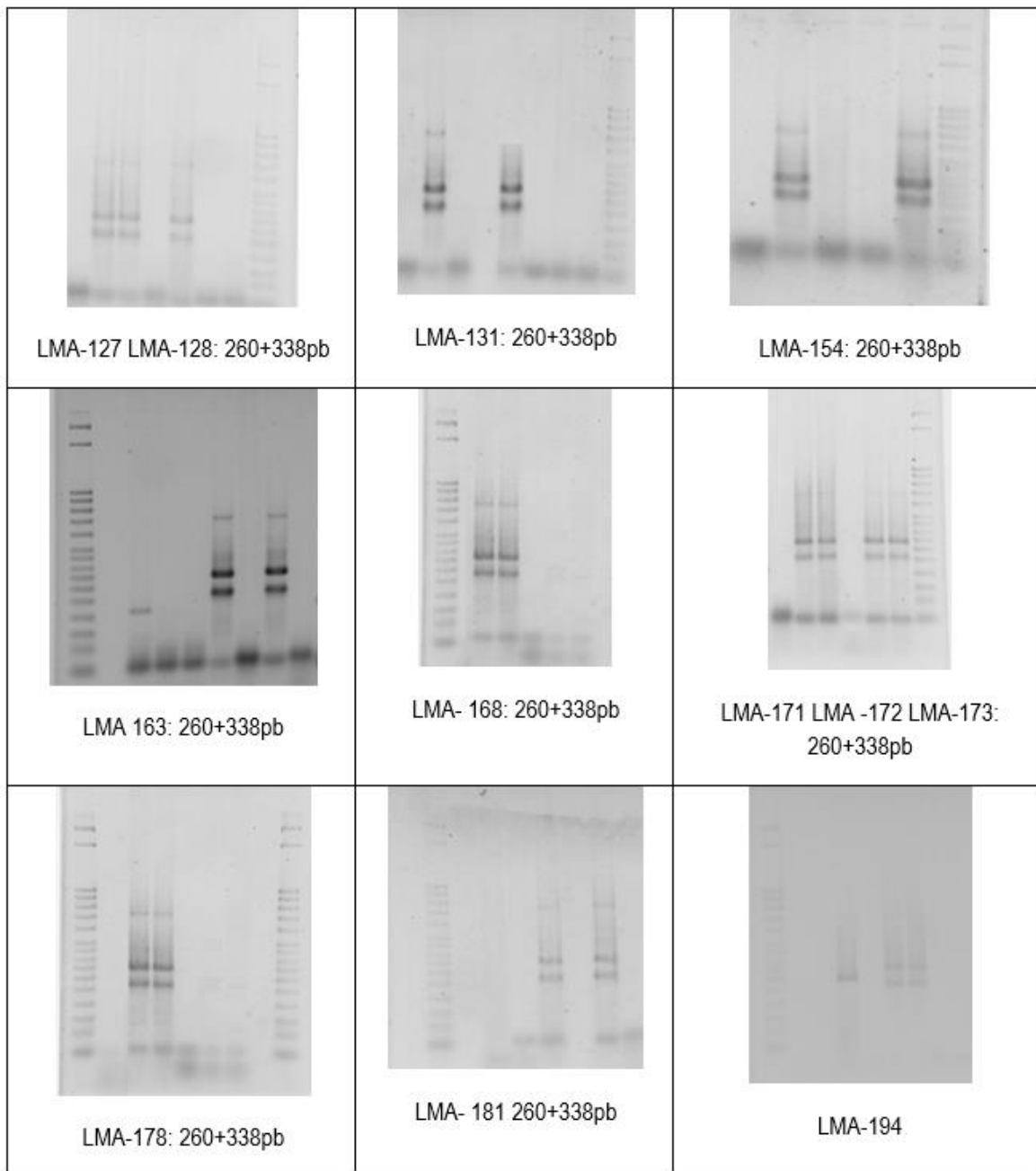


Figura 7: Resultados de electroforesis de la RT-PCR para el transcrito *AML1-ETO*, en todas las amplificaciones se puede observar la presencia de dos bandas de 260 y de 338 pb, muestras positivas LMA 127-194.

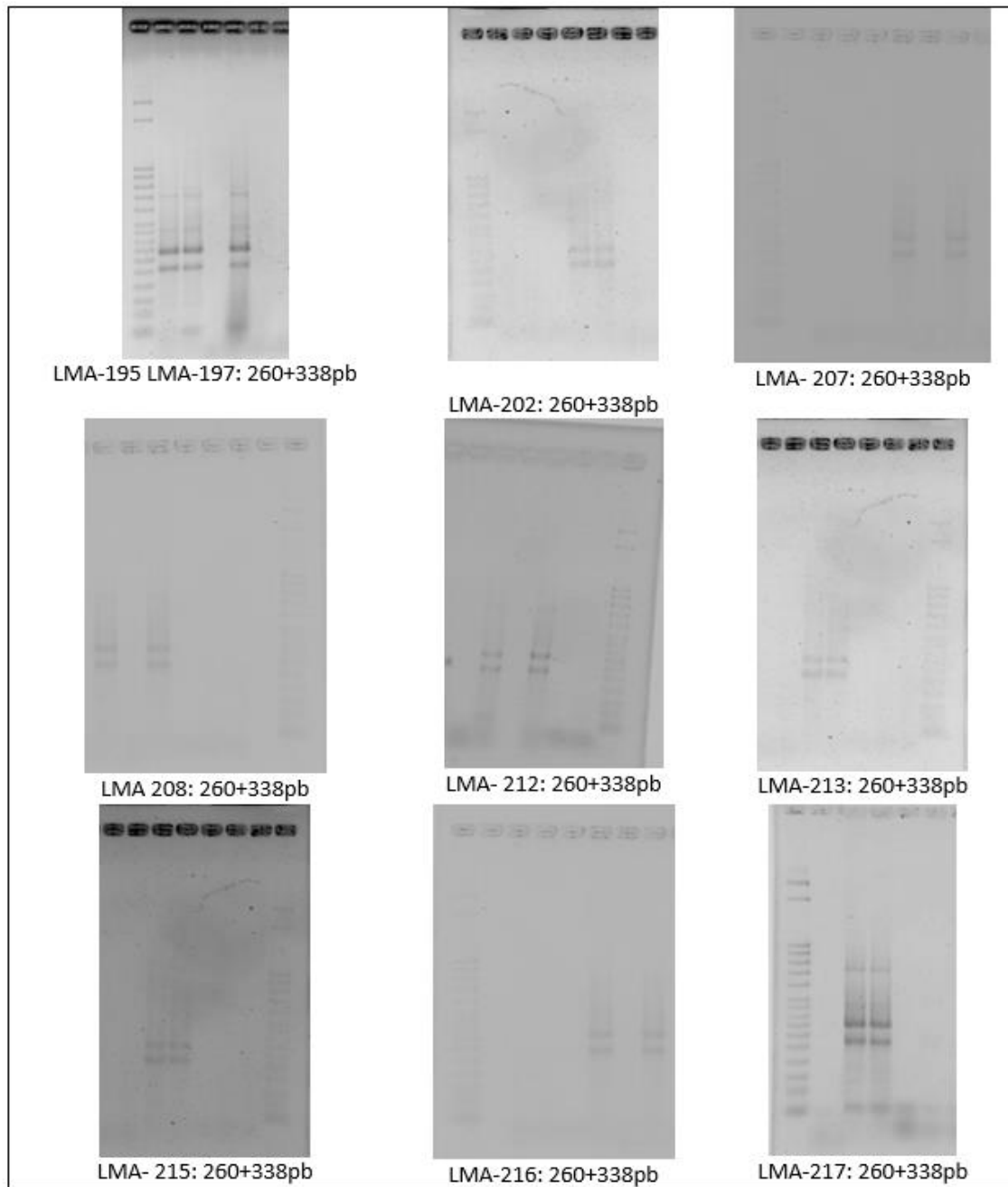
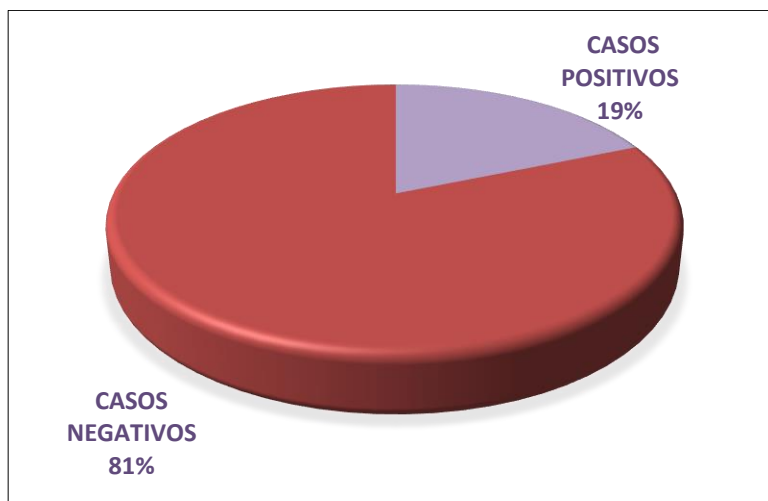


Figura 8: electroforesis de la RT-PCR para el transcrito *AML1-ETO*, en todas las amplificaciones se puede observar la presencia de dos bandas de 260 y de 338 pb, muestras positivas LMA 195-217.

Anexo 7



Grafica 1. Frecuencia del transcrito AML1-ETO

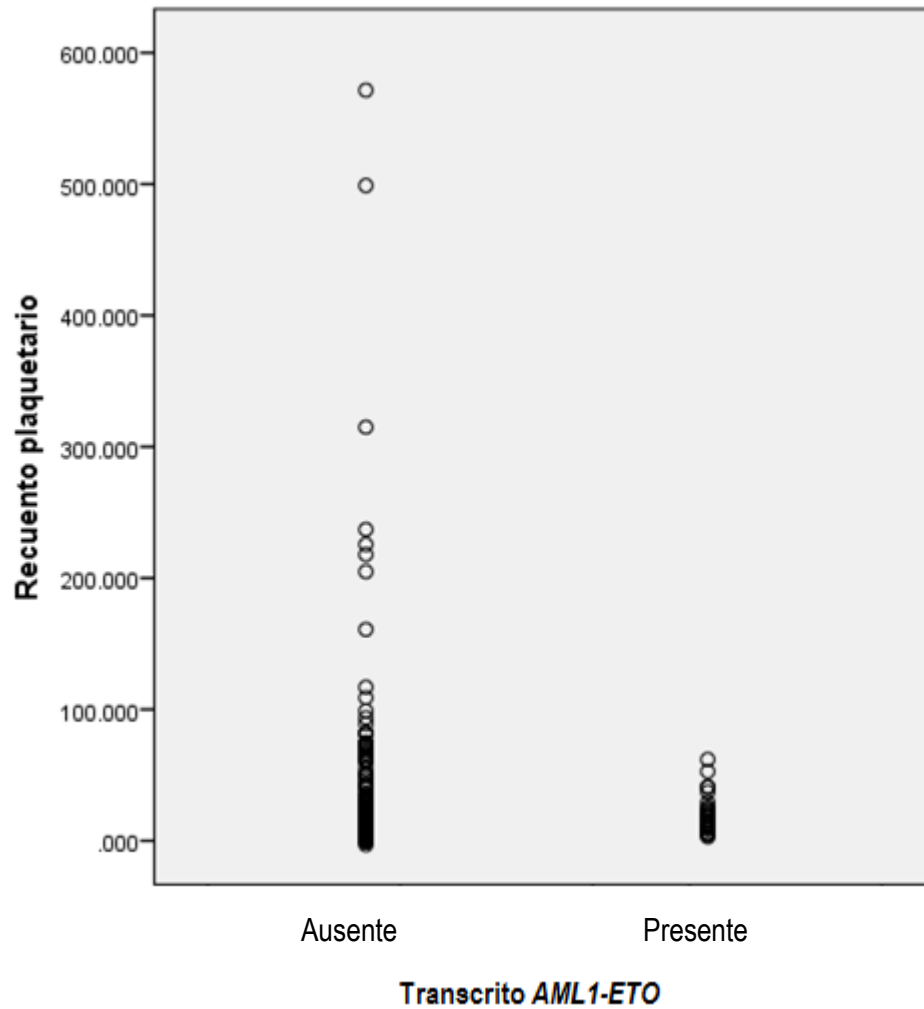
Anexo 8

Tabla 19. Frecuencia del transcrito AML1-ETO relacionado con otras poblaciones

País	Frecuencia
China	13.6
Cuba	15%
Estados Unidos	8-15%
Guatemala	18.7%
India	14.58%
Irán	3-4%
Reino Unido	12-14%

Fuente: datos experimentales; (Menéndez et al., 2012; American Center Society INC, 2014 ; Harrison, Hills, & Moorman, 2010; Grimwade, Hills, & Moorman, 2010; Bhatia et al., 2012; Zhijian, Yu-book, & Jianbo, 1995; Kumari, 2013.

Anexo 9

Gráfica 2. Relación del recuento plaquetario y positividad del transcrito *AML1-ETO*

Se puede observar que existe diferencia significativa en los recuentos plaquetarios entre los pacientes que tuvieron presente el transcrito *AML1-ETO* y los que estuvieron ausente.

Fuente: datos experimentales.



INVEGEM

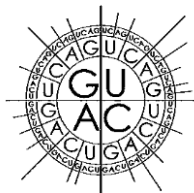
INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN DE LAS
ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS

BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE PACIENTES

CÓDIGO DE LA
MUESTRA

Uso exclusivo
INVEGEM

DATOS GENERALES DEL PACIENTE		INFORMACION HEMATOLÓGICA	
NOMBRE: _____ EDAD: _____ FECHA DE NACIMIENTO: ____/____/____ LUGAR DE ORIGEN: _____ ETNIA: _____ TELÉFONO: _____ DIRECCIÓN: _____		FECHA: ____/____/____ RECuento ERITROCITARIO: _____ RECuento LEUCOCITARIO: _____ RECuento PLAQUETARIO: _____ HEMOGLOBINA: _____ HEMATOCRITO: _____ % BLASTOS: _____	
INFORMACIÓN CLÍNICA DEL PACIENTE		TIEMPOS DE COAGULACIÓN (PACIENTES CON TV)	
HOSPITAL DE REFERENCIA: <input type="checkbox"/> ROOSEVELT <input type="checkbox"/> IGSS <input type="checkbox"/> UNOP <input type="checkbox"/> GENERAL SAN JUAN DE DIOS <input type="checkbox"/> OTRO (especifique): _____ MEDICO QUE REFIERE: _____ TELÉFONO: _____ IMPRESIÓN CLÍNICA: <input type="checkbox"/> LMC ¹ <input type="checkbox"/> LLA ² <input type="checkbox"/> TE ³ <input type="checkbox"/> PV ⁴ <input type="checkbox"/> MI ⁵ <input type="checkbox"/> TV ⁶ <input type="checkbox"/> SMD ⁷ <input type="checkbox"/> LMA ⁸ SUBTIPO LMA: _____ EVENTOS TROMBÓTICOS PREVIOS: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI No. DE EVENTOS: _____ ESPLENOMEGALIA: <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI GRADO: _____ OTROS HALLAZGOS RELACIONADOS A LA ENFERMEDAD: _____ _____ <small>¹Leucemia Mieloide Crónica, ²Leucemia Linfoblástica Aguda, ³Trombocitosis Esencial, ⁴Policitemia Vera, ⁵Mielofibrosis Idiopática, ⁶Tromboembolismo Venoso, ⁷Síndromes Mielodisplásicos, ⁸Leucemia Mieloide Aguda.</small>		FECHA: ____/____/____ TIEMPO DE PROTROMBINA: _____ TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL: _____	
		OTRAS PRUEBAS	
		FECHA: ____/____/____ CARIOTIPO/FISH*: _____ FECHA: ____/____/____ INMUNOFENOTIPO*: _____ FECHA: ____/____/____ ECOGRAFÍA DOPPLER**: _____ FECHA: ____/____/____ TOMOGRFÍA HELICOIDAL**: _____	
		*Llenar en LMC y LLA; ** llenar en TV	
		PACIENTES EN TRATAMIENTO CON IMATINIB O ANÁLOGOS	
		FECHA DE DIAGNÓSTICO: ____/____/____ FECHA DE INICIO TRATAMIENTO: ____/____/____ TRATAMIENTO Y DOSIS: _____ _____	
INFORMACIÓN DE LA MUESTRA			
FECHA DE RECOLECCIÓN: ____/____/____ TIPO DE MUESTRA: <input type="checkbox"/> SANGRE PERIFÉRICA <input type="checkbox"/> MÉDULA ÓSEA			
PRUEBA	TUBO DE RECOLECCIÓN	TIPO DE MUESTRA	
ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS TRANSCRITOS ETV6-AML1 t(12;21) E2A-PBX t(1;19) MLL-AF4 t(4;11) y BCR-ABL t(9;22) EN LLA.	1 TUBO EDTA (MORADO)	MÉDULA ÓSEA*	
ANÁLISIS CUALITATIVO DEL TRANSCRITO BCR-ABL t(9;22) EN LMC.	1 TUBO EDTA (MORADO)	MÉDULA ÓSEA*	
ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL TRANSCRITO BCR-ABL t(9;22) EN LMC	3 TUBOS EDTA (MORADO) **	SANGRE PERIFÉRICA	
ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2 EN TE, PV Y MI.	2 TUBOS EDTA (MORADO)	SANGRE PERIFÉRICA	
MUTACIONES PUNTUALES EN FACTOR V Y FACTOR II EN TV	2 TUBOS EDTA (MORADO)	SANGRE PERIFÉRICA	
ANÁLISIS DE LA DELESIÓN 5q EN SMD	1 TUBO HEPARINA (VERDE)	MÉDULA ÓSEA	
ANÁLISIS CUALITATIVO DE LOS TRANSCRITOS AML1-ETO t(8;21), PLM-RARα t(15;17), CFBF-MYH11 inv(16) y MONOSOMÍA 7 EN LMA	1 TUBO EDTA (MORADO) 1 TUBO HEPARINA (VERDE)	MÉDULA ÓSEA*	
<small>* Utilizar sangre periférica en recuentos >100,000 leucocitos/mm³ y un porcentaje de blastos >90% ** Análisis recomendado para seguimiento de terapia, 8ml mínimo para pacientes con conteo leucocitario dentro del rango (5,000-10,000/mm³), de lo contrario comunicarse al laboratorio antes de la toma de la muestra.</small>			



INVEGEM
INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN DE LAS
ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS
INFORMACIÓN GENERAL

INDICACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

1. Ayuno previo de 6 – 4 horas a la toma de muestra.
2. Requisitos mínimos de las muestras:
3. Recolectar la muestra en tubos al vacío con EDTA (morado) y con Heparina (verde) cuando se requiera.
4. Volumen requerido según el tipo de análisis solicitado:
 - Sangre periférica: 4 mL por tubo solicitado
 - Médula Ósea: 3 mL (mínimo 2 mL por tubo)
 - No coagulada
 - No hemolizada
5. Almacenamiento y transporte:
 - Muestras recolectadas en tubos con EDTA: almacenar y transportar a 4 °C
 - Muestras recolectadas en tubos con Heparina de Sodio: almacenar y transportar temperatura ambiente (25°C)
 - No deben congelarse
 - Deben ser referidas menos de 24 horas después de la toma
 - Las muestras se recogen únicamente de lunes a viernes de **8:30 a 12:00 horas**.

HORARIO DE ATENCIÓN Y CONSULTAS

Km 28.5 Carretera a Bárcenas, Santa Lucía Milpas Altas. Sacatepéquez, Guatemala.
Lunes a Viernes 8:00 – 16:30 horas
PBX: 66243838



INVEGEM

Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

Consentimiento Informado para Pruebas Genéticas

1. Título del proyecto

“Genética de la leucemia mieloide aguda (LMA)”

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

2. Investigador Principal

Dra. Claudia Carranza

3. Institución

INVEGEM

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

INTRODUCCIÓN

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

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

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

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



INVEGEM

Rozas Botrán ONG

INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS

PARTICIPANTES

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

Criterios de Inclusión

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

Criterios de exclusión:

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

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

PROCEDIMIENTOS

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

RIESGOS

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



INVEGEM
Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

BENEFICIOS

La determinación de la presencia de los marcadores: Inv16, t(15;17), t(8;21), monosomía 7, gen flt3, c-kit ; NMP1 y otros genes, que brindan información sobre el pronóstico de su enfermedad. En el caso de tener algún marcador positivo, su médico sabrá que su enfermedad tienen un pronóstico favorable para usted, si en caso es negativo, también esto guiará al médico a seleccionar los tratamientos más adecuados. Además sus resultados contribuirán a mejor conocimiento de la leucemia mieloide aguda en Guatemala.

Sin importar el resultado del análisis, se le entregará una copia de los resultados como evidencia del análisis efectuado en el estudio. Y por último también su información ayudará en otros proyectos de investigación que ayuden a la cura y tratamiento del cáncer.

PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

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

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

Si usted cancela esta autorización, el Investigador Principal no usará ni divulgará su información personal ni de su salud.

La autorización para el uso y el acceso de la información protegida de la salud para los propósitos de la investigación es totalmente voluntaria.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO VOLUNTARIOS

Su participación en este estudio es **voluntaria**. Usted puede decidir participar o retirarse del estudio en cualquier momento, su decisión no resultará en ninguna penalidad.



INVEGEM
Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

UTILIZACIÓN DE MUESTRAS Y RESULTADOS

La muestra de médula ósea o sangre obtenida de usted será utilizada para el presente estudio; y no saldrá del país, el análisis se realizará en INVEGEM. Se podrá almacenar su muestra para futuros estudios dentro de las instalaciones de INVEGEM, y se podrá utilizar para otros estudios que ayuden al conocimiento de la genética de leucemia mieloide aguda.

PREGUNTAS

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

- Dra. Claudia Carranza, Coordinadora de Laboratorios INVEGEM
Tel. 40507444 Correo electrónico: ccarranza@invegem.org .
- Dr. Mario Alberto Figueroa Álvarez, Presidente Comité Nacional de Ética en Salud
Tel. 59080340

OTROS ASPECTOS DE INTERÉS:

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

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

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



INVEGEM
Rozas Botrán ONG

**INSTITUTO PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN ACERCA
DE LAS ENFERMEDADES GENÉTICAS Y METABÓLICAS HUMANAS**

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Señores
Instituto de Investigación sobre Enfermedades Genéticas y Metabólicas
INVEGEM

Yo, _____ (nombre y apellidos) de ____ años edad y con cédula de vecindad o DPI _____ he sido informado/a sobre la participación de mi o de mi hijo _____ en el proyecto “*Genética de la leucemia mieloide aguda (LMA)*”; en el que se tomará una muestra de sangre periférica o médula ósea para la realización de las pruebas necesarias. El resultado de la prueba de brindará información a mi médico sobre el pronóstico de mi enfermedad o la de mi hijo.

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

Autorizo el uso de la muestra de sangre periférica o médula ósea para la presente investigación y otras investigaciones que contribuyan a conocer más sobre el comportamiento y tratamiento de la enfermedad.

Por lo tanto, otorgo mi consentimiento para la extracción de sangre periférica o médula ósea y uso del resultado de mi prueba para la presente investigación. Comprendo que mis datos pueden ser publicados en revistas científicas o ser presentados en reuniones médicas, pero mi identidad no será divulgada.

Fecha: _____

Firma del Paciente o huella digital: _____

Firma del médico/persona que realizó la extracción: _____

Sello de la institución



INVEGEM

INVEGEM / ROZAS BOTRÁN ONG
Instituto para la Investigación Científica y
Educación acerca de las Enfermedades
Genéticas y Metabólicas Humanas

Luisa Fernanda Rosales Hernández

Autora

PhD. Claudia Lorena Carranza Meléndez

Asesora

PhD. Ingrid Patricia Saravia Otten

Asesora

MSc. Alba Marina Valdéz de García

Revisora

MSc. Osberth Morales Esquivel

Director

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano