

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Índice de Figuras.....	X
Índice de Tablas	XII
Índice de Apéndices.....	XIII
Resumen.....	1
Introducción	2
I. Leucemia mieloide aguda	2
I.1. Fisiopatología	2
I.2. Leucemias mieloides y linfoides.....	2
I.3. Incidencia.....	3
I.4. Presentación clínica	4
I.5. Patogenia.....	4
I.6. Tipos de clasificación	5
I.6.a. Clasificación FAB	
I.6.b. Clasificación OMS	
I.7. Diagnóstico	8
I.8 Pronóstico	10
I.9 Tratamiento.....	12
II. El gen <i>CEBPA</i>	13
II.1. Función y relación con la LMA.....	13
II.2. Estructura del gen	14
II.2.a. Estructura del mRNA	
II.2.b. Estructura de la proteína	
II.3. Mutaciones en el gen <i>CEBPA</i>	17
II.3.a. Localización y mecanismos	
II.3.b. Polimorfismos en el gen	
II.3.c. Frecuencias y mutaciones tipo somáticas y/o germinales	

II.3.d. Mutaciones bialélicas	
III. Mutaciones y translocaciones asociadas al pronóstico de la LMA.....	22
III.1 Translocación (15;17): (<i>PML/RARA</i>).....	22
III.2 Translocación (8;21): (<i>RUNX1/RUNX1T1</i>)	23
III.3 Inversión del cromosoma 16 (<i>CBFB/MYH11</i>).....	24
III.4 Mutaciones en <i>NPM1</i>	24
III.5 Mutaciones en <i>FLT3</i>	24
III.5.a <i>FLT3 ITD</i>	
III.5.b. <i>FLT3 D835X</i>	
III.6. Otras interacciones del gen <i>CEBPA</i>	26
IV. Utilidad de la detección de mutaciones como valor pronóstico	27
 Objetivos.....	 28
I. Objetivos Generales.....	28
II. Objetivos específicos	28
 Antecedentes	 29
I. Amplificación de <i>CEBPA</i>	29
II. Métodos de diagnóstico existentes.....	30
II.1 Secuenciación.....	32
 Desarrollo del Proyecto	 34
I. Material y Métodos.....	34
Parte 1. Extracción de RNA total y DNA genómico	
I.1. Inclusión y exclusión de muestras /recopilación de datos.....	34
I.2. Preparación de leucocitos	34

I.3.Extracción de RNA.....	35
I.4 Extracción de DNA	36
I.5 Cuantificación.....	36
Parte 2. Análisis de mutaciones y translocaciones asociadas al pronóstico de la LMA	
1.1.Translocaciones (RT-PCR).....	36
I.1.a. Fusión <i>PML/RARA</i>	
I.1.b Fusión <i>RUNX1/RUNX1T1</i>	
I.1.c Fusión <i>CBFB/MYH11</i>	
I.2 Mutaciones (por análisis de fragmentos)	39
I.2.a. <i>FLT3</i> ITD	
I.2.b. <i>NPM1</i>	
I.3. Mutaciones (RFLP-PCR): Mutación <i>FLT3</i> D835X	40
Parte III. Amplificación del gen de <i>CEBPA</i>	
Parte IV. Secuenciación	
I.1. Purificación de cada amplicón.....	41
I.2. Reacciones de secuenciación.....	41
I.3. Segunda purificación	42
I.4. Electroforesis capilar	42
Parte V. Análisis	
1.1 Parámetros a utilizar.	43
II. Resultados	44
II.1. Fenotipo inmunológico	44

II.2. Resultados de mutaciones y translocaciones asociadas al pronóstico de la LMA.....	50
II.3. Condiciones optimizadas para la amplificación de <i>CEBPA</i>	54
II.3.a Iniciadores utilizados	
II.3.b. Temperaturas optimizadas y reactivos utilizados	
II.3.c. Confirmación por RFLP	
II.5 Análisis comparativo de mutaciones y datos	66
III. Discusión	68
Conclusiones	74
Bibliografía	75
Apéndices.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Progenitores hematopoyéticos dependientes de <i>CEBPA</i>	13
2. Estructura del gen <i>CEBPA</i> y su mRNA.....	14
3. Dominios del gen <i>CEBPA</i> y algunas de sus interacciones	15
4. Estructura del cierre de leucina.....	16
5. Ejemplo de la activación del promotor por un factor de transcripción.....	16
6. Puntos donde comienzan a traducirse las isoformas.....	17
7. Propuesta de estudio diagnóstico y terapéutico en la LMA ajustado a los factores pronósticos, citogenéticos y moleculares	27
8. Representación esquemática de los iniciadores para secuenciación directa en <i>CEBPA</i>	29
9. Procedimiento de extracción de RNA por kit.....	35
10. Procedimiento de extracción de DNA por kit.....	35
11. Fotografía del corrimiento electroforético de la amplificación de <i>RUNX1/RUNXIT1</i>	50
12. Fotografía del corrimiento electroforético de la amplificación de <i>PML/RARA</i>	51
13. Análisis de fragmentos de <i>FLT3</i>	52
14. Análisis de fragmentos de <i>NPM1</i>	53
15. Amplificación de los 4 fragmentos de la sección codificante de <i>CEBPA</i>	57
16. Ilustración de la visualización de un heterodúplex por electroforesis	59
17. Heterodúplex observado por PAGE	59
18. Electroferograma superpuesto por mutación	60
19. Gen <i>CEBPA</i> subdividido en 5 regiones por sus dominios.....	60

20. Visualización de electroferogramas con SNPs localizados.	64
21. Gráfica circular con los porcentajes del perfil molecular de los pacientes.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación FAB de las LMA	6
2. Clasificación de la OMS para las LMA.....	8
3. Factores pronóstico de la LMA	11
4. Mutaciones y SNPs comunes localizados en la región codificante de <i>CEBPA</i>	19
5. Subtipos de mRNA encontrados en <i>CBFB/MYH11</i>	38
6. Módulo de corrida utilizado.....	43
7. Parámetros utilizados en el <i>Basecalling</i>	44
8. Fenotipo inmunológico. Características de las muestras y de los pacientes analizados (1-19).....	45
9. Fenotipo inmunológico. Características de las muestras y de los pacientes analizados (20-42).....	46
10. Descripción del fenotipo por citometría de flujo (Pacientes 1-19).....	47
11. Descripción del fenotipo por citometría de flujo (Pacientes 20-43).....	48
12. Perfil molecular integrado	54
13. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>CEBPA</i>	57
14. Temperaturas optimizadas para <i>CEBPA</i>	57
15. Mutaciones y SNPs localizados por secuenciación en el gen <i>CEBPA</i>	61
16. Cambios en la secuencia de aminoácidos por mutaciones.	63
17. Perfil molecular e inmunofenotípico de los pacientes con <i>CEBPA</i> mutado.....	67

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice	Página
1. Iniciadores utilizados en el primer ensayo de amplificación de <i>CEBPA</i>	85
2. Dos pares de iniciadores para la amplificación de <i>CEBPA</i>	86