



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR DE CÁNCER  
EN LEUCEMIA**

**T E S I S**

que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

presenta:

**MC FERNANDO GARCÍA DOLORES**

**Directora de Tesis: DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO**



**México, D.F. 2010**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 22 del mes de Abril del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

IDENTIFICACIÓN DE UN MARCADOR MOLECULAR DE CÁNCER EN LEUCEMIA

Presentada por el alumno:

GARCÍA

Apellido paterno

DOLORES

Apellido materno

FERNANDO

Nombre(s)

Con registro: 

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 4 | 0 | 9 | 3 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

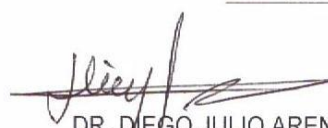
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Director(a) de tesis

  
DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO

  
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

  
DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

  
DRA. LUZ MARÍA BARAJAS FARIAS

  
DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México,D.F. el día 30 del mes Abril del año 2010 ,  
el (la) que suscribe Fernando García Dolores alumno (a) del Programa de  
Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B040930 ,  
adscrito a la Sección de Estudios de Posgrado de Investigación -ENMYH , manifiesta que es  
autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Irene Mendoza  
Lujambio y cede los derechos del trabajo intitulado "Identificación de un marcador  
molecular de cáncer en leucemia", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines  
académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del  
trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido  
escribiendo a la siguiente dirección irenem12005@yahoo.com.mx . Si el permiso se  
otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC FERNANDO GARCÍA DOLORES

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO  
DE GENÉTICA MOLECULAR.**

*Dedicatoria.*

*A*

*CHIJIRO*

*Mi compañera de viaje.*

*Para ti y por ti*

*Preciosa.*

## *Agradezco...*

*A mi compañera de viaje, Patty Luján, por ser la pieza que completa el rompecabezas.*

*A mis papas por el hogar en el que crecí.*

*A Beto y Sil por ser como son.*

*A Armando por cuidar de las niñas (las 3).*

*A Dani y Danae por la alegría que dan a la familia.*

*A la Dra. Irene, mi maestra, por ser eso, una gran maestra!*

*A mis amigos, ellos saben quiénes son.*

*A los profesores del PIBIOM, gracias por todo.*

*Un agradecimiento muy especial a Rosa María Arana por la ayuda y material proporcionado para la realización de esta tesis.*

# COMITÉ TUTORIAL

---

## DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRENE MENDOZA LUJAMBIO

(PIBIOM, ENMH, IPN)

## ASESORES:

DR. DIEGO ARENAS ARANDA

(IMSS, CMNSXXI, RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN  
GENÉTICA HUMANA)

DR. JUAN SANTIAGO SALAS BENITO

(PIBIOM, ENMH, IPN)

DRA. LUZ MARÍA BARAJAS FARÍAS

(PIBIOM, ENMH, IPN)

DR. CÉSAR AUGUSTO SANDINO REYES LÓPEZ

(PIBIOM, ENMH, IPN)

# CONTENIDO

---

|  |          |
|--|----------|
| ÍNDICE GENERAL                                   | 1        |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                | 4        |
| ÍNDICE DE TABLAS                                 | 5        |
| LISTA DE ABREVIATURAS                            | 6        |
| RESUMEN  | 7        |
| ABSTRACT   | 8        |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                           | <b>9</b> |
| 1.1. Definición                                  | 9        |
| 1.2. Historia de las leucemias                   | 10       |
| 1.3. Epidemiología de las Leucemias              | 10       |
| 1.4. Leucemia en niños                           | 14       |
| 1.5. Desarrollo normal de las células sanguíneas | 16       |
| 1.6. Origen y diferenciación                     | 16       |
| 1.7. Clasificación                               | 17       |
| 1.7.1. Leucemia linfoblástica aguda infantil     | 19       |
| 1.7.2. Leucemia mieloide aguda                   | 22       |
| 1.7.3. Leucemia promielocítica aguda             | 24       |
| 1.7.4. Leucemia mieloide crónica                 | 25       |
| 1.7.5. Leucemia linfoblástica crónica            | 28       |
| 1.7.6. Síndrome mielodisplásico                  | 30       |
| 1.8. Factores de riesgo para leucemia            | 33       |
| 1.9. Diagnóstico                                 | 36       |
| 1.9.1. Exámen clínico                            | 36       |
| 1.9.2. Hemograma                                 | 36       |
| 1.9.3. Mielograma                                | 37       |
| 1.9.4. Citogenética convencional                 | 37       |



|  |    |
|--|----|
| 1.9.5. Inmunofenotipificación                              | 37 |
| 1.9.6. Radiografía de torax                                | 37 |
| 1.9.7. Citogenética molecular                              | 38 |
| 1.9.8. FISH convencional                                   | 38 |
| 1.9.9. CGH (hibridación genómica comparada)                | 39 |
| 1.10. Tratamiento  | 40 |
| 1.11. Diagnóstico molecular                                | 41 |
| 1.11.1. Genes relacionados con leucemia                    | 41 |
| 1.12. Canales iónicos                                      | 43 |
| 1.12.1. Papel fisiológico de los canales de K <sup>+</sup> | 44 |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>                                     | 46 |
| 2.1. Canal iónico KCNH4 (BEC2)                             | 46 |
| 2.2. Cáncer y el canal KCNH4                               | 47 |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN</b>                                    | 49 |
| <b>4. HIPÓTESIS</b>  | 50 |
| <b>5. OBJETIVOS</b>  |    |
| 5.1. Objetivo general                                      | 51 |
| 5.2. Objetivos específicos                                 | 52 |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                               | 53 |
| 6.1. Criterios de selección de las muestras de pacientes   |    |
| 6.1.1. Criterios de inclusión                              | 53 |
| 6.1.2. Criterios de exclusión                              | 53 |
| 6.1.3. Muestras control                                    | 53 |
| 6.2. Material biológico                                    | 53 |
| 6.2.1. Selección de pacientes y muestras clínicas          | 53 |
| 6.3. Extracción de RNA total                               | 54 |
| 6.4. Retrotranscripción (Síntesis de cDNA)                 | 54 |
| 6.5. Valoración de la calidad del RNA                      | 54 |
| 6.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real    | 54 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.7. RT-PCR en tiempo real del gen de interés y del gen constitutivo     | 56        |
| 6.8. Búsqueda de Northern electrónico de <i>KCNH4</i>                    | 56        |
| 6.9. Estrategia experimental   | 57        |
| <b>7. RESULTADOS</b>   | <b>58</b> |
| 7.1. Northern electrónico de <i>KCNH4</i>                                | 58        |
| 7.2. Muestras clínicas   | 60        |
| 7.3. RT-PCR en tiempo real del gen constitutivo como del control interno | 60        |
| 7.4. RT-PCR en tiempo real del gen <i>KCNH4</i>                          | 61        |
| <b>8. DISCUSIÓN</b>  | <b>68</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>   | <b>72</b> |
| <b>10. PERSPECTIVAS</b>  | <b>73</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>74</b> |
| <b>ANEXOS</b>  | <b>90</b> |

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Fig. 1.</b> Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según sexo                                | 12 |
| <b>Fig. 2.</b> Distribución porcentual de población por tipo de tumor maligno según sexo y grandes grupos de edad,2007.                      | 13 |
| <b>Fig. 3.</b> Origen y desarrollo de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales   | 17 |
| <b>Fig. 4.</b> Evolución de una célula madre sanguínea   | 18 |
| <b>Fig. 5.</b> Cromosoma filadelfia  | 41 |
| <b>Fig. 6.</b> Representación de la interacción de SYBR Green con el DNA de doble cadena   | 56 |
| <b>Fig. 7.</b> Diseño experimental   | 57 |
| <b>Fig. 8.</b> Northern electrónico de ESTs de <i>KCNH4</i> en tejidos y órganos sanos   | 58 |
| <b>Fig. 9.</b> Northern electrónico de ESTs de <i>KCNH4</i> en diferentes tipos de cáncer  | 59 |
| <b>Fig. 10.</b> Detección de $\beta$ -actina humana y <i>KCNH4</i> en las muestras de Leucemia mediante PCR en tiempo real                   | 61 |
| <b>Fig. 11.</b> Proporción de sobreexpresión de <i>KCNH4</i> en Leucemias  | 61 |
| <b>Fig. 12.</b> Gráfica con los niveles de sobreexpresión en PCR en tiempo real de <i>KCNH4</i>  | 62 |
| <b>Fig. 13.</b> Distribución de las muestras con sobreexpresión de <i>KCNH4</i> por PCR en tiempo real de acuerdo al diagnóstico histológico | 63 |
| <b>Fig. 14.</b> Sobreexpresión de <i>KCNH4</i> en Síndrome mielodisplásico   | 64 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Fig. 15.</b> Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia mieloide crónica    | 64 |
| <b>Fig. 16.</b> Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia linfoblástica aguda | 65 |
| <b>Fig. 17.</b> Sobreexpresión de KCNH4 por PCT-TR en Leucemia mieloide aguda                  | 65 |
| <b>Fig. 18.</b> Sobreexpresión de KCNH4 por PCT-TR en Leucemia promielocítica aguda            | 66 |
| <b>Fig. 19.</b> Sobreexpresión de KCNH4 por PCT-TR en Leucemia linfocítica crónica             | 66 |

## ÍNDICE DE TABLAS

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo | 11 |
| <b>Tabla 2.</b> Mortalidad por tumores malignos en población menores de 15 años                           | 14 |
| <b>Tabla 3.</b> Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda  | 20 |
| <b>Tabla 4.</b> Leucemia linfoblástica aguda: características citogenéticas e inmunofenotipo              | 21 |
| <b>Tabla 5.</b> Clasificación de la leucemia mieloide aguda   | 23 |
| <b>Tabla 6.</b> Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias mieloides y genes implicados           | 24 |
| <b>Tabla 7.</b> Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias mieloides y genes implicados           | 28 |
| <b>Tabla 8.</b> Clasificación de la leucemia linfocítica crónica  | 29 |
| <b>Tabla 9.</b> Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemia linfocítica crónica y genes implicados  | 30 |
| <b>Tabla 10.</b> Clasificación FAB de los síndromes mielodisplásicos                                      | 32 |

**Tabla 11.** Alteraciones cromosómicas recurrentes en Síndrome mielodisplásico y genes implicados 32

**Tabla 12.** Muestra clínicas de diferentes tipos de leucemia 60

**Tabla 13.** Frecuencia de la sobreexpresión de KCNH4 (KCNH4+) 60

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**RNA** Ácido ribonucleico

**mRNA** Ácido ribonucleico mensajero

**RNV** Recién Nacidos Vivos

**LMA** Leucemia Mieloide Aguda

**LLA** Leucemia Linfoblástica Aguda

**LLC** Leucemia Linfoblástica Crónica

**LMC** Leucemia Mieloide Crónica

**LPA** Leucemia Promielocítica Aguda

**SM** Síndrome Mielodisplásico

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**SCNC** Carcinoma de Pulmón de células pequeñas

**Ct** Threshold cycle

**RSC** Recuento Sanguíneo Completo

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**FAB** Sistema Franco-Americano-Británico

**LA** Leucemias Agudas

## RESUMEN

---

Hasta el momento, existen pocos marcadores moleculares de cáncer aplicados en la práctica clínica, por lo cual hay una imperiosa necesidad para encontrar biomarcadores de este tipo. Se ha reportado que algunos canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje juegan un papel importante en diferentes tipos de neoplasias, en las cuales se han encontrado sobreexpresados. La sobreexpresión de algunos de estos canales (EAG, HERG1, HERG1B) han ayudado a establecerlos como marcadores diagnósticos y pronósticos de algunas neoplasias como cáncer cervicouterino, leucemias, carcinoma gástrico y carcinoma de células escamosas de esófago. Incluso, en algunos de éstos, se han determinado como marcadores pronósticos relacionándose directamente con la sobrevida de los pacientes.

Por lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen que codifica al canal iónico *KCNH4* utilizando la técnica de PCR cuantitativa en biopsias de Leucemia de pacientes de nacionalidad mexicana. Los resultados obtenidos fueron: en todas las muestras estudiadas (40) de diferentes tipos de Leucemia se amplificó el gen de control interno de la reacción de la RTPCR, *β-actina* humana. De éstas, en 32 muestras se observó sobreexpresión del gen *KCNH4* (80%), mientras que 11 muestras fueron negativas (20%). De las 32 muestras con amplificación de *KCNH4* por RTPCR cuantitativa, 11 muestras (35%) tuvieron el diagnóstico histológico de Síndrome mielodisplásico (SMD), 9 (28%) de Leucemia mieloide crónica (LMC), 4 (13%) de Leucemia linfoblástica aguda (LLA), 3 (9%) de Leucemia mieloide aguda (LMA), 3 (9%) de Leucemia promielocítica aguda y 2 (6%) de Leucemia linfoblástica crónica (LLC). Este trabajo es innovador ya que constituye el primer estudio de la expresión del gen *KCNH4* y su posible relación en cáncer, en particular en Leucemias. Es indudable que la expresión de *KCNH4* está aumentada en este tipo de neoplasias, por lo que es importante estudiar más sobre el papel de este gen en la carcinogénesis y determinar de qué manera participa en este proceso.

## ABSTRACT

---

There are only a few molecular markers of cancer which can be applied to the clinical practice so far. Therefore, there is an urgent need to find such biomarkers. Some voltage-dependent K<sup>+</sup> channels have been found overexpressed in different types of neoplasia and have been reported to play an important role in cancer. The overexpression of some of these channels (EAG, HERG1 and HERG1B) has helped to establish them as diagnostic and prognostic markers in some malignancies such as cervical cancer, leukemia, gastric carcinoma and esophagus squamous cell carcinoma. In fact, some of them have been described as prognostic markers, directly related to the survival of patients. Hence, the analysis of the expression of the gene encoding the ion channel KCNH4, was carried out in biopsies from Mexican leukemia patients in this work by using quantitative PCR. The results are: we amplified the internal control gene human  $\beta$  – actin in all samples studied (40) of different types of leukemia. From these, 32 samples showed an overexpression of the gene KCNH4 (80%), while 11 samples were negative (20%). From the 32 samples that amplified KCNH4 by quantitative RTPCR, 11 samples (35%) were diagnosed histologically as myelodysplastic syndrome (MDS), 9 (28%) as chronic myeloid leukemia (CML), 4 (13%) as acute lymphoblastic leukemia (ALL), 3 (9%) as acute myeloid leukemia (AML), 3 (9%) as acute promyelocytic leukemia and 2 (6%) as chronic lymphocytic leukemia (CLL). This work is innovative because it is the first study concerning the gene expression of KCNH4 and its possible relationship to cancer, particularly leukemia. Clearly, the expression of KCNH4 is increased in this neoplasia, so it is important to study more about the role of this gene in carcinogenesis and to determine how it is involved in this process.

Keys words: Leukemia, KCNH4 channel, molecular diagnosis.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 DEFINICIÓN

El cáncer se desarrolla por una proliferación celular descontrolada con una expresión morfológica muy diversa con respecto a sus precursores. La semejanza estructural de la célula tumoral con su posible origen, permite establecer diagnósticos específicos en cuanto a la fuente y conducta potencial de la neoplasia. Esta proliferación incontrolada, forma un conglomerado anormal de células, la cual persiste después de haber cesado el estímulo inductor<sup>1</sup>.

Las leucemias son proliferaciones clonales de células inmaduras del sistema hematopoyético que se caracterizan por un bloqueo en la diferenciación celular o una diferenciación aberrante. Las células de leucemia rápidamente se acumulan en la médula ósea reemplazando la mayoría de las células hematopoyéticas normales, impidiendo la producción de las células sanguíneas periféricas, llevando a manifestaciones clínicas de anemia, trombocitopenia e infecciones. Simultáneamente, puede ocurrir invasión del sistema monocítico-macrófago, llevando a la expresión clínica de hepato-esplenomegalia o linfadenopatía generalizada, cuando el compromiso es ganglionar<sup>2</sup>.

La etimología literal es “sangre blanca”, la palabra esta formada por 2 elementos griegos: leuc una variante de leuco (λευκός) = blanco y emia (αἷμα) = sangre<sup>3</sup>.



## 1.2 HISTORIA DE LAS LEUCEMIAS

El primer médico en describir la leucemia fue Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau en 1827, quien observó un paciente de 63 años con fiebre, debilidad y crecimiento abdominal acentuado. Encontró en la autopsia hepatoesplenomegalia (el bazo pesó 4 kg.) y la sangre era espesa<sup>4</sup>. Por otra parte, Barth y Donné estudiaron en 1839 por primera vez las células leucémicas microscópicamente<sup>5,6</sup>.

Los estudios iniciales de pacientes vivos con leucemia se hicieron en 1845 por tres investigadores de la época: Virchow<sup>7</sup> en Alemania, el cual llamó a la enfermedad *sangre blanca* y fue el primero en proponer que el problema no era infeccioso sino una patología diferente que afectaba a ciertos órganos, Bennett<sup>8</sup> y Craigie<sup>9</sup> en Escocia, los cuales reconocieron también la entidad como un problema propio de los glóbulos blancos. Virchow<sup>10</sup>, introdujo dos años después el término *leucemia*, el cual ha perdurado hasta nuestros días, describiendo a la vez dos tipos de leucemia: la *esplénica*, asociada con esplenomegalia y la *linfática*, donde se presentaba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos. Años después, en 1857, Friedreich<sup>11</sup> describió por primera vez una modalidad de leucemia que llamó *aguda*, y Neumann estableció la existencia de la *leucemia mielógena*<sup>12</sup>.

## 1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEUCEMIAS EN MÉXICO

El cáncer puede afectar a personas de todas las edades, pero el riesgo aumenta conforme se va incrementando la edad. El cáncer causa cerca del 13% de todas las muertes en el mundo. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, 7.6 millones de personas murieron de cáncer en el mundo durante 2007<sup>13</sup>.

En México, de 1998 a 2007 se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse. Durante 2007, se registraron 514,420 defunciones, 55.4% de hombres y 44.6% de mujeres; de las cuales, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con

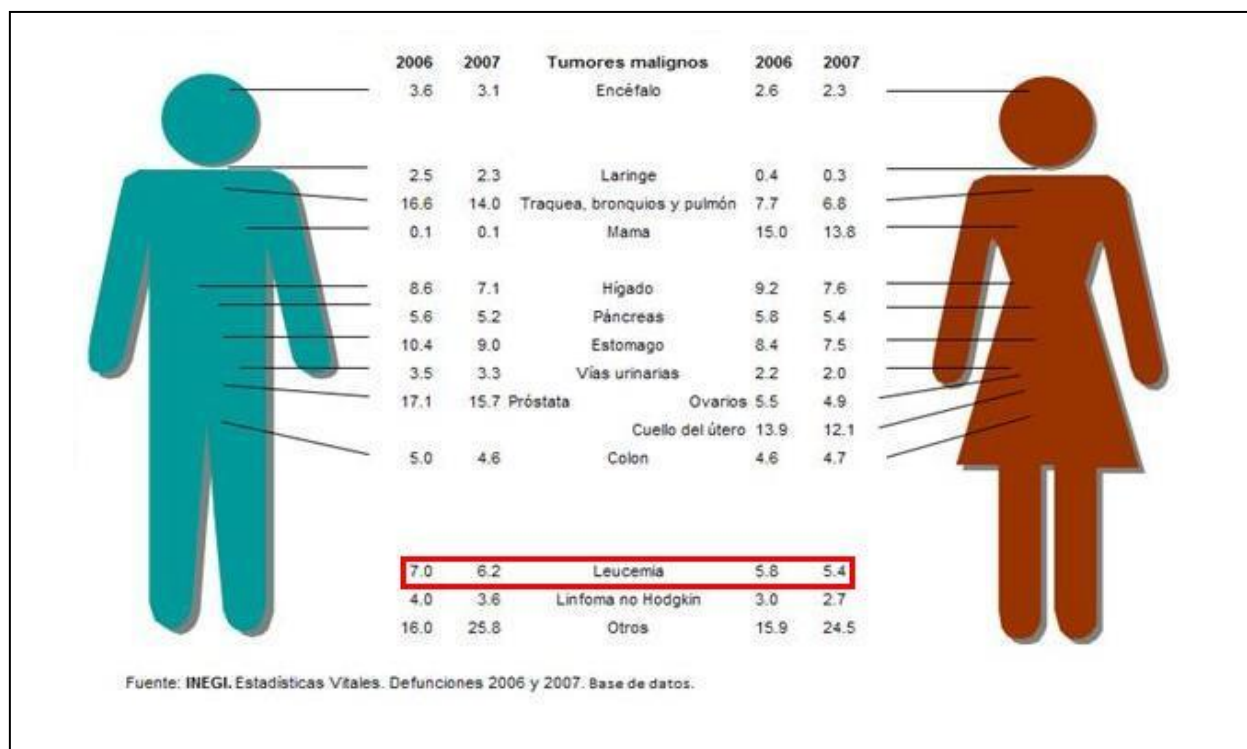
68,815 casos (13.4%), sólo por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas. Para 2007, las leucemias ocuparon la segunda causa general de egreso hospitalario, con 13 de cada 100 egresos. En el periodo 2004-2007, en los varones, los egresos hospitalarios por leucemias son la primera causa, mostrando un incremento de 16.9% a 19.4%, seguidas por cáncer de próstata (8%) y cáncer de tráquea, bronquios y pulmón (6%). En mujeres, las leucemias ocupan el tercer lugar en egresos (12%), después del cáncer de mama (20%) y cáncer en el cuello del útero (13%) (Tabla 1).

**Tabla. 1. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo, 2006. Modificado de INEGI 2008<sup>14</sup>.**

| Tipo de tumor maligno               | Hombres      | Mujeres      |
|-------------------------------------|--------------|--------------|
| <b>Total</b>                        | <b>100.0</b> | <b>100.0</b> |
| Del estómago                        | 4.0          | 2.7          |
| Del colon                           | 3.7          | 2.8          |
| Del rectosigmoides, recto y ano     | 2.4          | 1.6          |
| Tráquea, bronquios y pulmón         | 6.0          | 2.6          |
| Mama                                | 0.4          | 19.8         |
| Cuello del útero                    | 0.0          | 13.1         |
| <b>Leucemias</b>                    | <b>18.8</b>  | <b>11.9</b>  |
| Labio, cavidad bucal y faringe      | 2.3          | 1.2          |
| Esófago                             | 1.5          | 0.4          |
| Hígado                              | 2.4          | 1.9          |
| Páncreas                            | 1.9          | 1.5          |
| Melanoma y otros tumores de la piel | 0.8          | 0.8          |
| Cuerpo del útero                    | 0.0          | 2.8          |
| Ovario                              | 0.0          | 7.3          |
| Próstata                            | 7.8          | 0.0          |
| Vejiga                              | 2.9          | 0.9          |
| Otros                               | 45.1         | 28.7         |

Fuente: SSA, DGIS. Egresos Hospitalarios, 2006. Base de datos. Proceso INEGI.

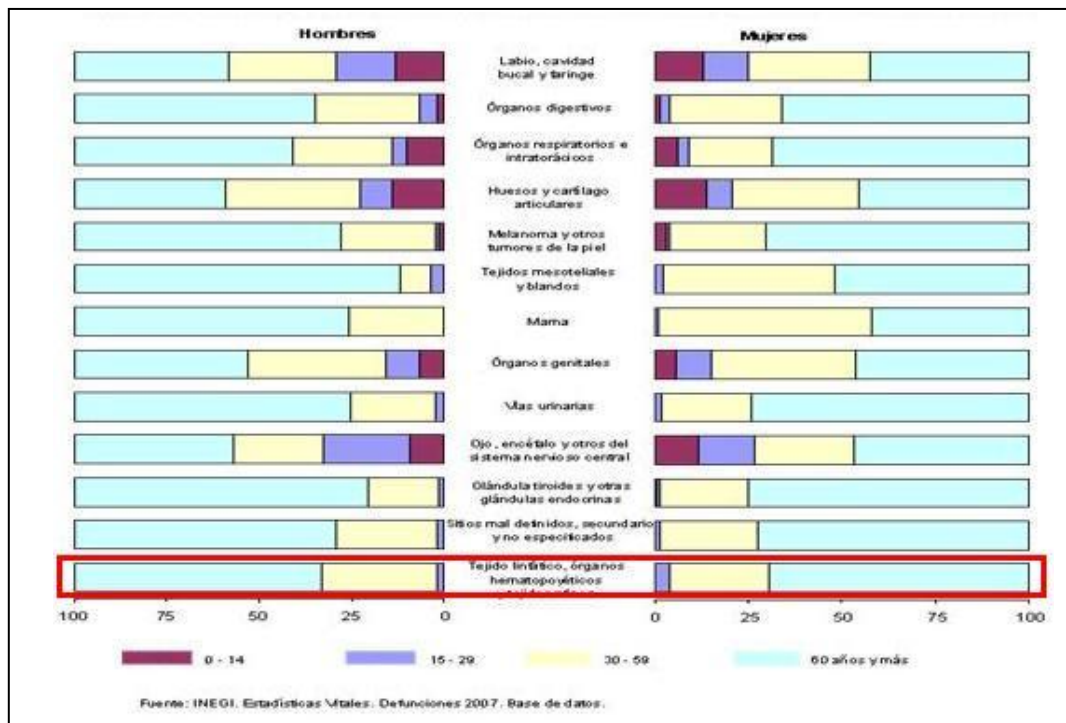
En su conjunto las leucemias, agudas y crónicas, constituyen el 6.2% en hombres, y 5.4% en mujeres de todos los tipos de cáncer (Fig. 1).



**Fig. 1. Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores malignos según sexo, 2006-2007. Modificado de INEGI, 2008<sup>14</sup>.**

En cuanto a la mortalidad por edades, en 2006, Entre la población de 15 a 24 años, los tumores malignos ocupan el tercer lugar como causa de muerte (8.6% de los fallecimientos), la leucemia ocasiona 38.1% de los decesos por cáncer. En los varones, significan la cuarta causa de fallecimientos con 7.2% de muertes, y en las mujeres la segunda con 12.0 por ciento. La tercera causa de muerte en el grupo de 25 a 34 años es debida a los tumores malignos (8.6% de los decesos). En los varones, representan la quinta causa con 5.5% de las muertes; la leucemia ocasionando 18.7% de los decesos de hombres de esta edad. En las mujeres, los tumores malignos ocupan el primer lugar, 17.2% de los fallecimientos son

causados por éstos, principalmente por el de mama y el de cuello del útero (32.6%) (Fig. 2).



**Fig. 2. Distribución porcentual de población por tipo de tumor maligno según sexo y grandes grupos de edad, 2007. Modificado de INEGI 2008<sup>14</sup>.**

Entre las personas de 35 a 44 años, los tumores malignos son la segunda causa de muerte (13.8% de los fallecimientos). En los varones, la leucemia, el tumor maligno de estomago, y el de tráquea, bronquios y pulmón son motivo en conjunto de 33.5% de las muertes por cáncer, y en las mujeres concentran 16.0% de los decesos, los de mama y el de cuello del útero ocasionaron 46.7% de los fallecimientos por cáncer en esas últimas. Entre las personas de 35 a 44 años, los tumores malignos son la segunda causa de muerte (13.8% de los fallecimientos). En los varones, la leucemia, el tumor maligno de estomago, y el de tráquea, bronquios y pulmón son motivo en conjunto de 33.5% de las muertes por cáncer, y en las mujeres concentran 16.0% de los decesos, los de mama y el de cuello del útero ocasionaron 46.7% de los fallecimientos por cáncer en esas últimas (Fig. 2).

## 1.4 LEUCEMIA EN NIÑOS

En nuestro país, el cáncer en niños pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2000<sup>15</sup>. En 1995, representaron 11.4% del total de las defunciones que ascendieron a 48,222, con una tasa de 52.6 por 100,000 habitantes (Tabla 2).

**Tabla 2 . Mortalidad por tumores malignos en población menores de 15 años. Tasa por 100,000. Fuente: Secretaria de salud. Dirección general de estadística e informática. Mortalidad 1995<sup>16</sup>.**

| Grupo de edad | Orden de Importancia | No. de defunciones | Tasa | Defunciones % + |
|---------------|----------------------|--------------------|------|-----------------|
| Infantil      | 17                   | 81                 | 2.9* | 0.2             |
| Preescolar    | 6                    | 467                | 5.3  | 0.9             |
| Escolar       | 2                    | 930                | 4.3  | 1.9             |
| General       | 2                    | 48,222             | 52.6 | 100.0           |

\* Por 100,000 RNV;  
+ con respecto al total de muertes por tumores.

Los datos comparativos por grupos de edad, del tipo de neoplasias registradas entre los años de 1980 y 1991, permiten apreciar que sólo la leucemia y los tumores del encéfalo, que ocuparon respectivamente el primero y segundo lugar, fueron constantes, tanto en ambos años como en los grupos de menores de un año, de preescolares y de escolares<sup>16</sup>.

Para 2006, se reportaron 73 decesos de mortalidad por tumores malignos en menores de un año, lo que fue una de las 14 principales causas de decesos de este grupo demográfico. En la población de 1 a 4 años de edad, los tumores malignos son la cuarta causa de muerte (7.7% del total), representando la leucemia 48.5% de los decesos<sup>14</sup>.

En el grupo de 5 a 14 años, los tumores malignos representan la segunda causa de mortalidad con 16.3% de los decesos; la leucemia provoca poco más de la mitad (52.2%) de los fallecimientos ocurridos por cáncer en el grupo<sup>14</sup>.

Asimismo, las leucemias agudas son de los tipos de cáncer más frecuentes en la infancia. En 1999, se describió que este tipo de leucemias representan alrededor del 40% de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre 30 y 34%<sup>17,18</sup>. En un estudio de 1998-2002, se determinó que en México la mortalidad por leucemias en menores de 20 años representó el 51.1% de las muertes por neoplasias malignas. La razón hombre/mujer fue de 1.3. Los grupos de edad más afectados fueron los de 5-9 y 10-14 años, ambas con tasa media de mortalidad anual de 27.7 por 106 habitantes, por lo cual se considera que representa un problema de salud pública nacional, por lo que el diagnóstico temprano y tratamiento específico deben ser de alta prioridad<sup>19</sup>. Actualmente se reconoce que en diferentes partes del mundo la frecuencia de las leucemias agudas se ha incrementado<sup>20,21</sup>.

De 1982 a 1991 en México se observó aumento importante en la incidencia de las leucemias agudas linfoblásticas<sup>16,22</sup> en 1982 se reportó una tasa de incidencia de 7.75 por millón de niños menores de 15 años y para 1991 se alcanzó 22.19 por millón. Entre 1993 y 1994, en el Instituto Mexicano del Seguro Social se encontró una frecuencia de 34 por millón<sup>23</sup>; entre 1996 y 1998 fue de 60.3<sup>24</sup>.

Datos que abarcan el periodo de 1996 a 2000 muestran una tasa de 63.7, una de las más altas reportadas en el mundo<sup>25</sup>.

El costo de la atención de cada niño con cáncer en las instituciones de salud representa alrededor de 620 mil dólares anuales<sup>26</sup>. Además, la tasa de mortalidad por cáncer en los países subdesarrollados es el doble que los países desarrollados<sup>27</sup>.

En una nación con pocos recursos para la atención médica y que no puede garantizar una sobrevivencia elevada en enfermedades como el cáncer, se considera

una prioridad instrumentar medidas preventivas específicas que puedan disminuir los casos de esta enfermedad<sup>28</sup>.

## **1.5 DESARROLLO NORMAL DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS**

Los elementos formes sanguíneos aparecen primero en la tercera semana del desarrollo embrionario en el saco vitelino, pero estas células proceden de una población de células madres primitivas limitadas a la producción de células mieloides. Estudios actuales sugieren su procedencia del mesodermo de la región intraembrionaria aorta/gónada/mesonefros, pero también existen pruebas de un origen dentro de un pequeño subconjunto de células madre derivadas del saco vitelino. Sin importar su origen, las células madre derivan hacia el hígado, órgano que representa el principal productor de células sanguíneas durante la embriogénesis (eritropoyesis fetal) y hasta poco antes del nacimiento. A partir del cuarto mes del desarrollo, las células madre migran hacia la médula ósea para comenzar la hematopoyesis en ese sitio<sup>29,30</sup>. En el hígado disminuye la hematopoyesis al momento del nacimiento y en los lactantes sólo quedan escasos focos, que se convierten en inactivos. A los 18 años sólo las vértebras, las costillas, el esternón, el cráneo, la pelvis y las regiones epifisiarias del húmero y el fémur, conservan médula ósea roja; la médula restante se convierte en amarilla, grasa, e inactiva<sup>31,32</sup>.

## **1.6 ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN**

Los hematíes, granulocitos, monocitos, plaquetas y linfocitos tienen un origen común desde células madre hematopoyéticas pluripotenciales que ocupan la cima de una jerarquía completa de progenitores. La célula madre pluripotencial da origen a dos tipos de progenitores multipotenciales: la célula madre linfóide común y la célula madre mielóide común. A su vez la célula madre linfóide común da origen a dos tipos de progenitores multipotenciales: la célula madre linfóide común y la célula madre mielóide común. A su vez la célula madre linfóide común da lugar a precursores de las células T, B y Natural Killer (células asesinas

naturales). De la célula madre mieloide común proceden al menos tres tipos de células madre comprometidas capaces de diferenciarse a lo largo de las vías eritroide/megacariocítica, eosinofila, y granulocítica/macrofágica<sup>33</sup> (Fig.3).

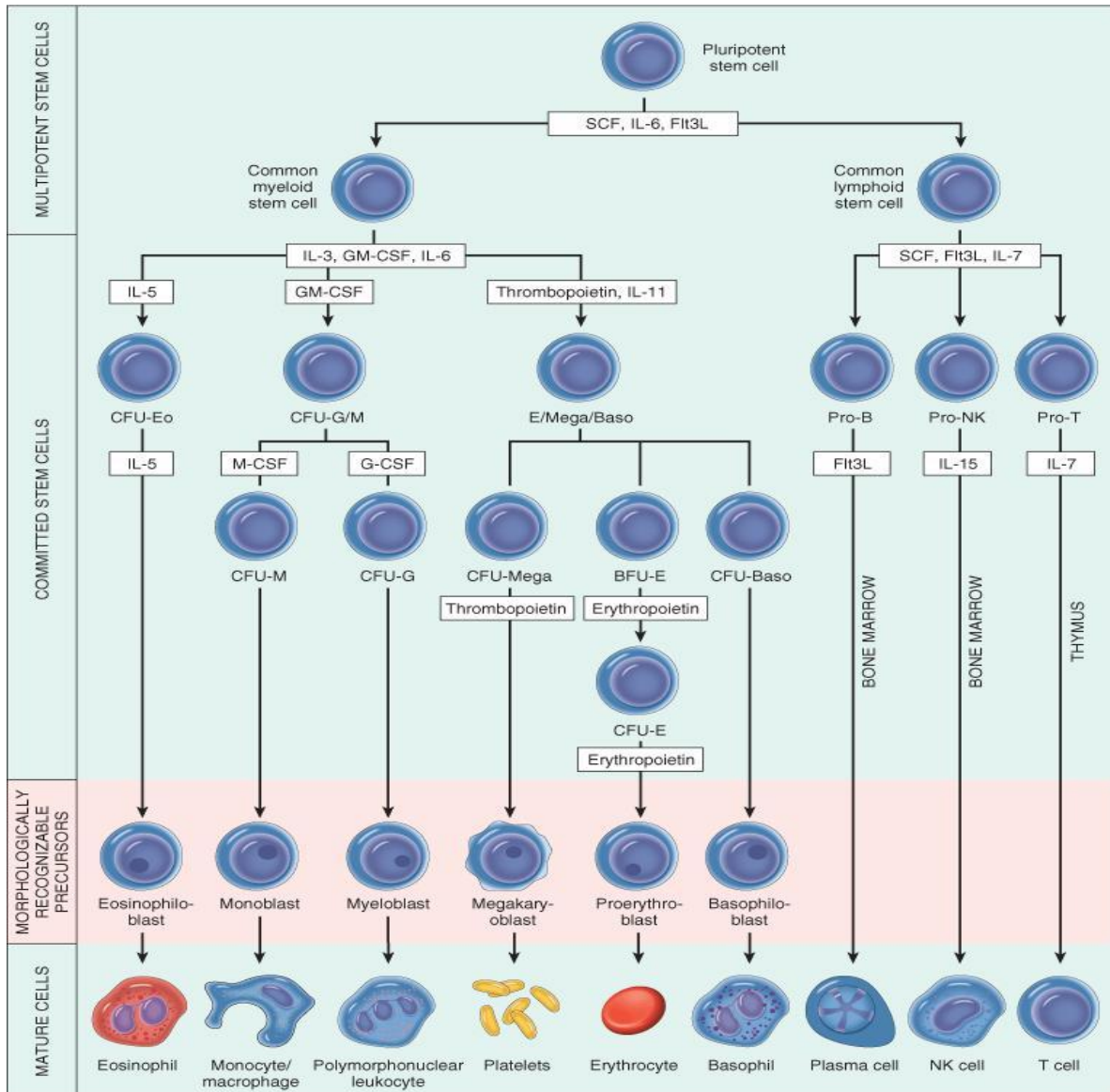


Fig.3. Origen y desarrollo de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales<sup>13</sup>.

## 1.7 CLASIFICACIÓN

Este sistema de clasificación de acuerdo a la OMS<sup>34</sup> proporciona una estrategia para agrupar a los pacientes según la población leucocitaria afectada.



Las leucemias se clasifican por 2 factores: que tan rápido evoluciona la enfermedad y que células afecta. Esta enfermedad se clasifica como aguda o crónica, refiriéndose a la velocidad de desarrollo y progreso. Los tipos son divididos de acuerdo a la población leucocitaria afectada, células linfoides o células mieloides.

La célula madre mieloide se convierte en uno de tres tipos de células sanguíneas maduras: como son glóbulos rojos, plaquetas y granulocitos (Fig.4).

La célula madre linfoide se convierte en otra célula llamada linfoblasto y luego en uno de tres tipos de linfocitos (linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos)<sup>35,36</sup> (Fig.4).

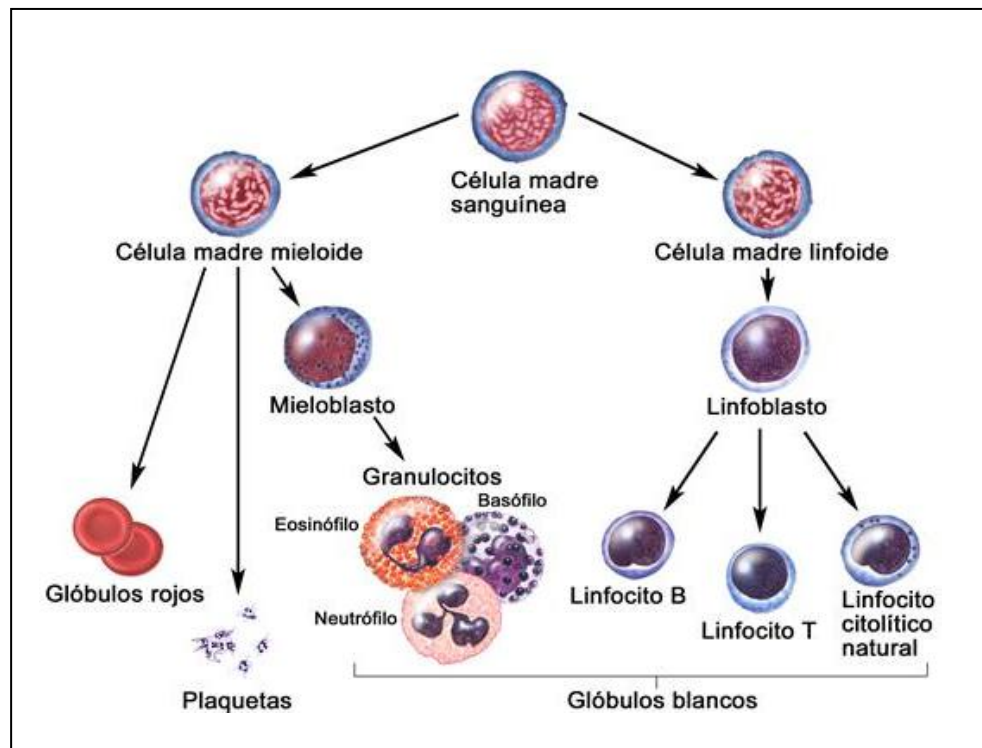


Fig.4. Evolución de una célula madre sanguínea<sup>35</sup>.

Las leucemias se pueden clasificar en 4 grandes grupos:

- *Leucemia mieloide aguda (LMA)*. Ocurre en niños y adultos.
- *Leucemia mieloide crónica (LMC)*. Se presenta más en adultos, adolescentes y ancianos.

- *Leucemia linfoblástica aguda (LLA)*. Este tipo se ve con más frecuencia en niños pero también puede presentarse en adultos mayores de 65 años.
- *Leucemia linfoblástica crónica (LLC)*. Se ha observado más a partir de los 65 años, puede afectar a adultos jóvenes y nunca se ha visto en niños<sup>37</sup>.

### 1.7.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL

La Leucemia linfocítica aguda (LLA) es una proliferación neoplásica clónica de células linfocíticas inmaduras del sistema hematopoyético en la cual la médula ósea produce demasiados linfocitos. Si no es tratada empeora muy rápido, es el cáncer más común en los niños entre 2 y 15 años y representa cerca de 85% de los casos<sup>22</sup>.

Se ha observado un aumento importante en la incidencia de las leucemias agudas linfoblásticas en nuestro país: en 1982 se reportó una tasa de incidencia de 7.75 por millón de niños menores de 15 años, de 22.19 por millón para 1991<sup>22</sup>, de 34 por millón entre 1993 y 1994, de 60.3 entre 1996 y 1998<sup>16</sup>, y en 2006, se determinó la tasa de incidencia (TI) de la LLA en niños mexicanos siendo de 46 casos por millón con una TI mayor en el grupo de 0-4 años de 61.7 por millón<sup>38</sup>. Es una enfermedad básicamente infantil, con una edad media de diagnóstico de 10 años; la LLA puede presentarse a cualquier edad en los adultos y tiene un pequeño aumento de incidencia en personas de más de 70 años. Las leucemias linfocíticas agudas son principalmente enfermedades de la infancia, con incidencia mayor entre los 2 a 5 años de edad, en quienes representa aproximadamente el 80% de las leucemias. La LLA en adultos mayores de 15 años es aproximadamente de 1250 casos nuevos anualmente. Tiene una distribución bimodal, con un segundo aumento en la incidencia alrededor de los 50 años y un aumento pequeño, pero sostenido con la edad más avanzada.

En el caso de la LLA, los linfocitos no pueden combatir muy bien las infecciones. Además, en la medida que aumenta la cantidad de linfocitos en la sangre y la

médula ósea, hay menos lugar para los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas sanas. Esto puede producir infecciones, anemia y sangrados fáciles<sup>39</sup>.

Las leucemias se pueden clasificar de acuerdo al grupo de riesgo como se describe a continuación:

- *Riesgo estándar (bajo)*. Incluye a los niños de 1 a 9 años de edad con una cantidad de glóbulos blancos inferior a 50,000/mL en el momento del diagnóstico.
- *Riesgo alto*. Incluye a los niños menores de un año de edad o mayores de 9 años de edad y a los niños con una cantidad de glóbulos blancos de 50.000 mL o más en el momento del diagnóstico. Para planificar el tratamiento, es importante conocer el grupo de riesgo.

También se pueden clasificar las leucemias agudas en base al sistema Franco-Americano-Británico (FAB). Esta clasificación se utiliza para señalar subtipos morfológicos, para realizar estudios clínicos y para determinar el pronóstico. La clasificación FAB de las LA se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3. Clasificación de la Leucemia linfoblástica aguda según el Grupo Franco-Americano-Británico.** LLA = leucemia linfocítica aguda. Modificada de Sala ML, 2002<sup>40</sup>.

|     | <b>CATEGORÍA</b>  | <b>COMENTARIOS</b>                                   |
|-----|-------------------|--|
| LLA |                   |  |
| L1  | LLA infantil      | Blastos son células pequeñas con citoplasma pequeño  |
| L2  | LLA adulto        | Blastos son células grandes con citoplasma medio     |
| L3  | B-células maduras | Blastos son células redondas con citoplasma basófilo |

El pronóstico de las LLA es diferente según nos refiramos a niños o adultos. La quimioterapia actual proporciona una curación de casi el 80% de niños, mientras que los adultos se curan en un 25%. El análisis citogenético de los blastos linfoides da anomalías en un 60-75% de pacientes con LLA. Estas alteraciones cromosómicas se utilizan para investigar la patogénesis de la enfermedad y dar información respecto al pronóstico. En adultos, la diferencia en supervivencia resulta a partir de la presencia de citogenética de riesgo bajo. Las anomalías citogenéticas asociadas con un pobre pronóstico incluyen LLA con t(9;22) (cromosoma Filadelfia), hecho que se observa en un 30% de pacientes L2, t(4;11) y t(8;14) diagnosticado como L3 (Tabla 4). Otros indicadores de pobre pronóstico para la LLA incluyen un recuento de leucocitos superior a 30.000/mm<sup>3</sup> en el momento del diagnóstico, edad superior a 35 años, inmunofenotipo de células B maduras y un largo periodo de tiempo para alcanzar la remisión completa.

**Tabla 4. Leucemia linfoblástica aguda: características citogenéticas e inmunofenotipo. Modificada de Calasanz MJ, 2001<sup>41</sup>. LAL= Leucemia Aguda Linfoide.**

|                                | Alteración citogenética | Genes implicados         |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Leucemia Linfoide Aguda</b> |                         |                          |
| LAL preB                       | t(1;19)(q23;p13)        | <i>PBX1-E2A</i>          |
|                                | t(5;14)(q31;q32)        | <i>IL3IGH</i>            |
|                                | t(12;21)(p13;q22)       | <i>TEL-AML1</i>          |
| LAL B(Stg+)                    | t(8;14)(q24;q32)        | <i>MYCIGH</i>            |
|                                | t(2;8)(p12;q24)         | <i>IGK-MYC</i>           |
|                                | t(8;22)(q24;q11)        | <i>MYC-IGL</i>           |
| LAL B o B-mielotide            | t(9;22)(q34;q11)        | <i>ABL-BCR</i>           |
|                                | t(4;11)(q21;q23)        | <i>AF4-MLL</i>           |
| LAL T                          | t(1;14)(p32;q11)        | <i>TALI/SCL-TCRA</i>     |
|                                | t(1;7)(p34;q34)         | <i>LCK-TCRB</i>          |
|                                | t(8;14)(q24;q11)        | <i>MYC-TCRA</i>          |
|                                | t(7;9)(q35;q34)         | <i>TCRB-TAL2</i>         |
|                                | t(7;9)(q34;q34.3)       | <i>TCRB-TANI</i>         |
|                                | t(7;10)(q35;q24)        | <i>TCRB-HOX11</i>        |
|                                | t(10;14)(c24;q11)       | <i>HOX11-TCRA</i>        |
|                                | t(11;14)(p13;q11)       | <i>RBTN2/TTG2-TCRA/D</i> |
|                                | t(7;11)(q35;p13)        | <i>TCRB-RBTN2/TTG2</i>   |
|                                | t(11;14)(p15;q11)       | <i>RBTN1/TTG1-TCRA/D</i> |
|                                | del(9p),t(9p)           |                          |

### 1.7.2 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

También se llama leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia no linfocítica aguda y leucemia granulocítica aguda.

La LMA, es una neoplasia de células mieloides que se produce por transformación y proliferación clonal de progenitores inmaduros que desplazan e inhiben el crecimiento de la hematopoyesis normal. En la LMA, las células madre mieloides generalmente se transforman en un tipo de glóbulos blancos inmaduros llamados mieloblastos (o blastocitos mieloides). Los mieloblastos en la LMA son anormales y no se convierten en leucocitos sanos. En la LMA, a veces hay demasiadas células madre que se desarrollan y convierten en eritrocitos o plaquetas anormales. Estos glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas anormales también se llaman células o blastocitos leucémicos. Las células leucémicas se acumulan en la médula ósea y la sangre y dejan menos lugar para los glóbulos blancos, eritrocitos y plaquetas sanos. Cuando ocurre esto, se puede presentar infección, anemia o sangrado fácil. Las células leucémicas pueden propagarse fuera de la sangre a otras partes del cuerpo, como el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), la piel y las encías<sup>39,42</sup>.

Es el tipo de cáncer más común de leucemia aguda en adultos. Esta patología se presenta en alrededor de 2,5 pacientes, por 100.000 habitantes y año en Estados Unidos. La LMA afecta a personas mayores, con una edad media de diagnóstico de 65 años<sup>40</sup>.

La LMA es una enfermedad maligna con prevalencia e incidencia menores a las de otras neoplasias, sin embargo, tal vez es la más estudiada desde el punto de vista citogenético. Puede presentarse como una enfermedad primaria o de Novo, o bien puede ser la transformación de una mielodisplasia como consecuencia de tratamientos para otras enfermedades neoplásicas<sup>40</sup>.

Sin tratamiento en una enfermedad fatal, con tiempos de supervivencia media menor a 3 meses. El análisis global a largo plazo de la enfermedad demuestra una duración media de la remisión de 9 a 15 meses y una supervivencia global de 12-16 % a los 7-8 años<sup>43</sup>.

Las leucemias agudas también se pueden clasificar en base al sistema Franco-Americano-Británico (FAB). Esta clasificación se utiliza para señalar subtipos morfológicos, para realizar estudios clínicos y para determinar el pronóstico. La clasificación FAB de las LA se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5. Clasificación de la Leucemia mieloide aguda según el Grupo Franco-Americano-Británico.** LMA = Leucemia mieloide aguda.

| CATEGORÍA                                | COMENTARIOS                                   |
|--|---|
| LMA no diferenciada                      | Pobre pronóstico                              |
| LMA con diferenciación mínima            | Bastones de Auer en blastos                   |
| LMA con maduración                       | Pronóstico favorable en jóvenes               |
| Leucemia promielocítica                  | Blastos granulados; coagulopatías             |
| Leucemia mielomonocítica                 | Diferenciación mieloide/monocítica            |
| Leucemia mielomonocítica con eosinofilia | Relativo buen pronóstico                      |
| Leucemia monocítica, poco diferenciada   | Enfermedad extramedular                       |
| Leucemia monocítica, bien diferenciada   | Igual que la M5a                              |
| Leucemia eritroide                       | Rara, pronóstico pobre                        |
| Leucemia megacariocítica                 | Rara, médula ósea fibrótica; pronóstico pobre |

El origen de la LMA es en parte desconocida, pero hay factores identificados como predisponentes. Estos factores son haber estado expuesto de forma accidental a radiaciones, explosiones atómicas, la exposición a benceno o derivados, los fumadores de cigarrillos, algunas etiologías víricas, la herencia y algunos fármacos

(fenilbutazona, cloranfenicol, hidroxiaurea, etopósido y agentes alquilantes) se han asociado a leucemogénesis. En un 65% de las leucemias agudas (LA) se han identificado inversiones o translocaciones cromosómicas adquiridas. Estas reorganizaciones estructurales afectan la expresión genética y alteran el funcionamiento normal de la proliferación celular, diferenciación y supervivencia<sup>40</sup> (Tabla 6).

**Tabla 6. Alteraciones cromosómicas recurrentes en Leucemias mieloides y genes implicados. Modificada de Calasanz MJ, 2001<sup>41</sup>.** LANL= Leucemia no linfocítica aguda = Leucemia mielocítica aguda.

|  | Alteración citogenética       | Genes Implicados  |
|--|-------------------------------|-------------------|
| <b>Leucemia Mielocítica (No Linfocítica) Aguda</b> |                               |                   |
| LANL-M2  | t(8;21)(q22;q22)              | <i>ETO-AML1</i>   |
| LANL-M3  | t(15;17)(q22;q11-12)          | <i>PML-RARA</i>   |
| LANL-M4Eo  | inv(16)(p13q22) ó t(16;16)    | <i>MYH11-CBFB</i> |
| LANL-M5  | t(9;11)(p22;q23)              | <i>AF10-MLL</i>   |
| LANL   | t(6;9)(p23;q34)               | <i>DEK-CAN</i>    |
|  | t(3;3)(q21;q26)               | <i>EVII</i>       |
|  | ó inv(3)(q21q26)              |                   |
|  | +8,-7,-5,del(5q),del(20q),12p |                   |
| LANL-secundaria                                    | -7,del(7q),-5,del(5q)         |                   |
|  | t(11q23)                      | <i>MLL</i>        |

### 1.7.3 LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

La **leucemia promielocítica aguda** (LPA) es un subtipo de LMA (Tabla 4), que corresponde a la variedad M3, según la clasificación FAB (Grupo Franco-americano-británico) (Tabla 5), es uno de los subtipos más comunes de las leucemias mieloides agudas y constituye 10 a 15% de los casos en adultos jóvenes. Por lo general, la LPA se presenta en adultos de mediana edad<sup>44</sup>. La LPA está caracterizada por la translocación recíproca de los cromosomas 15 y 17: t(15;17)(q22;q11-21). Como resultado de esta translocación, en el cromosoma 15 se interrumpe el gen PML, previamente desconocido, y en el cromosoma 17 se

interrumpe el gen de la cadena alfa ( $\alpha$ ) del receptor del ácido retinoico (RAR $\alpha$ ). En consecuencia, se sintetizan las proteínas híbridas PML-RAR $\alpha$  y su recíproca RAR $\alpha$ -PML<sup>45</sup>. La primera se detecta en todos los casos de leucemia aguda promielocítica, mientras que la segunda sólo en 70 a 80% de éstos<sup>46</sup>. Este subtipo de leucemia aguda mieloblástica es probablemente la que tiene el mejor pronóstico, siempre que se siga el tratamiento adecuado con ácido todo trans-retinoico (ATRA) y antraciclina. En varios estudios se ha encontrado aumento relativo en la incidencia de leucemia aguda promielocítica en algunas poblaciones de Europa, África y América Latina: 17 a 58% en niños, hasta 22 a 37% en adultos, de leucemias mieloides agudas<sup>47,48</sup>. En México, la leucemia aguda promielocítica es más frecuente que en los países caucásicos<sup>49,50</sup>.

La LPA es una entidad distinta en su presentación clínica, respecto a las leucemias mieloides. La presencia de gránulos en los promieloblastos que contienen factores procoagulantes, como el tromboxano, produce una coagulopatía intravascular diseminada con episodios de sangrado y una alta mortalidad (10% en algunas series) hasta que se produce el diagnóstico. Los RAR1 actúan como una diana terapéutica. La tretinoína (ácido all-trans retinoico: ATRA), es un compuesto retinoide que se une al RAR1 para inducir la diferenciación de los promieloblastos en una forma madura que sufre una muerte programada (apoptosis). La LPA tiene un pronóstico más favorable que otros subtipos de LMA<sup>40</sup>.

#### **1.7.4 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)**

También llamada leucemia granulocítica crónica. Es un síndrome mieloproliferativo crónico caracterizado por una proliferación monoclonal mieloide que involucra a la “célula madre pluripotencial”, lo cual significa que además de una marcada leucocitosis en sangre periférica a base de neutrófilos, eosinófilos y basófilos, se



ven afectadas otras líneas celulares sanguíneas: megacariocitos, precursores de hematíes e, incluso, linfocitos B y T.

Fue la primera neoplasia en la que se descubrió una alteración cromosómica característica, el cromosoma Filadelfia (Ph)<sup>51</sup>. Este cromosoma, que aparece en un 85% de los pacientes, es producto de una translocación adquirida entre los cromosomas 9 y 22. El punto de ruptura en el cromosoma 22 está en la región bcr (breakpoint cluster region) y en el cromosoma 9 implica al protooncogén abl. El resultado es un oncogén bcr-abl. La LMC representa entre el 7% y el 15% de todas las leucemias, con una prevalencia de 1-1,5 casos/100.000 habitantes y año<sup>52</sup>. Es más frecuente en varones que en mujeres (2:1), y la mediana de edad en el momento del diagnóstico es de 45 años. No obstante, puede aparecer a cualquier edad, incluso en niños (3% de las leucemias infantiles). No se conoce la causa de la LMC, aunque la exposición a radiaciones ionizantes aumenta su incidencia. También se ha relacionado con ciertos HLA (CW3 y CW4). No se conocen factores hereditarios<sup>40</sup>.

La LMC es una neoplasia que afecta principalmente a la población adulta durante o después de la edad madura y con poca frecuencia se presenta en niños. Su incidencia a nivel mundial es de uno a dos casos por cada 100 mil individuos<sup>53</sup>. En México, la tasa de mortalidad por esta enfermedad es de tres por cada 100 mil habitantes (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica SSA, 1997). Se caracteriza por presentar leucocitosis y esplenomegalia. Esta neoplasia presenta diferentes fases:

- **Fase crónica:** es el inicio de la enfermedad y mediante técnicas citogenéticas convencionales aproximadamente 90% de los casos presenta el cromosoma Filadelfia (Ph), el cual es el resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, originándose diferentes rearrreglos moleculares como consecuencia de los diversos rompimientos en ambos cromosomas, de los cuales en 98% de los

casos dan origen al gen quimérico M-bcr/abl<sup>53</sup>. Mediante citogenética convencional, 10% de los casos no presentan el cromosoma Ph, sin embargo mediante técnicas moleculares aproximadamente 50% de ellos lo presentan<sup>54</sup>.

- **Fase acelerada:** con el progreso de la enfermedad el paciente puede o no pasar a una fase de aceleración mieloproliferativa, antes de pasar a una fase de crisis blástica.
- **Crisis blástica:** en esta fase de la enfermedad, 60 a 80% de los casos presentan otras alteraciones cromosómicas no al azar, extras al cromosoma Ph también llamadas alteraciones secundarias<sup>55</sup>. Dichas alteraciones cromosómicas se han clasificado en ruta mayor y ruta menor de acuerdo a su frecuencia<sup>56</sup>. En base a todos los casos reportados en la literatura mundial (más de 1600), se sugiere que las alteraciones cromosómicas de la ruta mayor incluyan aquellas cuya frecuencia sea mayor o igual a 5%, las cuales son: +8, +Ph, i(17q), +19, -Y, +21 y -7<sup>57,58</sup>. Dado lo anterior, el paciente con LMC puede presentar o estar precedido por un perfil citogenético asociado con una determinada fase de la enfermedad, lo cual ha dado paso a una investigación intensa a nivel molecular<sup>59</sup>. En datos recientes se ha encontrado que la presencia de dichas alteraciones secundarias varían significativamente de acuerdo al tratamiento recibido durante la etapa crónica<sup>58</sup>. En México son pocos los estudios citogenéticos que han sido realizados en pacientes con LMC, los cuales se han enfocado en determinar sólo la presencia del cromosoma Ph<sup>60,61</sup> (Tabla 7).

**Tabla 7. Alteraciones cromosómicas recurrentes en Leucemias mieloides y genes implicados. Modificada de Calasanz MJ, 2001<sup>41</sup>. LMC= Leucemia mieloide crónica.**

|                                  | Alteración citogenética                | Genes Implicados |
|----------------------------------|--|------------------|
| <b>Leucemia Mieloide Crónica</b> |  |                  |
| LMC                              | t(9;22)(q34;q11)                       | <i>ABL-BCR</i>   |
| LMC crisis blástica              | t(9;22)(q34;q11),<br>+8,+19,+Ph,1(17q) | <i>ABL-BCR</i>   |

### 1.7.5 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA CRÓNICA

También llamada leucemia linfocítica crónica, es un síndrome linfoproliferativo crónico que se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos B de aspecto morfológico maduro y biológicamente inmaduros. Las manifestaciones clínicas dependen de la acumulación progresiva de linfocitos B en la médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos, así como de las alteraciones inmunitarias secundarias asociadas. La LLC es la forma más frecuente de leucemia, representando alrededor del 30% de todas las leucemias en los países occidentales. Presenta una incidencia en estos países de 1,5 casos/100.000 habitantes y año, y la mediana de edad de aparición es de unos 60 años. Se desconoce la causa de la LLC, no estando relacionada con radiación ni agentes químicos. Es una enfermedad adquirida, no habiéndose observado un patrón de herencia reproducible<sup>62</sup>. El diagnóstico es casual en la mitad de los casos, por hemogramas de rutina. En un 30% de los pacientes la causa de consulta es la aparición de adenopatías, y en el resto de ellos la causa es variada: astenia, anorexia, infecciones, etc. El hallazgo más frecuente en la exploración son las adenopatías (en un 90% de los pacientes), de carácter moderado generalmente e indoloras. El bazo puede palparse en un 60% de los casos en fases avanzadas y en un 20-30% en el momento del diagnóstico. En ocasiones pueden detectarse alteraciones secundarias a la infiltración por tejido linfocítico de diversos órganos y tejidos, siendo la infiltración cutánea la más frecuente. El hallazgo de laboratorio

más característico es la leucocitosis, habitualmente entre 20 y 50 x 10<sup>9</sup>/l, con linfocitosis superior al 75%. La anemia se observa inicialmente en un 15-20% de los pacientes, siendo la trombopenia menos frecuente. En fases avanzadas la neutropenia puede ser grave, favoreciendo la aparición de complicaciones infecciosas. Los pacientes pueden clasificarse, de acuerdo a los hallazgos analíticos y de exploración en tres grandes grupos pronósticos: de bajo riesgo (30% de los pacientes, linfocitosis), de riesgo intermedio (60% de los pacientes, linfocitosis más adenopatías o más organomegalia) y de alto riesgo (10% de los pacientes, linfocitosis más anemia con o sin trombopenia)<sup>63</sup> (Tabla 8).

**Tabla 8. Clasificación de la Leucemia linfoide crónica.** Modificado de: Santoro A, 1988<sup>64</sup>.

| <b>LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA. CLASIFICACIONES</b> |   |   |                               |                |                                   |
|---|---|---|-------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| <b>ESTADIO</b>                                    | <b>RAI (1975)<br/>CARACTERÍSTICAS</b>   | <b>CARACTERÍSTICAS<br/>HEMATOLÓGICAS</b>            | <b>HALLAZGOS<br/>CLÍNICOS</b> | <b>ESTADIO</b> | <b>RAI<br/>(1987)<br/>ESTADIO</b> |
| 0   | Linfocitosis absoluta<br>Sangre periférica<br>(>15x10 <sup>9</sup> /L) y médula<br>ósea (> 40%) | Hb > 10 g/L Plaquetas<br>> 100 x 10 <sup>9</sup> /L | < 3 áreas<br>comprometidas    | A              | Bajo<br>riesgo                    |
| I   | Linfocitosis absoluta<br>con linfoadenopatía.   |   | > 3 áreas<br>comprometidas    | B              | Riesgo<br>intermedio              |
| II  | Linfocitosis absoluta<br>con esplenomegalia y/o<br>hepatomegalia.                               |   |                               |                |                                   |
| III   | Linfocitosis absoluta<br>con anemia (Hb<11Hg<br>g/L ó Hto <33%)                                 | Hb < 10 Plaquetas <<br>100 x 10 <sup>9</sup> /L     | 0 - 5 áreas                   | C              | Alto riesgo                       |
| IV  | Linfocitosis absoluta<br>con trombocitopenia<br>100 x 10 <sup>3</sup> /L) (plaquetas<br><       |   |                               |                |                                   |

Algunos de los hallazgos citogenéticos asociados a este tipo de leucemia se detallan en la tabla 9. Mediante la técnica de FISH se han identificado en orden decreciente de frecuencia las anomalías cromosómicas siguientes: deleción 13q (51 -55 %), deleción 11q 22 -23 (18 - 20 %), trisomía 12 (15 - 16 %) y deleción 17q

(7 -15 %). Las anomalías 17p y 11q se han planteado como factores de mal pronóstico asociados con una supervivencia más corta. Algunos estudios sugieren que la trisomía 12 es también un factor adverso<sup>63</sup>.

**Tabla 9. Alteraciones cromosómicas recurrentes en Leucemia linfoide crónica y genes implicados. Modificada de Calasanz MJ, 2001<sup>41</sup>. LLC= Leucemia linfoide crónica.**

|                                  | Alteración citogenética | Genes implicados |
|----------------------------------|-------------------------|------------------|
| <b>Leucemia Linfoide Crónica</b> |                         |                  |
| LLC-B                            | t(14;18)(c32;q21)       | IGH-BCL2         |
|                                  | t(11;14)(c13;q32)       | BCL1IGH          |
|                                  | t(14;19)(c32;q13)       | IGH-BCL3         |
|                                  | t(2;14)(p13;q32)        | BCL11AIGH        |
|                                  | +12,del(13q)            |                  |
| LLC-T                            | del(11)(q21q23)         |                  |
|                                  | t(8;14)(q24;q11)        | MYC-TCRA         |
|                                  | t(14;14)(c11q32)        | TCRA-TCL1        |
|                                  | inv(14)(q11q32)         | TCRA-TCL1        |
|                                  |                         |                  |

### 1.7.6 SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) comprenden un grupo heterogéneo de entidades de origen clonal, caracterizados por diferentes grados de desajuste en la capacidad de proliferación y diferenciación de la célula progenitora hematopoyética, que se expresa con citopenias progresivas, alteraciones cualitativas en las 3 series hematopoyéticas y riesgo de transformación en leucemia aguda (LA)<sup>65</sup>. Los tres tipos principales de enfermedad mielodisplásica son los siguientes:

- Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).
- Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ).
- Leucemia mielógena crónica atípica (LMCa).

Cuando una enfermedad mielodisplásica no corresponde a ninguno de estos tipos, se denomina enfermedad mielodisplásica no clasificable (EMD-NC).

Se estima que la incidencia de SMD es de 4 - 12 x 100 000 por año, y puede llegar hasta 30 x 100 000 en los individuos mayores de 70 años<sup>66,67</sup>. La aparición en la edad pediátrica y en el adulto joven es rara<sup>68</sup> y con poca frecuencia se han descrito algunos casos de SMD familiar<sup>69</sup>. Se ha señalado cierto predominio en el sexo masculino, con una proporción de 1: 5<sup>70</sup> y no se ha encontrado relación con la raza. La etiología es generalmente desconocida, aunque se sabe que el 20 % de los SMD son secundarios al empleo de drogas antineoplásicas, entre las que sobresalen los agentes alquilantes<sup>71</sup>, las epipodofilotoxinas<sup>72</sup> y las antraciclinas; al contacto con productos químicos, fundamentalmente los derivados del benceno; a la exposición a radiaciones ionizantes y más recientemente se plantea que el hábito de fumar aumenta el riesgo de padecer SMD<sup>73</sup>. En la infancia su aparición se asocia con la existencia de enfermedades constitucionales.

A través del tiempo estos síndromes han recibido diferentes denominaciones; las más conocidas son: síndromes preleucémicos, anemia sideroblástica, síndromes dismielopoyéticos, anemias refractarias y leucemia subaguda, entre otros. En 1982 el grupo cooperativo francoamericano- británico (FAB) los denominó con el término que hoy se conoce y los clasificó en 5 subgrupos (Tabla 10), atendiendo al porcentaje de blastos presentes en la sangre periférica (SP) y en la médula ósea (MO), al de sideroblastos anillados en MO y al número de monocitos circulantes en SP<sup>74</sup>. Sin embargo, se han originado múltiples controversias acerca de esta clasificación, que aunque tiene ventajas en relación con el diagnóstico y el pronóstico, no está exenta de limitaciones, entre las que podemos citar la demarcación casi arbitraria de los grupos y la superposición entre éstos, que ha llevado a plantear que realmente pudieran representar diferentes estadios de una misma entidad. Actualmente se han podido diferenciar algunas formas clínicas que se plantean como nuevas variantes de SMD<sup>70,75</sup>.

**Tabla 10. Clasificación FAB de los síndromes mielodisplásicos. Modificada de Fernández Delgado N, 1999<sup>76</sup>.**

| Subgrupo | Blastos |                          |          | Monocitos<br>10 <sup>9</sup> /L | Grado de<br>dishemopoyesis |
|----------|---------|--------------------------|----------|---------------------------------|----------------------------|
|          | SP      | %<br>sideroblastos<br>MO | %        |                                 |                            |
| AR       | < 1     | < 5                      | < 15     | ±                               | +                          |
| ARS      | < 1     | < 5                      | ≥ 15     | ±                               | +                          |
| AREB     | < 5     | 5-20                     | Variable | ±                               | ++                         |
| AREB-t   | ≥ 5     | 21-29*                   | Variable | Variable                        | +++                        |
| LMMC     | < 5**   | 0-20                     | Variable | +++                             | ++                         |

\* Algunos autores consideran la aparición de bastones de Auer.  
\*\* Puede ser en ocasiones > 5%.

Las alteraciones del cariotipo, consideradas marcadores clonales de malignidad, están presentes en el 30-50 % de los SMD primarios y en el 80 % de los secundarios, sin que ninguna de éstas sea específica de esta entidad<sup>70</sup>. Se ha observado una mayor incidencia de la pérdida total o parcial de un cromosoma, seguida de la existencia de trisomías. Las traslocaciones son menos frecuentes y afectan fundamentalmente los cromosomas 1,3,5,7 y 17 (Tabla 11). Las alteraciones complejas, denominadas así porque incluyen más de 3 cromosomas, ocurren en el 15 % de los SMD primarios y en el 50 % de los secundarios; es más frecuente la afectación de los cromosomas 5 y 7<sup>70,77</sup>. En diferentes estudios clínicos el cariotipo se asocia con el riesgo de transformación leucémica y algunas anomalías cromosómicas han sido propuestas como factores pronósticos independientes<sup>78</sup>, tal es el caso de las alteraciones complejas, la trisomía 8 y la monosomía 7.

**Tabla 11. Alteraciones cromosómicas recurrentes en Síndrome mielodisplásico y genes implicados. Modificada de Calasanz MJ, 2001<sup>41</sup>.** LMMC= Leucemia mielomonocítica crónica. SMD= Síndrome mielodisplásico.

|                                 | Alteración citogenética  | Genes implicados        |
|---------------------------------|--|-------------------------|
| <b>Síndrome Mielodisplásico</b> |  |                         |
| LMMC                            | t(5;12)(q33;p13)   | <i>PDGFRB-TEL(ETV6)</i> |
| SMD                             | -7,del(7q),-5,del(5q),<br>+8,del(11q),del(20q),<br>del(11q),del(12p) |                         |

## 1.8 FACTORES DE RIESGO PARA LEUCEMIA

Cualquier cosa que aumenta el riesgo de padecer una enfermedad se llama factor de riesgo. Tener un factor de riesgo no significa que se va a padecer cáncer; no tener factores de riesgo no significa que no se va a tener cáncer. Los factores de riesgo posibles para leucemia incluyen los siguientes aspectos:

- *Campos electromagnéticos.* Hace tiempo se consideraba que evaluar la exposición a estos campos través de códigos de cableado era la mejor alternativa, ya que se podía tener una idea más clara de las exposiciones presentes y pasadas<sup>79,80</sup>. Se han propuesto nuevas formas de evaluación de la exposición a campos electromagnéticos<sup>81</sup>, no obstante los resultados siguen siendo negativos<sup>82</sup>, además es muy difícil evaluar la validez de dichas propuestas<sup>83</sup>. Se ha llegado a afirmar que aun cuando existiera asociación entre los campos electromagnéticos y la leucemia aguda, el riesgo atribuible a este factor sería de alrededor de 4%<sup>84</sup>, porcentaje nada despreciable en una enfermedad cuyos factores de riesgo no están totalmente establecidos.
- *Exposición a radiación ionizante.* La exposición intrauterina a la radiación es uno de los factores aceptados en la génesis de la leucemia aguda en niños<sup>85,86</sup>. El riesgo aumenta cuanto menor es la edad y mayor la dosis de radiación. Se sabe que los niños menores de 10 años de edad expuestos tienen mayor riesgo de desarrollar leucemia aguda y que el tiempo de latencia es de aproximadamente cinco años (menor que en el adulto)<sup>87,88</sup>.
- *Haber tenido un tratamiento con quimioterapia.* Y/u otros medicamentos que debiliten el sistema inmunitario.
- *Vitamina K.* La asociación de leucemia con el uso de vitamina K inyectada intramuscularmente ha causado gran interés<sup>89</sup>. Los reportes iniciales marcaron una asociación entre 2.6 [IC 95%= 1.3 a 5.2] y 2.2 [IC 95%= 1.1 a 4.4]<sup>90</sup>. No bien el riesgo de la enfermedad hemorrágica del recién nacido es mayor si se dejara de usar la vitamina K en comparación con el riesgo de



seguirle usando, es importante seguir investigando el tema, ya que de verificarse su asociación con el cáncer en la edad pediátrica, esto podría explicar hasta 40% de los casos<sup>91</sup>.

- *Tabaquismo.* En la leucemia mieloblástica aguda del adulto se considera un factor de riesgo importante<sup>92,93</sup>. En niños no se ha encontrado tal asociación<sup>94,95</sup>. El riesgo del tabaquismo del padre se ha estimado con una RM= 2.4 (IC 95%= 1.2 a 2.5) para desarrollar leucemia aguda en sus hijos. Cabe hacer notar que hay mas relación con el tabaquismo paterno que con el materno. También ha sido más consistente la asociación con el tabaquismo previo al embarazo del niño<sup>90,91,96</sup>. Existen datos indicativos de que los fumadores tienen mayores niveles de 8-hidroxi-2-deoxiguanosin (8-Oh-dG) en el DNA del esperma, por lo cual se ha propuesto la existencia de una mutación germinal en el padre que se transmite al hijo<sup>96</sup>. Para la evaluación posnatal se considera que el tabaquismo materno es el mejor indicador del tabaquismo pasivo del niño, sobre todo en las primeras etapas de la vida<sup>90,97</sup>. Cuando se ha buscado interacción entre la exposición pasiva al humo del tabaco y el polimorfismo de los genes que regulan el metabolismo de los cancerígenos, no se ha encontrado asociación<sup>98</sup>.
- *Ingesta de alcohol.* Se considera el consumo del alcohol como posible factor de riesgo para la leucemia miloblástica, pero no para la linfoblástica<sup>90,99</sup>. Algunas evidencias señalan que los niños de madres que ingirieron alcohol durante el embarazo tuvieron mayor frecuencia de mutaciones en linfocitos al momento del nacimiento<sup>100</sup>. El alcohol, en particular el vino, es un inhibidor de la topoisomerasa II, relacionada de forma importante al desarrollo de leucemias agudas en los lactantes<sup>92,101</sup>.
- *Dieta.* La dieta, parte del estilo de vida, se considera una de las fuentes más importantes de exposición en los niños<sup>102</sup>. Los mecanismos a través de los cuales la dieta puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer son la ingestión de cancerígenos preformados en la dieta o agua, o bien durante el proceso de cocimiento o preservación, por la conversión de componentes

de la comida, como los nitratos, a cancerígenos mediante la acción de enzimas endógenas a la flora bacteriana<sup>102,103</sup>. Por otro lado, algunos nutrientes ingeridos por la madre durante el embarazo podrían aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar cáncer<sup>99,101,104</sup>. De hecho, el programa canadiense de prevención del cáncer en niños, incluye la dieta de la madre durante el embarazo como un aspecto importante<sup>105</sup>. Dentro de los alimentos que consume la madre durante el embarazo, pueden estar relacionados, sobre todo en los lactantes, los inhibidores de la topoisomerasa II, como las frutas y verduras que contienen quercetinas, frijol de soya (genisteína), el café regular, el té negro y verde, las bebidas de coca y el vino (catequinas)<sup>99,101</sup>. Es importante considerar que en los adultos se ha observado que la acción de algunos factores cancerígenos varía por la dieta del individuo<sup>106</sup>, tal es el efecto de las radiaciones<sup>107</sup> y el tabaco<sup>108</sup>. En el niño, la interacción entre la dieta y otros factores de riesgo para cáncer han sido poco estudiados, aún cuando en seminarios recientes se ha propuesto a la dieta como un factor muy importante<sup>109</sup>. Para el cáncer en general se considera que evitar la obesidad, consumir frutas y verduras en abundancia y evitar la ingesta excesiva de carne roja y alimentos ricos en grasa animal, puede reducir el riesgo de cáncer en los seres humanos<sup>110</sup>. El incremento en el consumo de alimentos con alto contenido de antioxidantes se considera la mejor estrategia natural para disminuir el riesgo de cáncer. No debe olvidarse que diferentes alimentos se encuentran contaminados con agentes cancerígenos, como se observó en Bélgica, donde 12.1% de muestras de carne de pollo y puerco analizadas tenían niveles tóxicos de bifenil policlorinado y DDT; hallazgo también encontrado en el pescado<sup>111</sup>.

En un estudio en México publicado en 2005, se identificaron los principales factores de riesgo de pacientes con leucemia. Se han identificado los antecedentes familiares de cáncer, con una razón de momios (RM) de 1.93 e IC 95%=1.2-3.63; abortos previos al nacimiento del niño (RM= 2.44, IC 95%= 1.06 a

5.68); peso del niño al nacimiento superior a 3500 g (RM= 2.21, IC 95%= 1.94 a 4.33; exposición a insecticidas (RM= 1.93, IC 95%= 1.05 a 3.56) y vivir cerca de cables de distribución eléctrica de alta tensión (RM= 2.63, IC 95%= 1.26 a 5.36)<sup>112,113</sup>. Factores corroborados por una investigación posterior<sup>114</sup>.

## **1.9 DIAGNÓSTICO**

Si bien algunas leucemias tienen carácter fulminante, otras pueden ser enfermedades indolentes de presencia insidiosa. Ya que no existe ningún síntoma que por sí solo y de manera específica permita diagnosticar esta enfermedad, siempre debe descartarse la presencia de leucemia en presencia de manifestaciones clínicas sugerentes. El diagnóstico es multidisciplinario desde la coordinación y colaboración entre cirujanos, patólogos, oncólogos, genetistas y la incorporación de nuevas técnicas de citogenética molecular basadas en la hibridación in situ con fluorescencia ha hecho que el análisis en leucemias haya experimentado un enorme avance.

### **1.9.1 EXÁMEN CLÍNICO**

Se hace por medio de una historia clínica completa en donde el interrogatorio va dirigido a encontrar factores de riesgo, incluyendo una exploración física completa, como la búsqueda de signos y síntomas de la enfermedad, masas, antecedentes médicos de las enfermedades y los tratamientos previos del paciente.

### **1.9.2 HEMOGRAMA**

Se realiza un recuento sanguíneo completo (RSC) con diferencial mediante el cual se toma una muestra de sangre y se analiza la cantidad de glóbulos rojos (plaquetas, hemoglobina), la cantidad y tipo de glóbulos blancos. Este estudio permite sospechar el diagnóstico en la mayoría de los pacientes<sup>115</sup>.

### **1.9.3 MIELOGRAMA**

Es el examen de certeza cuyo estudio citológico permite clasificar la leucemia como linfoblástica en más del 95% <sup>115</sup> y consiste en la extracción de células o tejidos (médula ósea, sangre, hueso) mediante la inserción de una aguja en el hueso de la cadera o el esternón para su examen histopatológico. La biopsia asociada al estudio histopatológico determina si es tejido benigno o maligno.

### **1.9.4 CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL (CARIOTIPO DE BANDAS G)**

El análisis citogenético convencional consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas obtenidas tras el cultivo "in vitro", a corto plazo y sin mitógenos de células de médula ósea, sangre periférica, ganglios, biopsias, etc. El estudio de la morfología de los cromosomas, teñidos fundamentalmente con bandas G (Tripsina-Giemsa), permite detectar en un único experimento, tanto las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías, etc.), como las estructurales (traslocaciones, inversiones, deleciones, etc.) presentes en todo el genoma.

### **1.9.5 INMUNOFENOTIPIFICACIÓN**

Proceso utilizado para identificar los linfoblastos en su estirpe B o T y en diferentes etapas de maduración <sup>116</sup>. Este proceso se utiliza en el diagnóstico del subtipo de LMA mediante la comparación de las células leucemicas con las células normales del sistema inmunitario.

### **1.9.6 RADIOGRAFÍA DE TORAX**

Se realiza la búsqueda de nódulos malignos en órganos y huesos a través de la radiografía de tórax.

### **1.9.7 CITOGENÉTICA MOLECULAR (HIBRIDACIÓN “IN SITU” CON FLUORESCENCIA)**

Las técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) se basan en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma, bien en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Las técnicas de FISH si bien no se han incorporado en todos los laboratorios de genética como rutina. La alta sensibilidad y especificidad del FISH y la rapidez de los ensayos han hecho de esta técnica una importante estrategia diagnóstica con numerosas aplicaciones<sup>117</sup>. Por otra parte, otras técnicas derivadas del FISH han progresado hasta tal punto que hoy es posible, utilizar 24 sondas de pintado cromosómico, consiguiendo identificar cada cromosoma por su color. Entre las técnicas derivadas del FISH convencional, cabe destacar, la hibridación genómica comparada (CGH), de enorme utilidad en tumores sólidos y el cariotipo multicolor (SKY-FISH y M-FISH). Todas ellas, constituyen una nueva disciplina a la que se ha denominado “citogenética molecular”, que complementan, pero nunca excluyen al análisis citogenético convencional.

### **1.9.8 FISH CONVENCIONAL**

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Es importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que buscamos. El resto del genoma permanece oculto.

Podemos utilizar sondas de ADN de distintos tipos: centroméricas (marcan únicamente las zonas centroméricas), de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencia específicas de locus (marcan regiones cromosómicas de secuencia única).

Esta técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional en todas aquellas situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo: al disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en los que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo, como el caso de la t(12;21) en leucemia linfoblástica aguda infantil.

### **1.9.9 CGH (HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA)**

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la citogenética convencional, es la ausencia de metafases y su gran ventaja reside en ser una técnica que permite analizar todo el genoma. La técnica de FISH convencional ha resuelto el primer problema, ya que permite analizar núcleos en interfase, pero en cambio su gran limitación es que no es una técnica de screening, como el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones que buscamos. A principio de los 90 y con especial aplicación en tumores sólidos, en donde obtener metafases de calidad es a menudo complicado, se describió una nueva técnica de citogenética molecular: la hibridación genómica comparada (CGH)<sup>118</sup>. Esta técnica emplea ADN del tumor y además no analiza metafases, obviando la necesidad de células en crecimiento.

Esta técnica derivada del FISH se basa en la hibridación competitiva de dos ADNs, (tumoral y control normal) marcados con distintos fluoroforos, sobre cromosomas normales. En resumen: se marca el ADN del tumor con un fluoroforo verde y un ADN normal (control) con un fluoroforo rojo. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y se realiza una hibridación *in situ* sobre cromosomas metafásicos normales. Ambos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado en rojo y verde es la misma, el resultado final son cromosomas amarillos (mezcla 1:1 de rojo y verde). En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor y la hibridación de esa zona resultará en una mayor proporción de fluorocromo del tumor (verde). Al contrario, si el tumor

contiene una deleción (pérdida), la región delecionada del tumor aparecerá en rojo, ya que habrá más cantidad de ADN normal (rojo) para hibridar en esa región cromosómica. La CGH permite, por tanto, la detección de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en todo el genoma del tumor por la comparación de las intensidades de las señales de hibridación.

## 1.10 TRATAMIENTO

El tratamiento de la leucemia se realiza en fases:

- Terapia de inducción. Es la primera fase del tratamiento. Su propósito es destruir las células leucémicas de la sangre y la médula ósea. Esto pone la leucemia en remisión. También se llama fase de inducción de la remisión.
- Terapia de consolidación e intensificación: es la segunda fase de la terapia. Comienza una vez que la leucemia está en remisión. El propósito de la terapia de consolidación e intensificación es destruir las células leucémicas restantes que pueden no estar activas, pero que pueden comenzar a regenerarse y causar una recaída.
- Terapia de mantenimiento: es la tercera fase del tratamiento. Su propósito es destruir toda célula leucémica restante que pudiera regenerarse y producir una recaída. A menudo, los tratamientos de cáncer suelen administrarse en dosis más bajas que aquellas para la inducción y la terapia de consolidación e intensificación. Esta fase también se llama terapia de continuación.

La biopsia de la médula ósea y los aspirados se realizan a lo largo de todas las fases para observar si la leucemia está respondiendo bien al tratamiento.

El tratamiento llamado terapia santuario del sistema nervioso central (SNC) se administra generalmente durante cada fase de la terapia. Debido a que la quimioterapia que se administra oralmente o se inyecta por vía intravenosa puede no llegar a las células leucémicas en el SNC (cerebro y espina dorsal), las células

pueden encontrar un “santuario” (se esconden) en el SNC. La quimioterapia intratecal y la radioterapia pueden llegar a las células leucémicas del SNC y se administran para destruir las células leucémicas y evitar que el cáncer vuelva. La terapia santuario del SNC también se llama profilaxis del SNC.

## 1.11 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 1.11.1 GENES RELACIONADOS CON LEUCEMIA

#### 1.11.1.1 CROMOSOMA FILADELFIA

Fue la primera anomalía cromosómica asociada con una enfermedad maligna específica en humanos (la leucemia mielocítica crónica)<sup>119</sup>. Cuando se presenta la  $t(9;22)$  (q34;q11) se produce una activación oncogénica, debido a la traslocación del oncogén ABL localizado en el cromosoma 9, con el oncogén BCR del cromosoma 22, formando un gen híbrido BCR-ABL, que codifica para una proteína de fusión que aumenta la actividad tirosina quinasa con potencial neoplásico. Más del 95% de los pacientes con LMC portadores de la traslocación  $t(9;22)$  (q34;q11), presentan el gen quimérico BCR-ABL (Fig.5). Este rearrreglo cromosómico BCR-ABL, también se puede encontrar en niños y adultos con leucemia linfocítica aguda (LLA) entre el 2-5% y 10-20% respectivamente, asociándose a mal pronóstico.

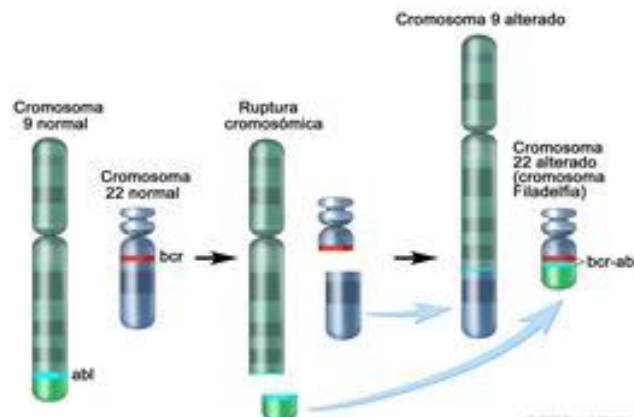


Fig.5. Cromosoma filadelfia. Una traslocación del cromosoma 22 y cromosoma 9.



El mecanismo por el cual la fusión anormal de genes, tales como el BCR-ABL puede dar origen a diferentes leucemias, se atribuye a la función de estos genes en el desarrollo y función de las células de las líneas mieloides y linfoides, así como a la alteración en factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, señales de traducción, genes receptores de inmunoglobulinas y genes receptores de las células T <sup>120,121</sup>.

Según Pane et al (1996) la localización precisa del punto de ruptura en el gen BCR y el gen ABL, así como la composición de la proteína producto de la fusión BCR-ABL, puede servir para determinar el fenotipo de la enfermedad y por tanto, para orientarse en la estrategia terapéutica a seguir<sup>122</sup>.

La detección de la traslocación t(9;22)(q34;q11) por métodos citogenéticos convencionales no siempre es posible, lo que se atribuye generalmente a una muestra pobre de médula ósea, metafases insuficientes e inadecuadas y a una sobrepoblación de la actividad mitótica de las células no-leucémicas sobre las células leucémicas<sup>123,124</sup>.

La técnica molecular de la transcriptasa reversa (RT-PCR) permite caracterizar los transcritos formados por las traslocaciones desencadenantes de las leucemias, como son los puntos de ruptura en las regiones de los genes BCR y ABL, las cuales están asociados a la presentación clínica de la LMC y la LLA. Determina la estructura y composición de las proteínas de fusión de genes producidos por los distintos rearrreglos genómicos y por lo tanto, el fenotipo de la leucemia<sup>125,126</sup>.

En enero de 2002 se describió que las leucemias agudas en los menores de un año tienen un comportamiento clínico y pronóstico muy distinto al de las estirpes histológicas de los niños mayores, puesto que presentan una alteración genética muy consistente que involucra el gen de la leucemia linfoide-mieloide, correspondiente a un tipo muy distinto al linfoblástico y mieloblástico, por lo que se ha sugerido que las leucemias agudas en los menores de un año se clasifiquen como un nuevo tipo<sup>127,128</sup>.

## 1.12 CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos se encuentran formados por dos o más subunidades proteicas que atraviesan la doble capa lipídica de la membrana celular, se encuentran formando un espacio intermolecular por donde pasan iones. Los canales iónicos tienen tres propiedades importantes; a) conducen iones, b) reconocen y seleccionan los iones (los canales pueden ser selectivamente permeables a uno o varios iones) y c) se abren o cierran en respuesta a estímulos eléctricos, mecánicos o químicos<sup>129</sup>.

Los canales iónicos son muy importantes en la transmisión del impulso eléctrico en el sistema nervioso. Los canales iónicos participan también en múltiples procesos biológicos que requieren cambios rápidos en las células de tipo excitable, como: contracción del músculo cardíaco y esquelético, transporte de iones y nutrientes a través de epitelios a nivel entérico, activación de linfocitos T o la liberación de insulina por las células beta del páncreas. En la naturaleza existen toxinas como la tetrodotoxina (toxina del pez globo) que permite bloquear los canales de sodio, o la alfabungarotoxina (toxina de algunos sapos) que bloquea los canales de potasio paralizando el sistema nervioso de depredadores o presas. Los canales iónicos son un objetivo clave en la búsqueda de nuevos fármacos<sup>130,131,132</sup>.

La aportación de los canales iónicos a fenotipos neoplásicos es diversa y la mayoría de los estudios se enfocan al papel de los canales, especialmente de  $K^+$ , en la regulación del ciclo celular<sup>133,134,135</sup>.

Hay genes que codifican para proteínas de canales de  $K^+$  que muestran tener un potencial oncogénico por sí mismos<sup>136,137</sup> más algunos genes que codifican para canales iónicos se han catalogado como genes supresores de tumor en neoplasias humanas<sup>138,139</sup> y la expresión de ciertos oncogenes afecta directamente la función de canales de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ <sup>140</sup>.

Además, la expresión de canales iónicos está generalmente alterado en células tumorales en comparación con células normales: varios tipos de canales de  $K^+$  y  $Na^+$  están sobreexpresados en células cancerosas y se ha demostrado una localización anormal de canales de  $K^+$  en tumores astrocíticos<sup>133</sup>.

Hay datos crecientes en relación al papel de los canales en los cambios en el citoesqueleto e interacciones célula a célula<sup>141</sup>. Estos cambios representan los pasos iniciales que conducen al incremento de la motilidad celular, el cual es un prerrequisito para la invasión tumoral. Además se ha reportado la interacción de canales iónicos con las integrinas<sup>133,141</sup>, las cuales son de hecho receptores de adhesión importantes en la metástasis tumoral<sup>142</sup>. A este respecto, cada vez queda más claro que la invasión de células tumorales puede ser detenida con el uso de bloqueadores de canales<sup>143,144,145</sup>.

### **1.12.1 PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS CANALES DE $K^+$**

Los canales son muy importantes en el mantenimiento del potencial de reposo celular, transmisión del impulso eléctrico en el sistema nervioso, liberación de neurotransmisores, frecuencia de activación de las células automáticas, la regulación del volumen celular, transporte de electrolitos, secreción de insulina, excitabilidad celular, y contracción del músculo liso.

Canales de  $K^+$  voltaje dependientes se puede subdividir en dos grandes grupos:

- 1) activados por cambios de voltaje
- 2) agonistas

Pero la clasificación más común es aquella que ordena los canales de  $K^+$  atendiendo a la topología de las subunidades  $\alpha$ , es decir, al número de poros y de segmentos transmembranales del canal (denominados S).

La despolarización celular activa los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje y facilita la salida de  $K^+$  de la célula, lo que lleva a la repolarización del potencial de membrana.

Los canales que se activan por cambios de voltaje y los activados al aumentar la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  entre otros, pertenecen a la familia de canales  $K^+$  con seis segmentos transmembranales y un poro (6TM-1P).

## 2 ANTECEDENTES

---

### 2.1. CANAL IÓNICO KCNH4 (BEC2)

Se ha denominado de diferentes maneras a KCNH4 como son Elk2 por Engeland et.al.<sup>146</sup> y como BEC2 por Miyake et.al.<sup>147</sup>.

Este gen pertenece a la subfamilia Elk (ether-á-go-go-like K<sup>+</sup> channel) descubierta primero en *Drosophila*<sup>148</sup> a su vez perteneciente de la familia del gen *Eag* del canal de K<sup>+</sup> representada en los mamíferos por 3 genes (*Eag*, *Erg*, y *Elk*) que son altamente conservados dentro de los humanos, ratones y *Drosophila*<sup>149</sup>.

El gen *BEC2* (brain-specific eag-like channel 2) es específico del cerebro humano, se localiza en el neocortex y la región estriada. Corresponde a la subfamilia *elk* que pertenece a la familia ether-a-go-go y pueden estar relacionados con la excitabilidad o restricción celular de las neuronas dentro del sistema nervioso central humano<sup>150</sup>.

Se han identificado una nueva subfamilia que se compone de los genes *BEC1*, *BEC2* y *BEC3* lo que revela que existe al menos tres homologos de elk<sup>150</sup>, *BEC1* y *BEC2* son homologos a *elk* canal de K<sup>+</sup> de la *Drosophila*. Ya han aislado cDNA completo del tercer gen humano *BEC3*<sup>151</sup>. Elk1 de rata es ortólogo de *BEC3*, por lo tanto este gen es 91% idéntico a *BEC3*.

El cDNA de *BEC2* tiene 3920 pb. El canal de K<sup>+</sup> que codifica este gen contiene un núcleo hidrofóbico que corresponde a 6 segmentos transmembranales (S1-S6) y la región del poro es dependiente de voltaje. La región hidrofóbica contiene 229-482 residuos. Esta secuencia es comparable con los miembros de las subfamilias de genes conocidos de la superfamilia de canales de K<sup>+</sup>. El sensor putativo de voltaje S4 y la región del poro que conduce el ion también es compartido por *BEC1* y *BEC2*. La región S4 contiene 5 residuos cargados positivamente que se

encuentran en cada tercera posición. La región del poro tiene un triplete GFG un motivo común de los canales de K<sup>+</sup> del tipo eag<sup>152</sup>.

Reportes con el canal KCNH4 relacionados con leucemia aun no se han publicado, pero mencionaremos los trabajos reportados con este canal.

## 2.2. CÁNCER Y EL CANAL KCNH4

Giaccone y colaboradores realizaron un estudio prototipo de vacunación estratégica en pacientes con enfermedad residual mínima limitada de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). Observaron que la vacunación de BEC2 (2.5 mg) con bacilo Calmette-Guerin (BCG) prolonga la sobrevida en 40% de los pacientes con SCLC después de la quimioterapia y radiación de tórax<sup>153</sup>.

BEC2/BCG ha demostrado ser seguro y estimula respuesta anti-GD3 dentro de pacientes con melanoma<sup>154,155</sup>. Un pequeño estudio piloto en pacientes con SCLC fue realizada en Memorial Sloan-Kettering, donde se observo sobrevida prolongada en 15 pacientes después de la terapia de inducción con la vacunación<sup>156</sup>.

BEC2 (KCNH4) se ha usado como un anticuerpo anti-idiotípico que imita a GD3, que es un gangliósido que se expresa sobre la superficie de células tumorales incluyendo SCLC es de origen neuroectodérmico, GD3 ha mostrado tener una sobreexpresión de 60% aproximadamente en tejido de SCLC, similar a GM1-fucosyl<sup>157</sup>. Los gangliósidos son componentes complejos glucolípidicos de la membrana plasmática celular localizadas en el exterior de la superficie de la célula. Están involucrados dentro de numerosas funciones biológicas incluyendo el reconocimiento de célula-célula, anclaje a la matriz y la diferenciación. Comparando las concentraciones de glucoesfingolípidos de un pulmón normal, se encontraran aproximadamente dos veces más alta dentro del tejido con SCLC<sup>158</sup>.

Sin embargo el GD3 es poco inmunogénico, solo o mezclado con coadyuvantes<sup>159</sup>. El anticuerpo monoclonal anti-idiotípico fue más efectivo induciendo la respuesta de anticuerpos anti-GD3 en pacientes. El uso de BEC2 cuando se administra en combinación con el bacilo Calmette-Guerin (BCG), produce anticuerpos anti-GD3 detectables dentro de 20% y 33% aproximadamente dentro de los pacientes<sup>156,160</sup>. Los estudios se han realizado con y sin diferentes adyuvantes y BCG ha demostrado ser uno de los mejores en combinación con BEC2 dentro de un número de estudios.

La vacunación con BEC2/BCG no impactó sobre el resultado de los pacientes con SCLC respuesta combinada de tratamiento. La estrategia de vacunación en SCLC justifica la utilización de la vacunación que produce una mejor respuesta inmunológica.

El gangliósido GD3 es un atractivo blanco para inmunoterapia en melanoma porque este se expresa en abundancia sobre células de melanoma pero en células normales humanas la expresión es mínima o no se expresa. La infusión de anticuerpo monoclonal de ratón (MAb) induce respuesta en GD3 en pacientes con melanoma avanzado<sup>161</sup>. Para inducir una respuesta inmune contra GD3 en pacientes con melanoma. La vacunación con BEC2/BCG a dosis bajas puede inducir respuesta de anticuerpo contra GD3 dentro de un subconjunto de pacientes. Observaron que el 14% de los pacientes desarrollaron anticuerpos anti-GD3<sup>155</sup>.

El papel de este canal en el desarrollo de la leucemia no ha sido evaluado hasta el momento.

### 3 JUSTIFICACIÓN

---

Existen pocos marcadores moleculares para leucemia aplicados en la práctica clínica y los que existen tiene una baja representación en algunos tipos de leucemia por lo cual hay una imperiosa necesidad para encontrar moléculas que pudieran proponerse como biomarcadores de leucemias.

En diferentes tipos de neoplasias, se ha observado que los canales iónicos se han encontrado sobreexpresados, por lo cual pueden tener un papel importante en cáncer. Desde el punto de vista de la biología del cáncer humano es importante conocer como participa el canal iónico KCNH4 en leucemia dado que hasta el momento, no se ha realizado el estudio en biopsias de leucemia de pacientes.

En este trabajo, se propone el análisis en la expresión del transcrito del canal iónico KCNH4 (BEC2) en muestras de leucemia de pacientes.



## 4 HIPÓTESIS

---

**El transcrito *KCNH4* presenta una sobreexpresión en tejidos de Leucemia en comparación con tejido de médula ósea normal.**

## 5 OBJETIVOS

---

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión del transcrito *KCNH4* en tejido de Leucemia y en tejido de médula ósea normal.

## 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Determinar los niveles de expresión del transcrito KCNH4 en tejido de Leucemia y en tejido de médula ósea normal.*
- *Comparar los perfiles de expresión del transcrito KCNH4 en tejidos de Leucemia y tejidos de médula ósea normal.*
- *Establecer el valor de KCNH4 como marcador molecular de Leucemia.*

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### **6.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES**

#### **6.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Muestras de médula ósea con diagnóstico histológico de leucemia

#### **6.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Muestras no diagnosticadas o con datos insuficientes.

#### **6.1.3. MUESTRAS DE CONTROL**

Muestras de tejido normal de médula ósea postmortem.

### **6.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

Las muestras fueron tomadas por aspiración de médula ósea de esternón, con todas las medidas de asepsia y antisepsia. Se congelaron y transportaron en nitrógeno líquido para ser almacenadas en un ultracongelador a -80°C.

#### **6.2.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS CLÍNICAS**

Las muestras de Leucemia fueron obtenidas de pacientes que acudieron al servicio de Genética del Hospital General de México y fueron proporcionadas por la Dra. Rosa María Arana. Las muestras de tejido de médula ósea normal postmortem fueron obtenidas del Servicio Médico Forense.

### **6.3. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL**

Todo el material usado se sometió a un pre-tratamiento con un descontaminador de RNAsas (RNAsa AWAY Ambion®) y se utilizó agua tratada con DEPC. También, en todos los procedimientos, se utilizaron guantes de látex nuevos para evitar degradación y/o contaminación de las muestras. Para la extracción de RNA total se utilizó un kit de extracción de RNA (RecoverAll, Ambion®). (Anexo 1).

### **6.4. RETROTRANSCRIPCIÓN (SÍNTESIS DE cDNA)**

Tras la obtención del RNA total de las muestras de Leucemia y las muestras control, se obtuvo cDNA a través de retrotranscripción por medio de un kit comercial (Superscript II, Invitrogen®) (Anexo 2).

### **6.5. VALORACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA**

Por ser muy pequeña la cantidad de RNA aislada de las muestras de Leucemia, para evaluar su calidad e integridad, verificar que durante la toma de muestra y transporte no ocurrió degradación y que el proceso de extracción se efectuó de manera correcta, se realizó una RT PCR convencional de dos pasos, en la cual se amplificó el gen de  $\beta$ -actina humana, el cual es constitutivo.

### **6.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)**

La principal meta de la PCR cuantitativa en tiempo real es amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos en una muestra, incluso cuando éstos se presentan en pequeñas cantidades<sup>162</sup>.

La PCR en tiempo real se caracteriza por evaluar el producto amplificado después de cada ciclo, mientras que con la PCR convencional la detección del producto amplificado se realiza al final de la corrida<sup>163</sup>. El sistema de la PCR cuantitativa en tiempo real está basado en la detección y cuantificación de un fluoróforo que tiene la función de reportero. La señal de fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la cantidad del producto de la PCR y el sistema es capaz de detectar el incremento de la fluorescencia en cada uno de los ciclos, lo cual hace posible vigilar la reacción durante todo el proceso de amplificación, donde al final la señal detectada está relacionada con la cantidad de templado inicial. El Ct (Threshold cycle, ciclo de umbral) es un límite determinado al identificar el ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se levanta sobre el ruido de fondo. En la PCR en tiempo real es importante el Ct. Este Ct es obtenido por el programa del equipo de tiempo real usado (fqdpcr versión 4.0 Bioer Technology), pero puede ser modificado por el operario. El Ct aparece en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias blanco. Por lo tanto, mientras más grande es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia y son más bajos los valores de Ct.

Existen varios sistemas de PCR en tiempo real que permiten evaluar la fluorescencia cuando se amplifica el DNA<sup>164</sup> entre los cuales los más comunes son: el uso de agentes intercalantes en la doble cadena de DNA, pruebas basadas en la hibridación y pruebas de hidrólisis.

En este estudio, se utilizaron agentes intercalantes, los cuales son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen al DNA de doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR Green, el cual aumenta más de 1000 veces su fluorescencia cuando se une al surco menor del DNA<sup>164</sup> (Fig.6). El incremento de DNA en cada ciclo se refleja como un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El SYBR Green presenta una banda de absorción en una longitud de onda de 480nm y una banda de emisión en 520 nm<sup>165</sup>.

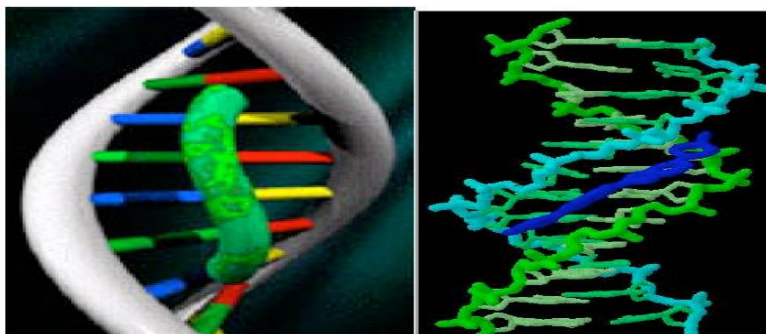


Fig.6. Representación de la interacción de SYBR Green con el DNA de doble cadena.

## 6.7. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN DE INTERÉS Y EL GEN CONSTITUTIVO

Para esto se estandarizaron las condiciones para amplificar el gen de  $\beta$ -actina humana y *KCNH4*, que fue nuestro gen de interés, para lo cual se utilizaron los siguientes oligonucleótidos. Para mayores detalles, ver anexo 3.

$\beta$ - actina humana F 5'- CAACTCCATCATGAAGTGTGAC-3'

$\beta$ - actina humana R 5'- GCCATGCCAATCTCATCTTG-3'

KCNH4 F 5' - TCCGGCTCGCTTGAGGTGCT - 3' <sup>150</sup>

KCNH4 R 5'- CCAGTGGGGGAATGAGAAGC - 3'

## 6.8. BUSQUEDA DE NORTHERN ELECTRÓNICO DE KCNH4

PubMed es un proyecto desarrollado por la National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>166</sup> en la National Library of Medicine (NLM). Permite el acceso a bases de datos bibliográficas compiladas por la NLM: MEDLINE, PreMEDLINE, Genbank y Complete Genoma. Medline contiene subbases: AIDS, Biothics, Cancer, Complementary Medicine Core Clinical Journals, Dental Journals, Nursing Journals y PubMed Central.

En la base de datos del NCBI<sup>166</sup> se realizó la búsqueda en la división de Genbank que contiene los datos de secuencias cortas expresadas ("Expressed Sequences").

Tags" EST) generalmente alrededor de 300-500 pb siendo la secuencia a partir de mRNA (cDNA). Por lo general se producen en grandes cantidades. Los EST representan una imagen de los genes expresados en un tejido determinado o en una etapa determinada del desarrollo. Son etiquetas (algunos codifican, otros no), de expresión para una biblioteca de cDNA. Por lo cual se realizó la búsqueda de la expresión de KCNH4 en diferentes tejidos sanos y tejidos neoplásicos.

## 6.9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la estrategia experimental que seguimos para realizar este trabajo (Fig. 7).

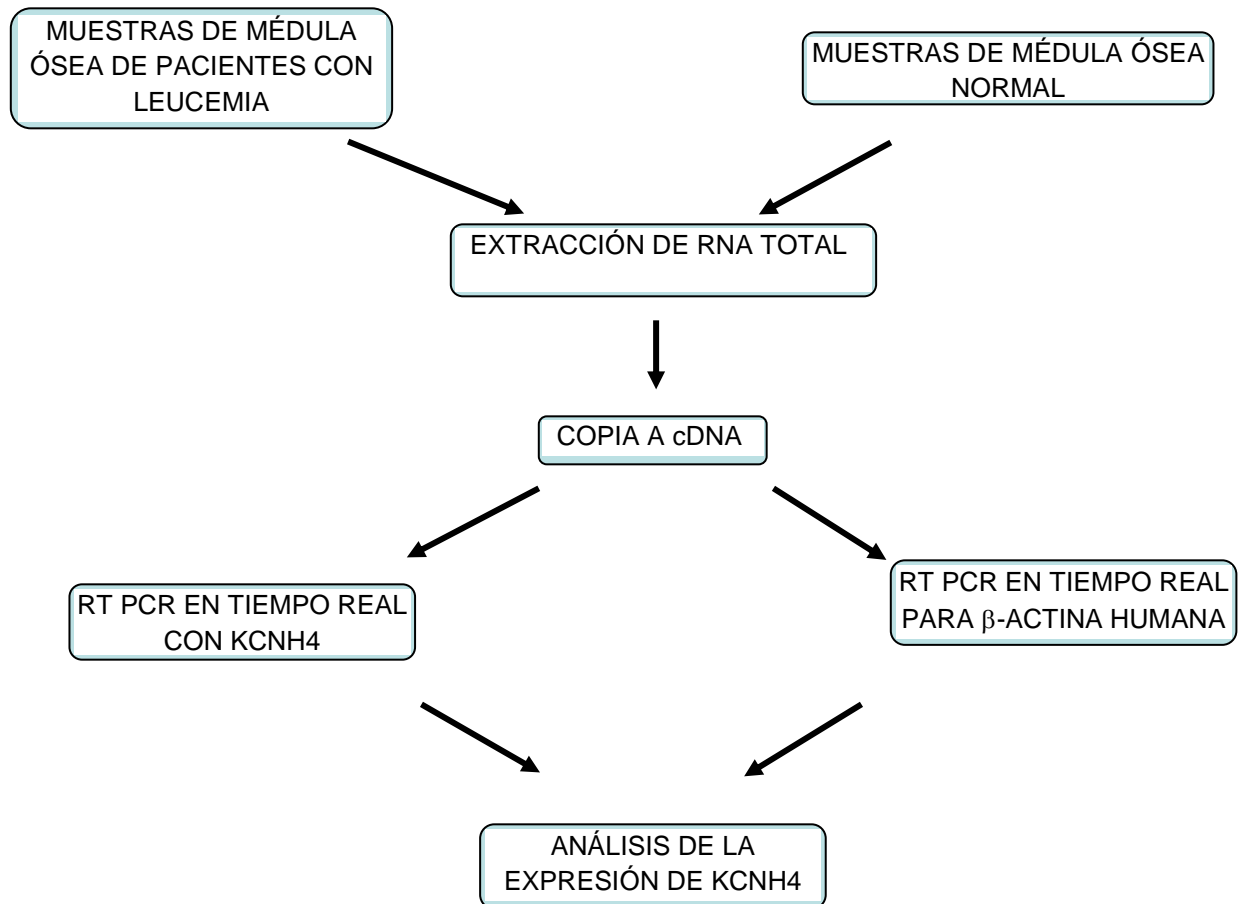


Fig.7. Diseño experimental.



## 7. RESULTADOS

---

### 7.1. NORTHERN ELECTRÓNICO DE KCNH4

- Se realizó la búsqueda de la expresión en diferentes tejidos sanos de KCNH4 en la base de datos del NCBI, se puede observar que hay tejidos donde el gen *KCNH4* se expresa abundantemente como esófago y amígdala. En otros tejidos y órganos como: placenta, cerebro, sangre y tejido conectivo este gen tiene un nivel de expresión bajo, mientras que en médula ósea no hay transcritos de este gen aún reportados (Fig.8).

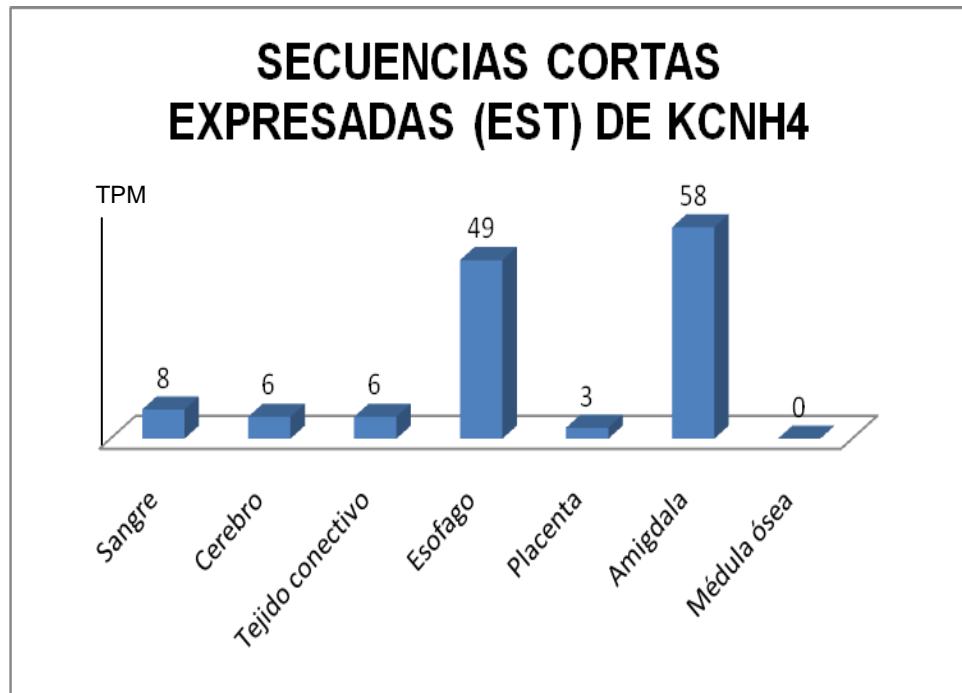


Fig.8. Northern electrónico de EST de KCNH4 en tejidos y órganos sanos, la cantidad expresada es en TPM (transcritos por millón).

- Asimismo, se revisó el perfil de expresión de *KCNH4* en diferentes tejidos neoplásicos en la misma base de datos del NCBI. En este caso, se puede observar que hay tejidos tumorales con expresión intermedia de *KCNH4* como: tumor esofágico, glioma, tumor neuroectodérmico primitivo. Con respecto a Leucemia, no existen reportes de la expresión de este gen en la base de datos analizada (Fig.9).

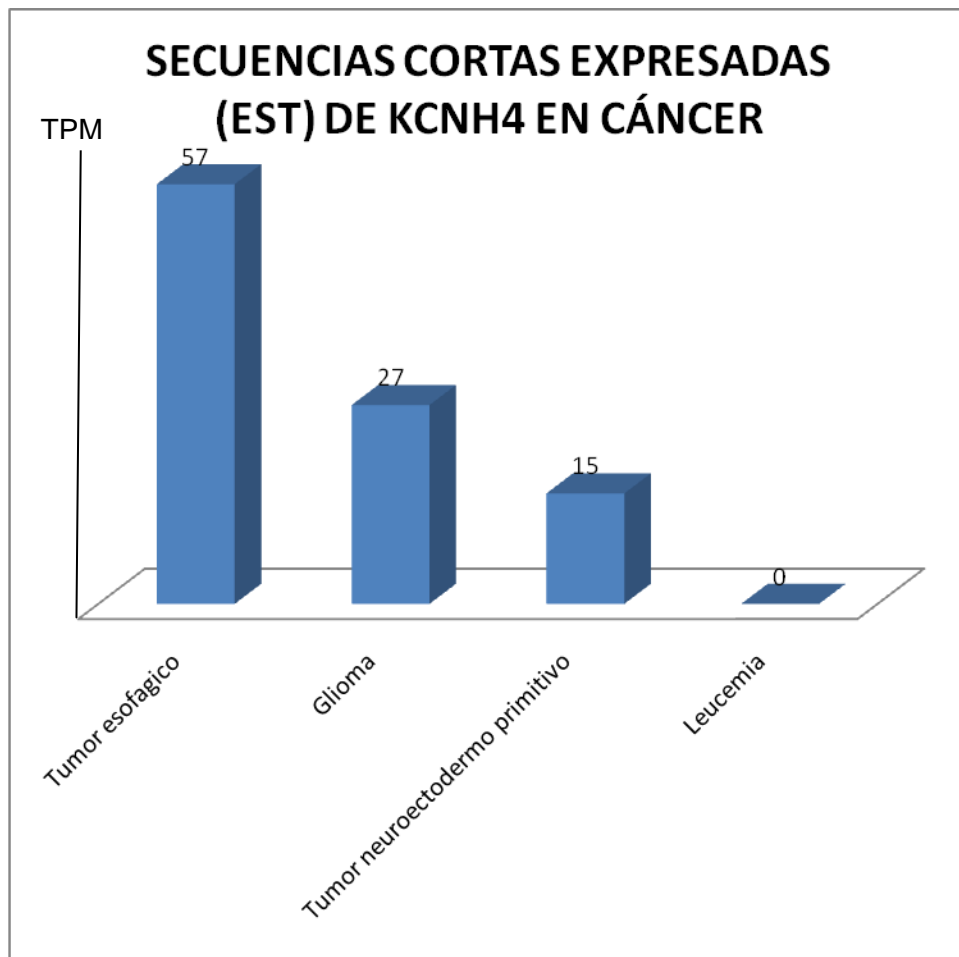


Fig. 9. Northern electrónico de EST de KCNH4 en diferentes tipos de cáncer.

## 7.2. MUESTRAS CLÍNICAS

Se obtuvieron en total 40 muestras con diagnóstico histológico de diferentes tipos de Leucemia (Tabla 12).

Tabla 12. Muestras clínicas de diferentes tipos de leucemia.

| <b>NO. DE MUESTRAS</b> | <b>TIPO DE LEUCEMIA</b>                     |
|------------------------|---|
| 14                     | <b>SÍNDROME MIELODISPLÁSICO (SMD)</b>       |
| 12                     | <b>LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)</b>      |
| 5                      | <b>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)</b>        |
| 2                      | <b>LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA CRÓNICA (LLC)</b> |
| 4                      | <b>LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)</b>   |
| 3                      | <b>LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA (LPA)</b>  |
| 40                     | <b>TOTAL</b>                                |

## 7.3. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN CONSTITUTIVO COMO CONTROL INTERNO

- Una vez obtenido el cDNA de las 40 muestras de Leucemia y de médula ósea normal, procedimos a estandarizar la amplificación del gen de  $\beta$ -actina humana mediante PCR en tiempo real (qPCR) usando SYBR Green. Este gen es constitutivo en todos los tejidos y se utiliza como control interno para normalizar los niveles de expresión del gen de interés y corroborar que el cDNA no presentara degradación. Este procedimiento sirvió para garantizar que el proceso de extracción se hubiera efectuado adecuadamente. Todas las muestras mostraron amplificación de este canal (Fig.10).

## 7.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN *KCNH4*

- Después de haber estandarizado la amplificación del gen constitutivo, se procedió a establecer las condiciones para la extensión, por qPCR, del gen *KCNH4*. Se muestra la pantalla del corrimiento de PCR en tiempo real de las muestras y sus curvas de amplificación (Fig.10).

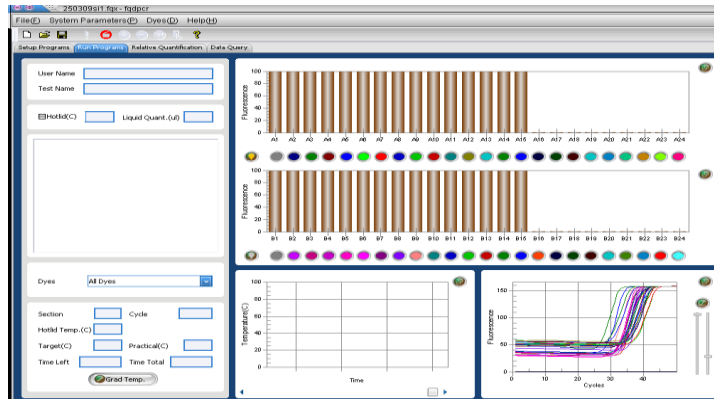


Fig.10. Detección de  *$\beta$ -actina humana* y *KCNH4* en las muestras de leucemia mediante PCR en tiempo real. Se muestra la pantalla del corrimiento de PCR en tiempo real y sus curvas de amplificación.

- De las 40 muestras, 32 (80%) fueron positivas para la amplificación de *KCNH4* y 8 muestras (20%) fueron negativas (Fig.11).

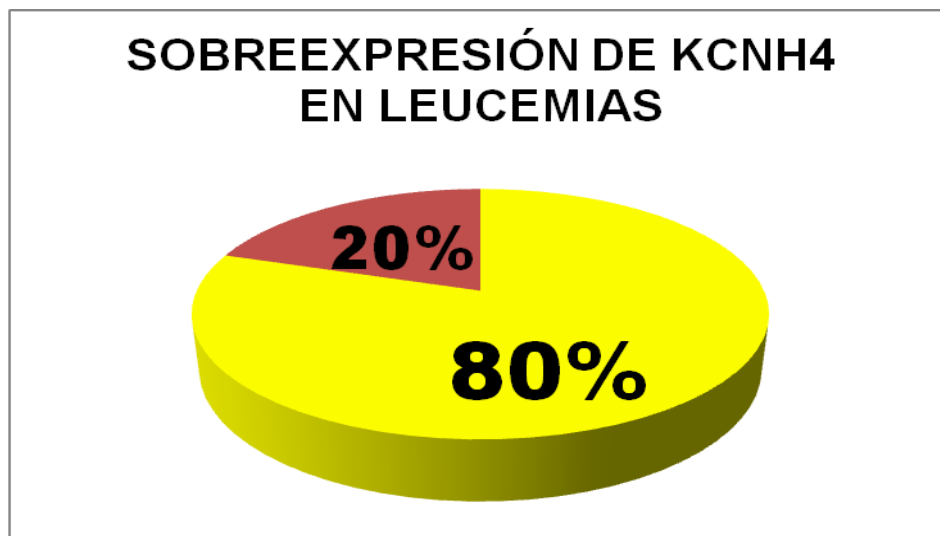


Fig.11 . Proporción de sobreexpresión de *KCNH4* en leucemias. 80% de las muestras de leucemias fueron positivas, mientras que el 20% fueron negativas.

El software fdq (BIOER) obtiene valores de fluorescencia relativa que se pueden comparar entre sí al transformar los datos de la fluorescencia emitida por los productos amplificados con los oligonucleótidos para *KCNH4* y  $\beta$ - actina humana de las muestras de Leucemias y del tejido médula ósea normal, los cuales son adquiridos por el sistema óptico del termociclador de tiempo real. A partir de estos datos se pueden observar, de manera gráfica, las 32 muestras de Leucemias con sobreexpresión de *KCNH4*. Las barras muestran los niveles de expresión relativa de las muestras tumorales contra los tejidos normales (T/N) (Fig.12).

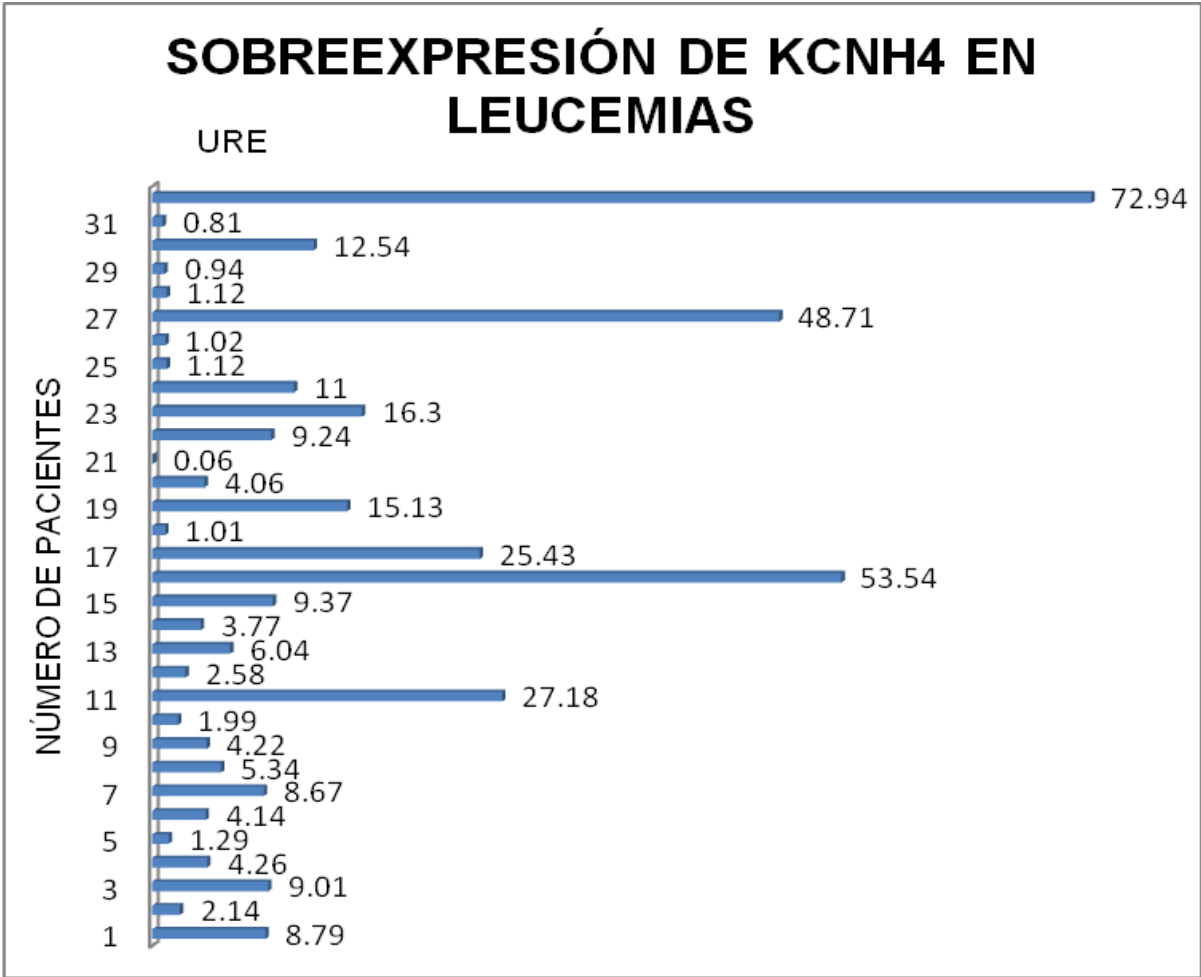
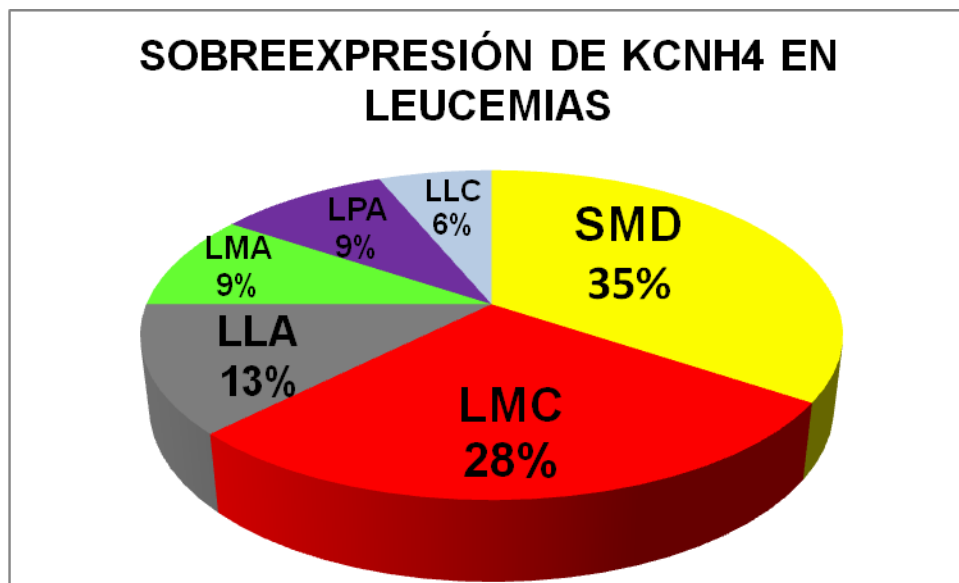


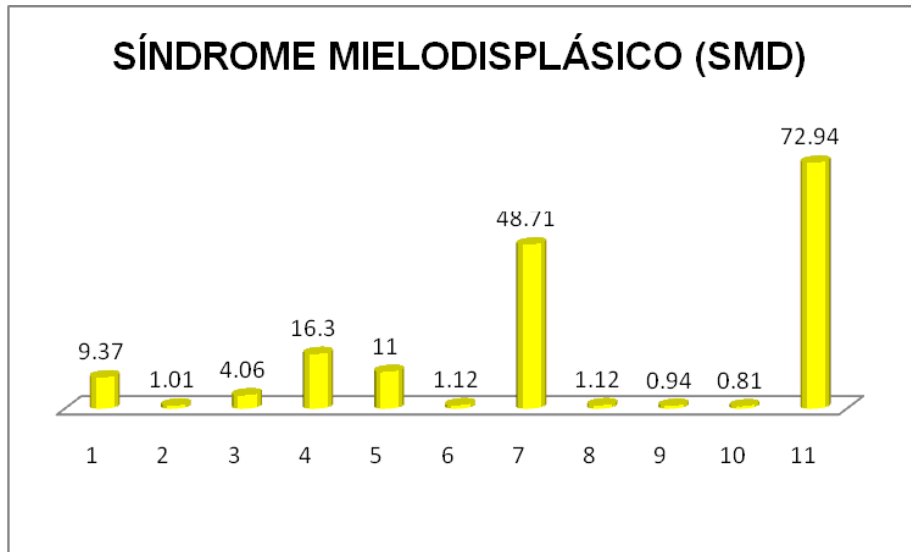
Fig .12. Gráfica con los niveles de sobreexpresión en PCR en tiempo real de *KCNH4* como T/N.

- De las 32 muestras con sobreexpresión de *KCNH4* por qPCR, 11 (35%) tuvieron el diagnóstico histológico de Síndrome mielodisplásico (SMD), 9 (28%) de Leucemia mieloide crónica (LMC), 4 (13%) a Leucemia linfoblástica aguda (LLA), 3 (9%) de Leucemia mieloide aguda (LMA), 3(9%) de Leucemia promielocítica aguda (LPA), 2 (6%) de Leucemia linfoblástica crónica (LLC). (Fig.13).



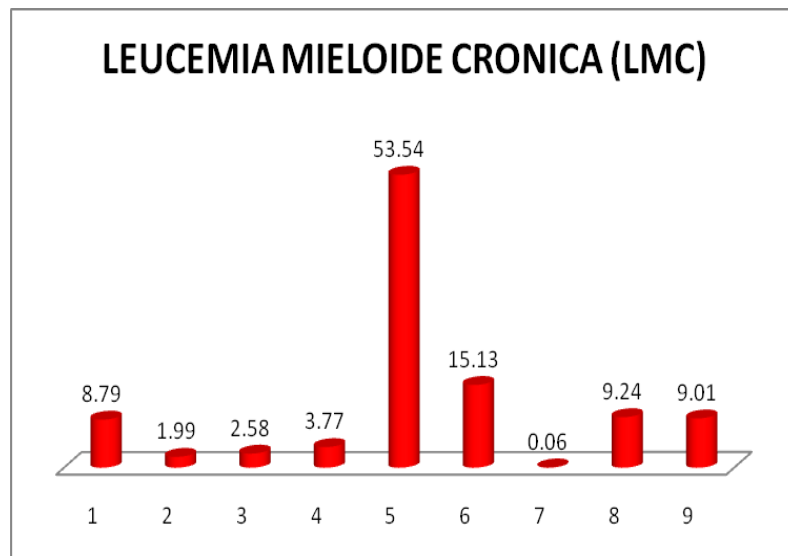
**Fig.13 . Distribución de las muestras con sobreexpresión de *KCNH4* por PCR en tiempo real de acuerdo al diagnóstico histológico SMD, LMC, LLA, LMA, LPA y LLC.**

- De las 11 (35%) muestras con diagnóstico histológico de Síndrome mielodisplásico, se observaron 2 muestras con niveles altos de sobreexpresión de *KCNH4* (48.71 y 72.94), 4 con niveles intermedios (9.37, 4.06, 16.3 y 11) y 5 niveles bajos (1.01, 1.12, 1.12, 0.94 y 0.81) (Fig.14).



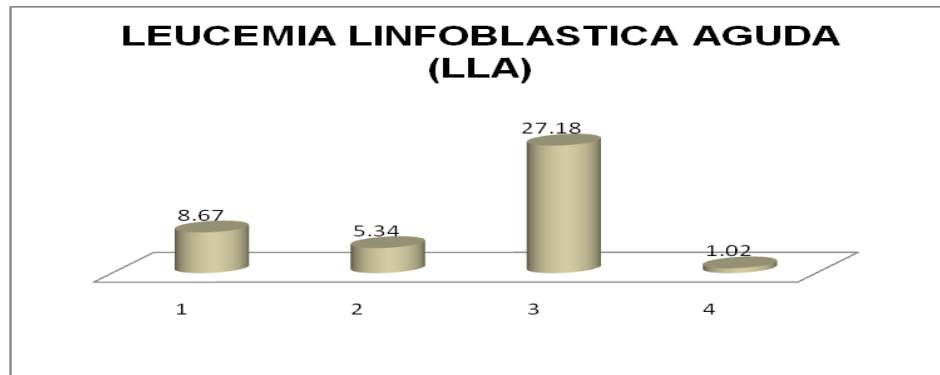
**Fig.14 . Sobreexpresión de KCNH4 en Síndrome mielodisplásico. De las 11 muestras los niveles de sobreexpresión van de altos (No.7 y 11), intermedios (No.1,3,4 y 5) y bajos (No.2,6,8,9 y 10).**

- De las 9 (28%) muestras con Leucemia mieloide crónica, se observaron 2 muestras con niveles altos de sobreexpresión (53.54 y 15.13), 3 con niveles intermedios (8.79, 9.24 y 9.01) y 4 con niveles bajos (1.99, 2.58, 3.77 y 0.06) (Fig.15).



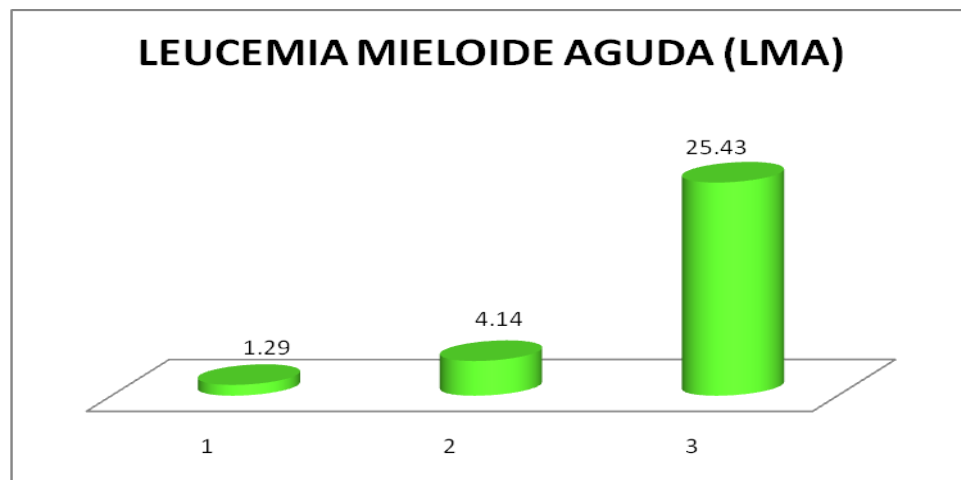
**Fig.15 . Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia mieloide crónica. Este tipo de leucemia presentó niveles de sobreexpresión alta (No.5 y 6), intermedio (No.1,8 y 9) y bajos (No.2,3,4 y 7).**

- De las 32 muestras, 4 (13%) tuvieron el diagnóstico histológico de Leucemia linfoblástica aguda. Se observó 1 muestra con nivel alto de sobreexpresión (27.18), 2 con niveles intermedios (8.67 y 5.34) y 1 con niveles bajos (1.02) (Fig.16).



**Fig. 16. Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia linfoblástica aguda. Los niveles de sobreexpresión fueron de alto (No.3), intermedio (No.1,2) y bajo (No.4)**

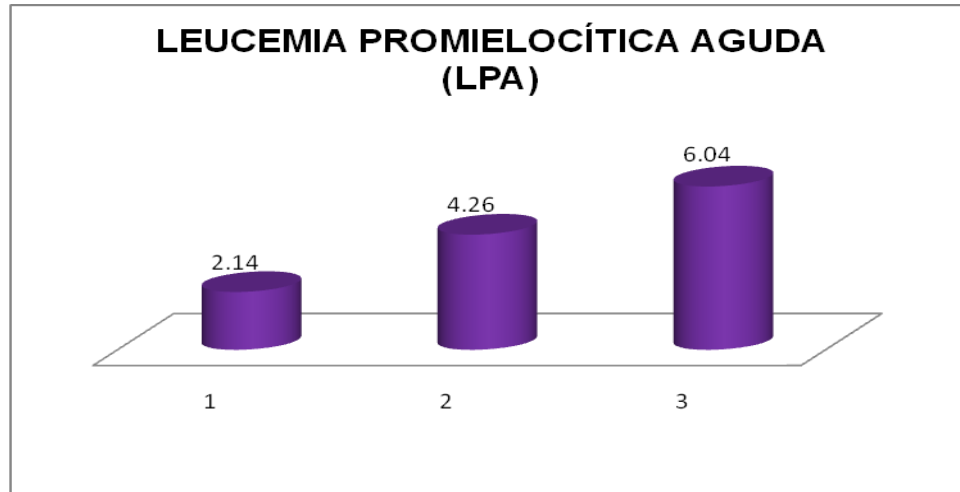
- De las muestras con sobreexpresión a KCNH4 3 (9%) tienen el diagnóstico histológico de Leucemia mieloide aguda (LMA). Se observó 1 muestra con nivel alto de sobreexpresión (25.43), 1 con nivel intermedio (4.14) y 1 con nivel bajo (1.29) (Fig.17).



**Fig.17 . Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia mieloide aguda. Una muestra presento nivel de sobreexpresión baja (No.1), otra mostro niveles de sobreexpresión intermedia (No.2) y la última mostro un nivel de sobreexpresión alto (No.3).**

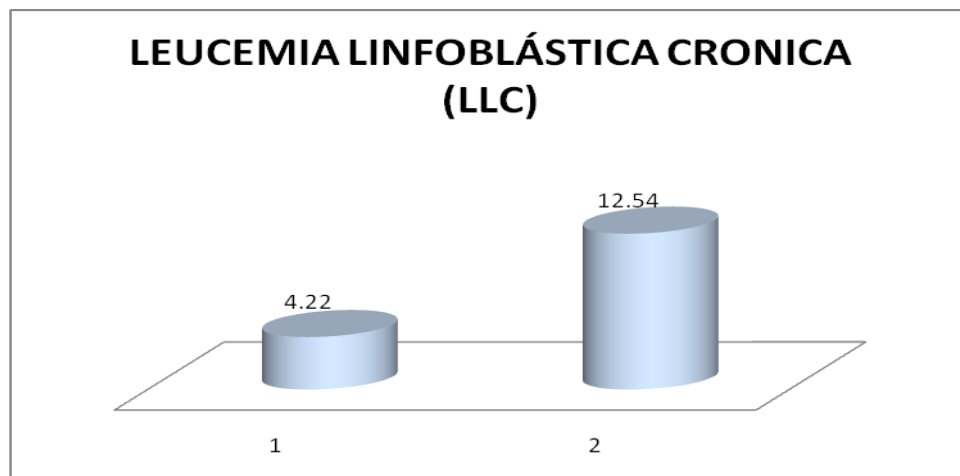


- De 3 (9%) de leucemia promielocítica aguda (LPA) también mostró sobreexpresión a KCNH4 siendo una variante de LMA . Se observaron las 3 dentro de nivel intermedio (2.14, 4.26 y 6.04) (Fig.18).



**Fig.18 . Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en Leucemia promielocítica aguda. En este tipo de leucemia las 3 muestras presentaron niveles de sobreexpresión intermedio, siendo esta variante de LAM.**

- También de las 32 muestras con sobreexpresión a KCNH4, 2 (6%) fueron de Leucemia linfoblástica crónica (LLC) (Figs.19).



**Fig. 19. Sobreexpresión de KCNH4 por PCR en tiempo real en leucemia linfoblástica crónica. Los niveles de sobreexpresión de una de las muestras fue de intermedia (No.1) y alta (No.2).**

Finalmente, la Tabla 13, resume los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, en la cual se pueden observar las frecuencias de las muestras de los diferentes tipos de leucemia analizados en las que se observó sobreexpresión de *KCNH4*.

**Tabla 13. Frecuencia de la sobreexpresión de *KCNH4* (*KCNH4+*).**

| <b>TIPO DE LEUCEMIA</b>                     | <b>NO. TOTAL</b> | <b>NO. <i>KCNH4</i> +</b> | <b>NO. <i>KCNH4</i> -</b> | <b>FRECUENCIA <i>KCNH4+</i> (%)</b> |
|---|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <b>SÍNDROME MIELODISPLÁSICO (SMD)</b>       | 14               | 11                        | 3                         | <b>78.6</b>                         |
| <b>LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)</b>      | 12               | 9                         | 3                         | <b>75</b>                           |
| <b>LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)</b>        | 5                | 3                         | 2                         | <b>60</b>                           |
| <b>LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA CRÓNICA (LLC)</b> | 2                | 2                         | --                        | <b>100</b>                          |
| <b>LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (LLA)</b>   | 4                | 4                         | --                        | <b>100</b>                          |
| <b>LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA</b>        | 3                | 3                         | --                        | <b>100</b>                          |
| <b>PORCENTAJE GLOBAL</b>                    |                  |                           |                           | <b>80%</b>                          |

## 8. DISCUSIÓN

---

En este estudio, se obtuvo información sobre el nivel de expresión del gen que codifica al canal iónico *KCNH4* en biopsias de médula ósea de pacientes con diferentes tipos de leucemias [Síndrome mielodisplásico (SMD), Leucemia linfocítica aguda (LLA), Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia mieloide crónica (LMC), Leucemia linfocítica crónica (LLC) y Leucemia promielocítica aguda (LPMA)] en comparación con muestras de médula ósea normal. Cabe mencionar que la expresión del gen *KCNH4* no ha sido reportada antes en relación a ningún tipo de cáncer- como marcador molecular. Hay reportes en los cuales *KCNH4*, también llamado BEC2 se ha usado como un anticuerpo anti-idiotípico que imita a GD3, que es un gangliósido que se expresa sobre la superficie de células tumorales. BEC2 ha demostrado ser seguro y estimula respuesta anti-GD3 dentro de pacientes con melanoma, lo que ayuda a que pacientes con SCLC presentaran una sobrevivida prolongada después de la terapia de inducción con la vacunación<sup>156</sup>.

En este estudio se pudo observar que el transcrito del gen *KCNH4* se sobreexpresaba en 80% del total de las muestras de los diferentes tipos de leucemias, obteniéndose un porcentaje de muestras con sobreexpresión de *KCNH4* desglosado de 78.6% para SMD, 75% para LMC, 60% para LMA y de 100% para LLC, LLA y LPMA. Esto sugiere que el gen *KCNH4* puede ser un biomarcador tumoral en las leucemias estudiadas, ya que aún cuando existen diferencias en la frecuencia de sobreexpresión entre unas y otras, la frecuencia menor es alta en comparación con otros marcadores de leucemias.

Otros genes que codifican a canales iónicos similares al estudiado en este trabajo de tesis se han reportado previamente como marcadores moleculares tumorales. Por ejemplo, el canal KCNH1 o EAG se ha encontrado en diferentes neoplasias como marcador diagnóstico como cáncer de mama, próstata, renal, colon, pulmon<sup>173</sup>, esófago, hepático, pancreático, y melanoma entre otros y como marcador temprano en cáncer cervical<sup>172</sup>. Es importante mencionar, que recientemente un grupo en Alemania reportó la sobreexpresión de EAG en LMA (40%), LMC (38%) y SMD (58%), aunque fue negativo en LLA y describieron su papel como marcador pronóstico en estas neoplasias<sup>174</sup>. Otro canal iónico que ha sido encontrado sobreexpresado en diferentes neoplasias es KCNH2 o HERG1, el cual se ha encontrado como marcador diagnóstico en cáncer de endometrio<sup>175</sup>, glioblastoma<sup>168</sup>, colon<sup>143</sup> y como marcador pronóstico de sobrevida corta en cáncer de esófago<sup>170</sup>, gástrico<sup>169</sup> y LMA<sup>176</sup> y LLA<sup>176</sup>. Es interesante mencionar que en el caso de las leucemias y en cáncer de mama, está presente una isoforma más corta del canal HERG1 (HERG1B) con una frecuencia de 78% para LMA y de 80% para LLA<sup>168</sup>. Estos datos son similares a los obtenidos en esta tesis, en donde se observó una frecuencia de KCNH4 de 60% en LMA y de 100% para LLA.

A pesar de que proteínas similares a la estudiada en este trabajo se han reportado como marcadores de Leucemias, ninguna ha sido encontrada en los seis tipos de leucemias analizados en este estudio, ya que en el estudio de Agarwal se encuentra sobreexpresión de EAG en LMA, LMC y SMD, no así en LLA<sup>174</sup>. Mientras, en el estudio de Pillozi se encontró a HERG1B sobreexpresado en LPMA y LLA<sup>177</sup>. En el presente estudio, encontramos sobreexpresión de *KCNH4* en SMD, LMC, LMA, LLC, LLA y LPMA. Es interesante resaltar que en este trabajo se utilizó RTPCR cuantitativa, la cual ha demostrado ser una técnica que tiene mayor sensibilidad que la RTPCR tradicional usada por Pillozi<sup>177</sup>. Además, interesantemente, KCNH4 pertenece a la misma familia de los genes EAG (KCNH1) y HERG1 (KCNH2). Esto nos sugiere que los miembros de esta familia

son genes que pudieran tener un papel importante en la carcinogénesis, más que ser eventos secundarios en el desarrollo del cáncer. Esto es algo que debe analizarse en un estudio posterior.

Un punto no abordado en este trabajo fue el análisis de *KCNH4* como un marcador pronóstico, tal como se ha hecho en los canales iónicos que previamente se han mencionado como marcadores tumorales (EAG y HERG1). Este es un aspecto muy importante que deberá abordarse en un futuro muy próximo para determinar si *KCNH4* tiene potencial como marcador pronóstico, de manera similar a los canales EAG y HERG1. Asimismo, el gen HERG1 se ha reportado su intervención la migración celular por la activación de FLT-1149 y su contribución a la malignidad al estimular la neoangiogénesis al promover la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), por lo cual lo proponen como un marcador de progresión tumoral<sup>178</sup>. Este es un punto que podría evaluarse para determinar la contribución de *KCNH4* en la migración celular y neoangiogénesis.

Por otro lado, la frecuencia de algunos métodos confirmatorios del diagnóstico de las leucemias es altamente variable en los diferentes tipos de leucemia. Por ejemplo, la alteración cromosómica característica (cromosoma Philadelphia) de la LMC presenta una frecuencia de 85%, mientras que este mismo rearrreglo tiene una frecuencia de 30% en la LLA, aunque es éste último tipo de leucemia se han encontrado por lo menos 18 alteraciones cromosómicas diferentes al cromosoma Philadelphia<sup>52</sup>. En la LMA, hasta el 65% de los pacientes con este tipo de leucemia presenta alteraciones cromosómicas, comprendiendo más de 7 diferentes translocaciones que generan sus correspondientes proteínas de fusión, así como incontables deleciones e inserciones<sup>40</sup>. En la LLC se han encontrado múltiples mutaciones, rearrreglos cromosómicos y deleciones. La implementación de la determinación de las mutaciones y de todas las técnicas citogenéticas típicas de

los diferentes tipos de leucemia, ya sea tradicionales o moleculares, no es una práctica de rutina en la mayoría de los laboratorios, debido a que consume mucho tiempo, es costosa y laboriosa, ya que hay que montar y estandarizar decenas de pruebas para la detección de diferentes proteínas de fusión y deleciones o inserciones. Por esto, la búsqueda de nuevos marcadores aún sigue vigente. Al haber encontrado una frecuencia elevada de sobreexpresión del gen *KCNH4* en diferentes leucemias, lo convierte en un posible marcador útil para estos tipos de neoplasia.

En resumen, este es el primer trabajo en el cual se reporta la sobreexpresión de *KCNH4* en diferentes tipos de leucemia. Esta es la primera vez que se describe un posible marcador tumoral diagnóstico que esté expresado en varios tipos de leucemia, ya que la mayoría de los marcadores de leucemias en uso están limitados a un tipo de leucemia. Esto hace que *KCNH4* pueda ser considerado un marcador de amplio espectro en el caso de leucemias. Este marcador está diferencialmente expresado en muestras de pacientes con leucemias en comparación con muestras de personas sanas. Por otro lado, el número limitado de muestras de los diferentes tipos de leucemia, hace mandatorio un estudio exhaustivo con un mayor número de muestras de cada leucemia para comprobar los datos obtenidos en este estudio.

Asimismo, es indudable que la expresión de *KCNH4* está afectada en Leucemias por lo que se debe de estudiar a fondo para determinar de qué manera afecta el proceso de carcinogénesis.

## 9. CONCLUSIONES

---

En las muestras de Leucemias, se observó la sobreexpresión de *KCNH4*. La frecuencia de expresión positiva a *KCNH4* en muestras de Leucemias fue de 80%.

El RNAm de *KCNH4* se sobreexpresa en tejido de Leucemia en comparación con médula ósea normal.

La frecuencia de expresión de las muestras positivas a *KCNH4* en Leucemias de acuerdo a su diagnóstico histológico fue: 11 (35%) muestras tuvieron el diagnóstico histológico de Síndrome mielodisplásico (SMD), 9 (28%) de Leucemia mieloide crónica (LMC), 3 (9%) de Leucemia mieloide aguda (LMA), 2 (6%) de Leucemia linfoblástica crónica (LLC), 4 (13%) de Leucemia aguda linfoblástica (LLA), y 3 (9%) de Leucemia promielocítica aguda.

Se concluye que el gen *KCNH4* puede considerarse un marcador tumoral en diferentes tipos de Leucemias.

## 10. PERSPECTIVAS

---

Es importante realizar experimentos que confirmen la sobreexpresión del transcrito de *KCNH4* en leucemias (hibridación *in situ*), la presencia aumentada de la proteína (inmunohistoquímica) y determinar el papel de *KCNH4* en la migración celular y neoangiogénesis. Así como realizar experimentos de inhibición de la expresión de *KCNH4* (con inhibidores específicos para *KCNH4* o RNAi) en varias líneas celulares de Leucemia y evaluar si hay una disminución en la proliferación. Sin embargo los experimentos realizados hasta el momento pueden sugerir que este gen sería un buen marcador molecular diagnóstico en Leucemias.

Es importante que se analicen los datos clínicos de los pacientes estudiados para determinar el valor de *KCNH4* como marcador molecular pronóstico.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000; 100(1): 57-70.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 2001.
3. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico (Dicciomed). <http://www.dicciomed.es/php/diccio.php?id=2786>.
4. Velpeau, A. 1827. Sur la resorption du pus et sur l'alteration du sang dans les maladies cliniques de persécution néennant. Premier observation. Rév. Méd. 2: 216.
5. Barth C. Altération du sang remarquable par la predominance des globules blanc ou musqueux, hypertrophie considerable de la rate. Bull Soc Med Hop. 1856 Paris.39.
6. Donné A. Cours de microscopie. J B Bailière. Paris.1844:132.
7. Virchow R. Weisses Blut. Notiz Geb Natur Heik.1845:36:152-156.
8. Bennett JH. Case of hypertrophy of spleen and liver in which death took place from suppuration of blood. Edinburgh Med Surg J.1845.64:413-23.
9. Craigie D. case of disease of spleen in wich death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. Edinburgh Med Surg J.1845:400-13.
10. Virchow R. Die Leukämie. 1856:190-211.
11. Friedreich N. Ein neuer fall von Leukämie. Virchow's Arch. Pathol Anat. 1857:12:37-58.
12. Neumann, E. 1878. Ueber myelogene Leukämie. Ber Klin Wochenschr 15: 69-72.

13. Stevens A. *Patology the Stevens*. Ed. Mosby. 2004:34-7.
14. Instituto Nacional De Estadística Y Geografía INEGI. *Estadísticas A Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer. Datos Nacionales*. 2008.
15. Juárez-Ocaña S, Mejía-Aranguré JM, Rendón Macías E, Kauffman-Nieves A, Yamamoto-Kimura LT, Fajardo-Gutiérrez A. Tendencia de seis principales causas de mortalidad en niños mexicanos durante el periodo 1971-2000. *La transición epidemiológica en los niños*. *Gac med Mex* 2003; 139:325-336.
16. Mejía-Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Paredes-Aguilera R, Flores-Aguilar H, Marínez-García MC. Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud Publica Mex* 2000;42:431-7.
17. Fajardo-Gutierrez A, Mejía-Aranguré M, Gómez Delgado A, Mendoza-Sánchez H, Garduño-Espinosa J, Martínez-García C. Epidemiología de las neoplasias malignas en niños residentes del Distrito Federal (1982-1991). *Bol med Hosp Infant Mex* 1995; 52:507-16.
18. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Aranguré JM, Hernández-Cruz L, Mendoza-Sánchez HF, Garduño-Espinosa J, Martínez-García MC. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Pan Am J Public Health* 1999;6:75-88.
19. Rizo RP, Sánchez CF, González RA, Betancourt CM, Meneses GA, Mohar A, Kuri MP. Mortalidad por leucemias en menores de 20 años. México 1998–2002. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2005. 62:9-18.
20. Draper GJ, Kroll ME, Stiller CA. Childhood cancer. (Trends in cancer incidence and mortality) *Cancer Surv* 1994;19:493-517.
21. Mangano JJ. A rise in the incidence of childhood cancer in the United States. *Int J Health Surv* 1999;29:393-408.
22. Mejía-Aranguré JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Farfán-Canto J, Ortiz-Fernández A, Martínez-García MC. Incidence trends of acute leukemia among the children of Mexico City:1982-1991. *Arch Med Res* 1996;27:223-7.
23. Fajardo-Gutiérrez A, Navarrete-Martínez A, Reynoso-García M, Zarzosa-Morales ME, Mejía-Aranguré M, Yamamoto-Kimura LT. Incidence of malignat neoplasm in children attending social security hospitals in Mexico City. *Med Pediatr Oncol* 1997;29:208-12.
24. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Aranguré JM, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Carreón-Cruz R et al. Epidemiología de las neoplasias malignas

- en niños derechohabientes del IMSS atendidos en los diferentes Centros Médicos del Instituto Mexicano del Seguro Social. En: García-peña MC, Reyes-Morales H, Viniegra-Velázquez L, editores. Las múltiples facetas de la investigación en salud: proyectos estratégicos del Instituto Mexicano del Seguro Social. México: Instituto Mexicano del Seguro Social:2001:221-40.
25. Mejía-Aranguré JM, Bonilla M, Lorenzana R, Juárez-Ocaña S, de Reyes G, Pérez-Saldivar ML et al. Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer*. 2005;5; 33.
  26. Landrigan PJ, Schchter CB, Lipton JM et.al.Environmental pollutants and disease in American children: estimates of morbidity, mortality and cost for lead poisoning, asthma, cáncer and developmental disabilities. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 721-28.
  27. Usmani GN. Pediatric oncology in the world. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 1-9.
  28. Parkin M, Stiller C. Childhood cancer in developing countries: environmental factors. *Int J Pediatr Hem Onc* 1995; 2: 411-17.
  29. Baron MH: Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol* 2003; 31:1160.
  30. Galloway JL, Zon LI: Ontogeny of hematopoiesis: Examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Bio* 2003; 53:139.
  31. Christy M: Active marrow distribution as a function of age in humans. *Phys Med Biol* 1981; 26:389.
  32. Babyn PS, Ranson M, McCarville ME: Normal bone marrow signal characteristics and fatty conversion. *Med Clin North Am* 1998; 6:473.
  33. Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81:2844.
  34. Harris NL, Jane ES, Diebold J, Flandrin G, Muller- Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of the hematologic malignancies report of the clinical advisory committee meeting. Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999,17:3835-49.

35. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al: Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21:759.
36. Colvin GA, Lambert JF, Moore BE, et al: Intrinsic hematopoietic stem cell/progenitor plasticity: Inversions. *J Cell Physiol* 2004;199:20.
37. Lichtman MA, Liesveld JL. *Acute Myelogenous Leukemia*. In: Lichtman M, Beutler E, Kaushansky K, Kipps T, Seligsohn U, Prchal J, editors. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill; 2007. p. 1047-1084.
38. Mejía JM, Ortega MC, Pérez ML, Flores J, Bernáldez R, Del Campo MA, et al. Tasa de Incidencia de Leucemia Aguda en niños de la Ciudad de México en 2006. *Rev Hematol*. 2007. 8(Supl. 3): 16-31.
39. Lichtman MA. Classification and Clinical Manifestations of the Clonal Myeloid Disorders. In: Lichtman M, Beutler E, Kaushansky K, Kipps T, Seligsohn U, Prchal J, editors. *Williams Hematology*. New York: McGraw-Hill; 2007. p. 1017-1028.
40. Sala ML, Blanco B, Pérez M, Pérez M. Hematología Clínica. En: Gamundi Planas MC. *Farmacia Hospitalaria-Tomo II*. España: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2002. p. 1031-1076.
41. Calasanz MJ. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2001;24: 17-30.
42. Liesveld JL, Bechelli J, Rosell K, Bridger G, Phillips G 2<sup>nd</sup>, Abboud CN. Effects of AMD3100 on transmigration and survival of acute myelogenous leukemia cells. *Leuk Res*. 2007;31; 1553-63.
43. Vizcarra Reyes F, Moreno SR, Darío R. Leucemia Aguda del Adulto. Hospital General de Medellín. *SCGA*. 2006;155. 1:1-7.
44. Stone RM, Mayer RJ. The unique aspects of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1990;8:1913-21.
45. Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. *Br J Haematol* 1999;106:591-613.

46. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment. *Semin Oncol.* 1997; 24:92-102.
47. Biondi A, Rovelli A, Cantu-Rajoldi A, Fenu S, et al. Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP). *Leukemia* 1994;8:1264-8.
48. Douer D, Preston-Martin S, Chang E, et al. High frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with AML. *Blood* 1996;87:308-13.
49. Almaguer-Gaona C, Cantú-Rodríguez OG, Hernández-Garza NE, Gómez-Almaguer D. Leucemia aguda. Observaciones epidemiológicas en el Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. *Medicina Universitaria* 1998;1:15-17.
50. Ruiz-Argüelles GJ. Promyelocytic leukemia in Mexican mestizos. *Blood* 1997;89:348-9.
51. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
52. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of Bcr-Abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-82.
53. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341:167-72.
54. Aurich J, Duchayne E, Huguet-Rigal F, Bauduer F, Navarro M, Perel Y, Pris J, Caballin MR, Dastugue N. Clinical, morphological, cytogenetic and molecular aspects of a series of Ph-negative chronic myeloid leukemias. *Hematol Cell Ther* 1998;40:149-58.
55. Heim S, Mitelman F. 1995. Molecular screening for new fusion genes in cancer. *Nat Genet* 2008;40:685-6.
56. Mitelman F, Levan G, Nilsson PG, Brandt L. Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976; 18: 24-30.
57. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer* 2001.

58. Johanson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002;107:76-94.
59. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia underlying disease progression. *Leukemia* 2002;16:1402-11.
60. Lisker R, Casas L, Mutchinick O, Pérez-Chávez F, Labardini J. Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1980;56:812-4.
61. Salles Manuel MT, Sobrevilla Calvo P, Guarner Lans J, Acosta Barreda MA, Reynoso E. Cytogenetic findings in chronic myelocytic leukemia and their prognostic correlation in patients of the National Institute of Cancer of Mexico. *Gac Med Mex*. 1994;130:1-6.
62. Rozman C, Montserrat E. Current concepts: Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-7.
63. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-34.
64. Ministerio de Salud. Guía Clínica Leucemia del Adulto. Santiago:Minsal, 2007.
65. Boogaerts MA, Verhoef GEG, Demuynech H. Treatment and prognostic factors in myelodysplastic syndromes. *Bailliere's Clin Haematol* 1996;9:161-83.
66. Radlond A, Thiede T, Hansen S, Carlsson M, Engquist L. Incidence of myelodysplastic syndromes in a Swedish population. *Eur J Haematol* 1995;54:153-6.
67. Williamson PJ, Kroger AR, Reynolds PJ, Hamblin TJ, Oscier DG. Establishing the incidence of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1994;87:743-5.
68. Gardner H, Haas OA. Experience in pediatric myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:655-71.
69. Marsden K, Challis D, Kimber R. Familial myelodysplastic syndromes with onset late in life. *Am J Hematol* 1995;49:153-6.
70. Fenaux P, Marel P, Lai JL. Cytogenetic of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996;33(2):127-38.

71. Cuzick J, Erskine S, Edelman D, Galton DA. A comparison of the incidence of the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia following melphalan and cyclophosphamide treatment of myelomatosis. *Br J Cancer* 1987;56:523-9.
72. Pedersen Bjergaard J, Phillip P. Balanced translocations involving chromosome band 11q 23 and 21q 22 are highly characteristic of myelodysplasia and leukemia following therapy with cytostatic agents targeting at DNA- Topoisomerase II. *Blood* 1991;78:1147-8.
73. Nissee C, Lorthers C, Dorp V, Eloy E, Haguenoer JM, Fenaux P. Exposure to occupational and environmental factor in the myelodysplastic syndromes. preliminary results of a case control study. *Leukemia* 1995;9:693-9.
74. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flendrin G, Galton DAG, Grainick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-99.
75. Kevides PA, Bennet JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Sem Hematol* 1996;33(2):95-110.
76. Fernández DN, Hernández RP. Síndrome mielodisplásico. *Biología y clínica. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 1999;16:5-20.
77. Haase D, Fonatsch C, Freund M, Wormann B, Bodenstein H, Bortels H, et al. Cytogenetic findings in 179 patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 1995;70:171-87.
78. Verhoef GEG, Boogaerts MA. Cytogenetics and its prognostic value in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol* 1996;95:95-101.
79. Linet MS. *The leukemias: Epidemiologic aspects.* Oxford: Oxford University Press; 1985:1123-84.
80. Wertheimer NW, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 1979;109:273-84.
81. Auvinen A, Linet MS, Hatch EE, Kleinerman RA, Robison L, Kaune WT et al. Extremely low-frequency magnetic fields and childhood acute lymphoblastic leukemia: an exploratory analysis of alternative exposure metrics. *Am J Epidemiol* 2000;152:20-31.

82. Kleiernerman RA, Kaune WT, Hatch EE, Wacholder S, Linet MS, Robison LL et al. Are children living near high-voltage power lines at increased risk of acute lymphoblastic leukemia? *Am J Epidemiol* 2000;151:512-15.
83. Savitz DA, Poole C. Do studies of wire code and childhood leukemia point towards or Hawaii from magnetic fields as the causal agent? *Bioelectromagnetics* 2001;5:69-85.
84. Greenland S, Sheppard AR, Kaune WT, Poole C, Kelsh M. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukemia. *Epidemiology* 2000;11:624-34.
85. Ross JA, Swensen AR. Prenatal epidemiology of pediatric tumors. *Current Oncology Reports* 2000;2:234-41.
86. Lord BI. Transgenerational susceptibility to leukaemia induction resulting from preconception, paternal irradiation. *Int Radiat Biol* 1999;75:801-10.
87. Mole RH. Ionizing radiations and human leukemia. En: Henderson ES, Ister TA, editors. *Leukemia Fifth edition*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990:253-69.
88. Miller RW. Special susceptibility of the child to certain radiation-induced cancers. *Environ Health Perspect* 1995;103:41-4.
89. Ansell P, Bull D, Roman E. Childhood leukaemia and intramuscular vitamin K: findings from a case-control study. *Br Med J*. 1996;313:204-205.
90. Little J. Lifestyle. *Epidemiology of childhood cancer*. Lyon, France: IARC Scientific Publications No.149. 1999:242-278.
91. Ross JA, Davis SM. Vitamin K prophylaxis and childhood cancer. *Med Ped Oncol* 2000;34:434-37.
92. Mejía-Arangur JM, Fajardo-Gutiérrez A, Flores-Aguilar H, Martínez-García MC, Salamanca-Gómez F, Palma-Padilla V et al. Environmental factors contributing to the development of childhood leukemia in children with Down's syndrome. *Leukemia* 2003;17:1905-7.
93. Van Duijn CM, Van Steensel-Moll HA, Coebergh JW, Van Zanen GE. Risk factors for childhood acute non-lymphocytic leukemia: An association with maternal alcohol consumption during pregnancy? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3:457-60.
94. Schwartzbaum JA, George L, Pratt CB, Davis B. An Exploratory study of environmental and medical factors potentially related to childhood cancer. *Med Ped Oncol* 1991;19:115-21.



95. Aplenc R, Lange B. Pediatric acute myeloid leukemia. En: Bast jr RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E, editors. *Cancer medicine*. Fifth edition. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2000:2151-6.
96. Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, Dodd HE. Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the inter-regional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *Br J Cancer*. 2001;84:141-6.
97. Schulte-Hobein B, Schwartz-Bickenbach D, Abt S, Plum C, Nau H. Cigarette smoke exposure and development of infants throughout the first year of life: influence of passive smoking and nursing on cotinine levels in breast milk and infant's urine. *Acta Paediatr*. 1992;81:550-7.
98. Infante-Rivard C, Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D. Parental smoking, CYP1A1 genetic polymorphisms and childhood leukemia (Québec, Canada). *Cancer Causes Control*. 2000;11:547-53.
99. Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000;96:24-33.
100. Bigbee WL, Day R, Grant S, Keohavong P, Xi L, Zhang L et al. Impact of maternal lifestyle factors on newborn HPRT mutant frequencies and molecular spectrum-initial results from the prenatal exposures and preeclampsia prevention (PEPP) study. *Mut Res* 1999;431:279-289.
101. Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Cancer* 1988;11:26-8.
102. Goldman LR. Children-Unique and vulnerable. Environmental risks facing children and recommendation for response. *Environ Health Perspect* 1995;103:13-8.
103. Kien CL. Nutrition and cancer. En: Lebenthal E, editor. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. Second edition. New York: Raven Press;1989:689-719.
104. Bunnin G, Kuijten R, Buckley J, Rorke L, Meadows A. relation between maternal diet and subsequent primitive neuroectodermal brain tumors in young children. *N Engl J Med*. 1993;329:536-41.
105. Desmeules M. Overview of the Canadian childhood cancer control program. *Chil Health*. 2000: 2nd world congress and exposition, Vancouver, Canada, May 30-June 3,1995; Concurrent conferences on hematology-Oncology. "Challenges in childhood cancer and blood diseases". *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:6.

106. Carr BI. Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. *Cancer* 1985; 55: 218-24.
107. Makinodan T, James SJ. Possible role of apoptosis in immune enhancement and disease retardation with dietary restriction and/or very low doses of ionizing radiation. En Hart RW, Neumann DA, Robertson RT, editors. *Dietary restriction: implications for the design and interpretation of toxicity and carcinogenicity studies*. Washington: ILSI Press. 1995:311-25.
108. Instantáneas. Tabaco y dieta. *Bol oficina Sanit Panam* 1992;112:539.
109. Birch J. Etiology of childhood cancer: Recent findings. *Child Health 2000: 2nd world congress and exposition, Vancouver, Canada, May 30-June 3, 1995; Concurrent conferences on hematology-Oncology: "Challenges in childhood cancer and blood diseases"*. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:5.
110. Willet WC. Nutrition and cancer. *Salud Publica Mex.* 1997;39:298-309.
111. Schepens PJC, Covaci A, Jorens PG, Hens L, Scharpé S, Van Larebeke N. Surprising findings following a Belgian food contamination with polychlorobiphenyls and dioxins. *Environ Health Perspect.* 2001;109:101-3.
112. Fajardo GA, Garduño EJ, Yamamoto KL, Hernández HD, Mejía AM, Farfán CJ et al. Risk factors associated with development of leukemia in children. *Arch Med Res.* 1992;23:213.
113. Fajardo-Gutiérrez A, Garduño-Espinosa J, Yamamoto-Kimura L, Hernández-Hernández DM, Mejía-Aranguré M, Gómez-Delgado A et al. Factores de riesgo asociados al desarrollo de leucemia en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1993;50:248-57.
114. Ross JA, Davies SM, Potter JD, Robison LL. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol Rev* 1994;16:243-72.
115. Campbell BM, Ferreiro CM, Tordecilla CJ, Joannon SP, Rizzardini LC, Rodríguez ZN. Leucemia linfoblástica aguda. Características al diagnóstico en 100 niños. *Rev Chil Pediatr.* 1999;70:70-85.
116. Foon KA, Todd RF: Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986;68:1-31.

117. Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol.* 2000; 37:320-33.
118. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258:818-21.
119. Nowell PC, Hugerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132:1497.
120. Rabbitts TH. Chromosomal translocation in human cancer. *Nature.*1994;372:143-9.
121. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 1997;278:1059-64.
122. Pane F, Frigeri M, Sindona L, Luciano F, Ferrara R, Cimino G et al. Neutrophilic-chronic myelogenous leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with c3a2 junction). *Blood.*1996;88:2410.
123. Wu SQ, Weinberg KI, Joo WJ, Quinn JJ, Franklin J, Siegel SE et al. Preponderant mitotic activity of nonleukemic cells plays an important role in failures to detect abnormal clone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:520-5.
124. Venegas P, Rivera J. Estudios citogénéticos en niños con Leukemia Linfocítica Aguda-B en Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 2004;52:551-8.
125. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zacarria A, Tassinari A, Serra A et al. New type of BCR-ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. 1990;76:1819.
126. Chisoe SL, Bodenteich YF, Wang YP, Wang YF, Burian D, Clifton SW et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics.* 1995;27:67.
127. Josefson D. New childhood leukaemia identified by gene chip technology. *Br Med J.* 2001;323:1388.
128. Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, Den Boer ML, Minden MD et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genet* 2002;30:41-47.

129. Hille Axons, ions and Dons. *Science*. 1992; 258(5079):144-5.
130. Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol*. 1995; 5: 268-77.
131. Mackinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-gated potassium channel. *Nature*. 1991; 350: 232-5.
132. Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev*. 1992; 72: 69-88.
133. Arcangeli A, Becchetti A, Cherubini A, Crociani O, Defilippi P, Guasti L et al. Physical and functional interaction between integrins and hERG potassium channels. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32: 826-37.
134. Wang GX, McCrudden C, Dai YP, Horowitz B, Hume JR, Yamboliev IA. Hypotonic activation of volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels in cultured PSMCs is modulated by SKG. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 533-44.
135. Wonderlin WF, Strobl JS. Potassium channels proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*. 1996; 154: 91-107.
136. Pardo LA, Del camino D, Sánchez A, Alves F, Brüggemann A, Beckh S, Stühmer W. Oncogenic potential of EAG K<sup>(+)</sup> channels. *EMBO J*. 1999; 18: 5540-7.
137. Mu D, Chen L, Zhang X, See LH, Koch CM, Yen C et al. Genomic amplification and oncogenic properties of the KCNK9 potassium channel gene. *Cancer Cell*. 2003; (3):297-302.
138. Ivanov DV, Tyazhelova TV, Lemonnier L, Kononenko N, Pestova AA, Nikitin EA et al. A new human gene KCNKG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3. *Lett*. 2003; 539: 156-60.
139. Li S, Gosling M, Poll CT, Westwick J, Cox B. Therapeutic scope of modulation of non-voltage-gated cation channels. *Drug Discov Today*. 2004; 9 (24): 1045-54.
140. Bubien JK, Keeton DA, Fuller CM, Gillespie GY, Reddy AT, Mapstone TB et al. Malignant human gliomas express an amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> conductance. *Am J Physiol*. 1999; 276: 1405-10.

141. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui P, Hill MA et al. Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem biophys.* 2002; 36: 41-66.
142. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002; 42: 283-323.
143. Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, Polvani S, Hofmann G, Witchel H et al. Herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 606-11.
144. Fraser SP, Salvador V, Manning EA, Mizal J, Altun S, Raza M et al. Contribution of functional voltage-gated Na<sup>+</sup> channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: lateral motility. *J Cell Physiol.* 2003; 195: 479-87.
145. Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> ion channel blockers. *J Neurosci.* 1999; 19: 5942-54.
146. Engeland B, Neu A, Ludwig J, Roeper J, Pongs O. Cloning and functional expression of rat ether-à-go-go-like K<sup>+</sup> channel genes. *J Physiol* 1998; 513:647-54.
147. Miyake A, Mochizuki S, Yokoi H, Kohda M, Furuichi K. New ether-à-go-go K<sup>+</sup> channel family members localized in human telencephalon. *J Biol Chem* 1999; 274: 25018-25.
148. Warmke J, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91: 3438-42.
149. Zou A, Lin Z, Humble M, Creech CD, Wagoner PK, Krafte D, Jegla TJ, Wickenden AD. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: 1356-66.
150. Akira M, Shinobu M, Hiromichi Y, Masanobu K, Kiyoshi F. New Ether-à-go-go K<sup>+</sup> Channel Family Members localized in Human Telencephalon. *The J Biol Chem.* 1999; 274: 25018-25.
151. Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 1990;13: 312-318.

152. Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science*. 1991; 252: 1560-2.
153. Giaccone G, Debruyne C, Felip E, Chapman BP, Grant SC, Millward M et al. Phase III Study of Adjuvant Vaccination With Bec2/Bacille Calmette-Guerin in Responding Patients With Limited-Disease Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23: 6854-64.
154. Chapman PB. Vaccinating against GD3 ganglioside using BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody. *Curr Opin Investing Drug*. 2003. 4; 710-5.
155. Chapman PB, Williams L, Salibi N, Hwu WJ, Krown SE, Livingston PO. A phase II trial comparing five dose levels of BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics GD3 ganglioside. *Vaccine*. 2004; 22: 2904-9.
156. Grant SC, Kris MG, Houghton AN et al. Long survival of patients with small cell lung cancer after adjuvant treatment with the anti-idiotypic antibody BEC2 plus Bacillus Calmette-Guerin. *Clin Cancer Res*. 1999; 5:1319-23.
157. Brezicka T, Bergman B, Olling S et al. Reactivity of monoclonal antibodies with ganglioside antigens in human small cell lung cancer tissues. *Lung Cancer*. 2000; 28;29-36.
158. Hanqing M, Avrova N, Mansson JE et al. Gangliosides and neutral glycosphingolipids of normal tissue and oat cell carcinoma of human lung. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 878: 360-70.
159. Ritter G, Ritter-Bloosfeld E, Adluri R et al. Analysis of the antibody response to immunization with purified O-acetyl GD3 gangliosides in patients with malignant melanoma. *Int J Cancer*. 1995; 62: 668-72.
160. McCaffery M, Yao TJ, Williams L et al. Immunization of melanoma patients with BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside: Enhanced immunogenicity when combined with adjuvant. *Clin Cancer Res*. 1996; 2: 679-86.
161. Nasi M, Meyers M, Livingston P, Houghton A, Chapman P. Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3. *Vaccine Res*. 1997;7:155-62.
162. Rodriguez GM, Rodriguez LW. PCR en tiempo real, Métodos físico-químicos en Biotecnología. IBT-UNAM 2006.

163. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific AND sequences. *Biotechnology*. 1992;10 (4): 413-7.
164. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification *Biotechniques*. 1997; 22: 130-8.
165. Valasek MA, Repa JJ. The power of real time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-9.
166. [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)
167. Börner T, Dürst M, Kemmner Wolfgang. Identification and Characterization of the Ion Channel TRPM8 in Prostate Cancer. 30.12.2003.
168. Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells. *Novartis Found Symp.* 2005; 266: 225-32.
169. Ding XW, Yang WB, Gao S, Wang W, Li Z, Hu WM et al. Prognostic significance of hERG1 expression in gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 2009; Epub ahead of print.
170. Ding XW, Luo HS, Luo Bing, Xu DQ, Gao S. Overexpression of hERG1 in resected esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *J Surg Onc.* 2008; 97: 57-62.
171. Hemmerlein B, Weseloh R, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez Araceli, Rubio M et al. Overexpression of Eag I potassium channels in clinical tumours. *Cancer Mol.* 2006; 5: 41-54.
172. Barajas LM, Bermudez D, Diaz L, Larrea F, Avila-Chavez E, Cadena A et al. Ether a go-go Potassium Channels as Human Cervical Cancer Markers. *Cancer Res.* 2004; 64: 6996-7001.
173. Hemmerlein B, Weseloh RM, Mello de Queiroz F, Knötgen H, Sánchez A, Rubio ME et al. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* 2006; 5:41.
174. Agarwal JR, Griesinger F, Stühmer W, Pardo LA. The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2010. 9:18.

175. Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*. 2000; 83: 1722-29.
176. Smith GA, Tsui HW, Newell EW et al. Functional up-regulation of HERG K<sup>+</sup> channels in neoplastic hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2000, 277: 18528-34.
177. Pillozi S, Brizzi MF, Balzi M et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia*. 2002; 16: 1791-8.
178. Pillozi S, Brizzi MF, Bernabei PA, Bartolozzi B, Caporale R, Basile V et al. VEGFR-1 (FLT-1),  $\beta$ 1 integrin and hERG K<sup>+</sup> channel form a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood* 2007; 110: 1238-50.



## A N E X O 1

---

### PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE RNA (RecoverAll™, Ambion)

#### DIGESTIÓN CON PROTEASA

Por cada muestra se le agregarón 400 µl de amortiguador de digestión (del kit comercial no está disponible su fórmula) y 4 µl de proteasa (del kit comercial no está disponible su fórmula) incubándose a 50° C por 3 horas.

#### AISLAMIENTO DE ÁCIDO NUCLÉICO

Posteriormente se agregó 480 µl de aditivo para aislar, más 1.1 ml de etanol al 100%. Se pipetearón 700 µl en un tubo nuevo con filtro, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos (eppendorf 5804R)), se decantó el fluido y se volvió a reinsertar el filtro dentro del mismo tubo. Se agregarón 700 µl de solución para lavar al filtro, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó el líquido y se reinsertó el filtro más 500 µl de solución para lavado, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó, se reinsertó el filtro de nuevo y se volvió a centrifugar por 30 seg a 10,000 rpm.

#### DIGESTIÓN CON NUCLEASA Y PURIFICACIÓN FINAL DEL ÁCIDO NUCLÉICO

A cada reacción se le agregarón 6 µl de amortiguador de DNAsa, 4 µl de DNAsa y 50 µl de agua libre de nucleasas dentro del filtro y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregarón 700 µl de solución de lavado en el filtro, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó por 30 segundos, se decantó el líquido filtrado y se reinsertó dentro del mismo tubo. Se agregarón 500 µl de solución para lavado en el filtro, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm, se decantó, se reinsertó el filtro a un tubo nuevo y aplicaron 30 µl de agua libre de nucleasas calentada a 95°C. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min, se centrifugó y aplicó una segunda alícuota de 30 µl. Se centrifugó de nuevo y los eluidos se almacenaron a -20 °C.

## A N E X O 2

---

### TÉCNICA PARA REALIZAR LA RETROTRANSCRIPCIÓN

Se utilizó un Kit para retrotranscripción de Promega.

RNA a una concentración 1µg con 50µg de “random hexamers” y permaneció en el termociclador a 70°C por 5 minutos, posteriormente estuvieron 5 min. en hielo.

Se usó el coctel para cada muestra:

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| 5x Amortiguador de RT       | 4µl   |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>     | 4µl   |
| Mezcla de DNTP a 10mM       | 1µl   |
| Inhibidor de RNAsa (40U/µL) | 0.5µl |
| Agua libre de nucleasa      | 4.5µl |
| Retrotranscriptasa          | 1µl   |

Las temperaturas programadas fueron: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos y 70°C por 15 minutos.

RT-PCR de invitrogen.

Para cada muestra lo siguiente a 65°C por 5 minutos.

|                            |      |
|----------------------------|------|
| 1µg RNA                    | 5µl  |
| Random Hexamers (50 ng/µL) | 2µl  |
| Mezcla de DNTP a 10mM      | 1µl  |
| Agua libre de nucleasa     | 2 µl |

1 minuto en hielo para después agregarle el siguiente coctel a cada muestra por 42°C por 2 minutos

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Amortiguador de RT a 10x    | 2 µl |
| MgCl <sub>2</sub> a 25mM    | 4 µl |
| DTT a 0.1M                  | 2 µl |
| Inhibidor de RNAsa (40U/µL) | 1 µl |
| Agua libre de nucleasa      | 2 µl |

Posteriormente se adicionó 1 µl de enzima retrotranscriptasa a cada reacción y se incubó a 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos y 1 minuto en hielo. Se agregó 1 µl de la enzima RNAsa H y las muestras se volvieron a colocar en el termociclador por 20 minutos a 37°C. Finalmente se almacenaron en el congelador a -20°C.

## A N E X O 3

---

### TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

La cantidad de Master Mix a preparar es el necesario para el número de reacciones que se van a trabajar, considerando un total de 25  $\mu$ l por reacción, cambiando solamente el cDNA correspondiente de cada muestra y el par de oligonucleótidos específicos ( $\beta$ -actina humana y KCNH4).

Los oligonucleótidos para  $\beta$ -actina humana fueron diseñados dentro del laboratorio de genética molecular.

Los oligonucleótidos para KCNH4 fueron diseñados a partir del artículo de Akira 1999<sup>150</sup>.

Para KCNH4 y para  $\beta$ -actina humana se preparó el coctel con 12.5 $\mu$ l Master Mix a 7mM, 1 $\mu$ l de oligonucleótido F, 1 $\mu$ l de oligonucleótido R (ambos a 20pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de cDNA, 8.5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 1 $\mu$ l de Syber Green.

El programa de PCR en tiempo real que se utilizó fue el siguiente:

2 minutos a 50°C, 15 minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y 4°C al infinito.

