



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República
Facultad de Medicina
Departamento de Genética



Departamento de Genética
Facultad de Medicina Universidad de la República

**“Implicancia pronóstica: delección 13q expandida a gen Retinoblastoma en
pacientes con Leucemia Linfoide Crónica”**

Monografía presentada en cumplimiento de la Unidad Curricular “Metodología científica II”

Grupo 47

Integrantes:

Br. Delia Angélica Salcedo Portocarrero

Br. Joana Stens Ramos de los Reyes

Br. Lisiane Tarouco da Rocha

Br. María Victora Lafarge Rivero

Br. Tamara Victoria Sarragúa Ortega

Br. Tatiana Sofia Nuñez Martínez

Tutoras:

Dra. Faride Uturbey

Dra. María Noel Spangenberg

Montevideo, Noviembre 2020

Índice

Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1 Leucemia linfoide crónica (LLC)	5
1.2 Clínica	5
1.3 Diagnóstico	5
1.4 Tratamiento y Pronóstico	6
1.5 Clasificación de Rai	6
1.6 Clasificación Binet	7
1.7 Presentación del problema	7
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo general	8
2.2 Objetivos específicos	9
3. Metodología	9
3.1 Materiales y métodos	9
4. Resultados	11
5. Discusión	14
6. Conclusión	17
7. Bibliografía	17
8. Agradecimientos	20
9. Anexos	21
Anexo I: Protocolo de FISH	21
Anexo II: Información para el paciente y consentimiento informado	23

Resumen

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en países occidentales y se trata de una enfermedad indolente, aunque en un subgrupo de pacientes se presenta con mayor agresividad, menor supervivencia y resistencia al tratamiento.

Uno de los factores pronósticos en LLC es la presencia de anomalías cromosómicas detectadas por hibridación in situ fluorescente (FISH). La delección del brazo largo del cromosoma 13 (del13q) es la más común y ocurre en un 50% de los pacientes. Se presenta como la única anomalía en el 14 al 45% de los mismos.

El tamaño de la delección puede ser en mínima; distal al centrómero que asocia a buen pronóstico, o grande; si se extiende al gen de retinoblastoma, teniendo mal pronóstico.

El trabajo propuesto pretende estudiar a los pacientes con LLC y del13q para indagar la relación entre el compromiso del gen RB1 y la evolución de la enfermedad.

Materiales y métodos

Se incluyeron pacientes con LLC y delección 13q aislada mediante técnica de FISH. Se utilizaron pellets citogenéticos almacenados en el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina - UdelaR. Se realizó FISH para valorar la presencia de delección del gen de retinoblastoma.

Se realizó un análisis retrospectivo de historias clínicas de la muestra para recolectar las variables evaluadoras del pronóstico que fueron contrastadas con la presencia o ausencia de RB1 y estudiar su posible relación.

Resultados y Conclusiones

Se obtuvo una muestra de nueve pacientes, subdividida en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia del gen RB1 mediante FISH. En las variables consideradas no se pudo establecer diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Se espera dejar información clínicamente relevante sobre las características encontradas en esta población que marquen un comienzo para otras investigaciones sobre el tema.

Palabras claves

Retinoblastoma - RB1 - leucemia linfocítica crónica - LLC - FISH - delección 13q.

Abstract

Introduction

Chronic lymphoid leukemia (CLL) is the most common leukemia in Western countries and it is an indolent disease, although in a subgroup of patients it presents with greater aggressiveness, lower survival rate and resistance to treatment.

One of the prognostic factors in CLL is the presence of chromosomal abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization (FISH). Deletion of the long arm of chromosome 13 (del13q) is the most common and occurs in 50% of patients. It is presented as the only anomaly in 14 to 45% of them.

The size of the deletion can be minimal; distal to the centromere associated with a good or great prognosis; if it extends to the retinoblastoma gene, having a poor prognosis.

The proposed work aims to study patients with CLL and del13q to establish the relationship between the involvement of the RB1 gene and the evolution of the disease.

Materials and methods

Patients with CLL with verification of the isolated 13q deletion using the FISH method were included. Cytogenetic pellets stored in the Department of Genetics of the Faculty of Medicine - UdelaR were used. FISH was performed to assess the presence of a deletion of the retinoblastoma gene.

A retrospective analysis of the sample's medical records was carried out to collect the prognostic evaluation variables that were contrasted with the presence or absence of RB1 and to study their possible relationship.

Results and Conclusions

A sample of nine patients was included, subdivided into two groups according to the presence or absence of the RB1 gene by FISH. No statistically significant differences could be established between the two groups in the variables considered. It is hoped to leave clinically relevant information on the characteristics found in this population that marks a beginning for further research on the subject.

Keywords

Retinoblastoma - RB1 - chronic lymphoid leukemia - CLL - FISH - 13q deletion.

1. Introducción

1.1 Leucemia linfoide crónica (LLC)

La leucemia linfoide crónica es una enfermedad que se enmarca dentro de los síndromes linfoproliferativos crónicos, de los cuales un 85% son de estirpe B y la LLC es la más frecuente y de mayor incidencia en países occidentales (30% de todas las leucemias). Se caracteriza por la acumulación de linfocitos morfológicamente maduros pero inmunológicamente incompetentes y fenotipo linfoide B.⁽¹⁾ Se manifiesta en torno a los 65-70 años, es más frecuente en el sexo masculino (2:1) y con incidencia familiar.⁽²⁾ En Uruguay, se presentan 4,3 casos por 100 mil habitantes anualmente.⁽³⁾

En esta patología hematológica, el clon neoplásico es un linfocito B maduro, pero bloqueado en una fase de diferenciación que impide su transformación en plasmocito, célula generadora de anticuerpos. A diferencia de otras leucemias, la LLC es “acumulativa”, ya que la enfermedad evoluciona con el acúmulo de linfocitos clonales en la médula ósea, pasando rápidamente hacia la sangre periférica y llegando a los linfonodos, bazo e hígado. Los pacientes se vuelven más propensos a contraer infecciones, ya que estos linfocitos neoplásicos no desarrollan competencia inmunológica. Además, los pacientes con LLC tienen mayor riesgo de padecer segundas neoplasias, hematológicas o no, sobre todo el cáncer de pulmón y gastrointestinal, independientemente de haber sido sometidos a algún tratamiento.⁽¹⁾

1.2 Clínica

Entre los elementos clínicos más frecuentemente evidenciados, se encuentran: el síndrome poliadenomegálico, fiebre, repercusión general, síndrome anémico y aumento en la frecuencia de infecciones.⁽¹⁾ En más de la mitad de los casos, el diagnóstico es el resultado de hallazgos paraclínicos, en individuos completamente asintomáticos, que se realizan un hemograma por otras razones.

1.3 Diagnóstico

El mismo se basa en tres pilares: hemograma, lámina periférica e inmunofenotipo (IFT) en sangre periférica (SP). El hemograma debe mostrar una linfocitosis absoluta $> 5.000/\text{mm}^3$ mantenida por al menos tres meses. La lámina periférica refleja la morfología característica de los linfocitos maduros: células pequeñas con citoplasma escaso, cromatina condensada y sombras nucleares de Gumprecht por fragilidad celular. El IFT en SP confirma el diagnóstico al

evidenciar la clonalidad de los linfocitos. El IFT típico informa una restricción para cadenas livianas kappa o lambda, inmunoglobulina de superficie (Igs) M/D tenue, CD20 + débil, CD19 +, CD22 +, CD79a +, **CD5** +, CD23 +, CD11c débil, CD200 +, CD43 +/-, ciclinaD1 -, CD10 -, FMC7 y CD79b negativos o débilmente positivos. Los mínimos requerimientos diagnósticos según el National Cancer Institute serían: linfocitosis en sangre periférica mayor a 5.000/mm³, junto al inmunofenotipo característico.⁽²⁾

1.4 Tratamiento y Pronóstico

Dada la heterogeneidad en el comportamiento de la LLC, se hizo necesario establecer criterios para protocolizar el inicio del tratamiento y establecer el pronóstico. Los indicadores de tratamiento, son mayormente clínicos (enfermedad sintomática), y dentro de los marcadores pronósticos, en la actualidad tiene un rol destacado el estudio citogenético (convencional e hibridación in situ fluorescente -FISH-).⁽⁴⁾

Otro marcador pronóstico relevante, es la mutación de la región variable del gen de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IGHV). En la práctica clínica, se utiliza un punto de corte de 2% para diferenciar pacientes con mutación para IGHV de los que no la presentan. De acuerdo a esto, aquellos pacientes que no presentan la mutación de IGVH se asocian con un peor pronóstico y una disminución marcada en la sobrevida, comparado con pacientes que presentan la mutación, los cuales tiene un mayor tiempo libre de progresión.⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Dentro de la valoración clínica, la estadificación pronóstica más importante es la de Rai y Binet. Aún en la actualidad, sigue siendo vigente por su fácil aplicación (examen físico y datos obtenidos del hemograma) y mantiene un impacto pronóstico.⁽⁷⁾

Se destacan marcadores biológicos que agregan valor predictivo a los sistemas de estadificación y cobran un rol fundamental para la valoración terapéutica y pronóstica, los más ampliamente utilizados en nuestro medio son la lactato deshidrogenasa (LDH) y la beta-2-microglobulina.⁽²⁾

1.5 Clasificación de Rai

Establece 4 estadios para LLC, aquellos que poseen un riesgo bajo, son clasificados con estadio 0 y se caracterizan por presentar una linfocitosis aislada. La mediana de supervivencia es 16 años y de 65% a los 10 años. Los estadios 1 y 2 se consideran de riesgo intermedio. El estadio 1 presenta linfocitosis y adenopatías, mientras que el estadio 2 linfocitosis más hepatomegalia y/o esplenomegalia. La mediana de supervivencia en estos dos grupos es de 8 años y de 45% a los 10 años. Los estadios 3 y 4 se consideran de alto riesgo. El estadio 3 se

caracteriza por tener linfocitosis y anemia (Hb <11g/dL), mientras que el estadio 4 presenta linfocitosis asociada a plaquetopenia (<100x10⁹/L). La mediana de supervivencia de estos pacientes es de 2,5 años y de 15% a los 10 años.⁽⁸⁾

1.6 Clasificación Binet

Clasifica a los pacientes con diagnóstico de LLC en: A, B y C. El estadio A se considera de bajo riesgo y se caracteriza por linfocitosis y menos de 3 áreas linfoides afectadas. En estos pacientes la mediana de supervivencia es de 15 años y de 65% a los 10 años. El estadio B o riesgo intermedio está caracterizado por linfocitosis y 3 o más áreas linfoides afectadas. La mediana de supervivencia es de 5 años y de 25% a los 10 años. El estadio C o de alto riesgo está caracterizado por pacientes con diagnóstico de LLC que a su vez presentan anemia (Hb <10 g/dL) y/o plaquetopenia (<100x10⁹/L). La mediana de supervivencia en este grupo es de 2,5 años y 15% a los 10 años.⁽⁸⁾

1.7 Presentación del problema

Debido a esta clínica heterogénea que no logra ser prevista con exactitud por los sistemas de estadificación clínica, sería pertinente investigar marcadores pronósticos, que podrían agregar valor predictivo a estos sistemas de estadificación. Así, por medio de la citogenética y de la técnica de FISH, se pudo evidenciar que las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas en la LLC son las siguientes: del 13q14 (55%), del11q22 (gen ATM) (18%), trisomía 12 (16%) y la del17p13 (gen P53) (7%).⁽⁹⁾ No existe una única anomalía cromosómica típica del LLC, sin embargo la presencia de determinadas alteraciones, modifican el pronóstico de la enfermedad, por ejemplo de la del11q y del17p, que le confieren peor pronóstico. Como se mencionó anteriormente, el curso clínico de esta patología y el rango de supervivencia es muy heterogéneo.⁽³⁾

La delección del brazo largo del cromosoma 13 (del 13q) es presentada como la única anomalía en entre un 14 al 45% de los pacientes.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, el valor de la delección 13q en su evolución no es completamente conocido. Si bien es considerada de manera general como de buen pronóstico, la experiencia clínica y algunos datos publicados como los de Hernandez et al⁽¹¹⁾; Van Dyke et al⁽¹²⁾ y Dal Bo et al⁽¹³⁾, sugieren que un subgrupo de estos pacientes, no tienen resultados favorables.

En el cromosoma 13, los puntos de ruptura son variables, lo cual genera delecciones de diferente tamaño, con pérdidas que van desde 300 kpb hasta > 70 Mpb. La región mínima deleccionada (minimal deleted región, MDR) está localizada en el locus 13q14.3, y es la que se

relaciona habitualmente como factor de buen pronóstico, utilizando la sonda de Vysis D13S319. Además de la MDR, se han identificado puntos de ruptura distales al gen del retinoblastoma (RB1) que contienen varios genes (entre ellos, DLEU1, DLEU2, TRIM13), así como los microARNs miR15a/16-1.⁽¹⁴⁾ El tamaño de la delección, según varios autores (Ouilllette et al.⁽¹⁵⁾; Mosca et al.⁽¹⁶⁾; Mian et al.⁽¹⁷⁾; Orlandi et al.⁽¹⁸⁾; Nava-Rodríguez et al.⁽¹⁹⁾; Puiggros et al.⁽²⁰⁾), se asocia con el pronóstico. Se han propuesto dos tipos de delección 13q: la delección tipo I (corta) no incluye al gen RB1, mientras que la delección tipo II (larga) que sí incluye al gen RB1. Este gen se encuentra en el locus 13q14. Se trata de un gen supresor tumoral, que codifica una fosfoproteína nuclear que tiene un rol central en el control de la proliferación celular. La delección tipo II se asocia con mayor complejidad genómica y evolución más agresiva con menor tiempo hasta el tratamiento y menor supervivencia global. Estos resultados, son consistentes con la función de RB1 en el control del ciclo celular y la estabilidad genómica.⁽¹⁵⁾ En un estudio de caso presentado por Nava-Rodríguez et al.⁽¹⁹⁾, se investiga la participación de la del 13q incluyendo al RB1 en procesos que pueden derivar en inestabilidad genómica, lo cual es un componente preponderante en la mayoría de los cánceres, y sugiere determinar de manera sistemática la presencia de del RB1 en pacientes portadores de LLC con del13q, dado que podría tratarse de un biomarcador de inestabilidad genómica más frecuente de los que se piensa. El RB1 está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad genómica, por lo que, su delección se relaciona con una amplia variedad de procesos aberrantes que afectan al ciclo celular normal.⁽¹⁹⁾

Ésto sugiere que se podrían identificar distintas poblaciones de riesgo dentro del grupo de buen pronóstico. Estudios como el de Yi et al.⁽²¹⁾ y Huang et al.⁽¹⁰⁾ buscaron correlacionar la evolución clínica en pacientes con LLC, que presentaban delección 13q14 asociada a RB1, pero sus resultados no fueron representativos e insisten en que se debe llevar a cabo una mayor investigación en el valor clínico de la delección asociada de dicho gen. En Uruguay no se ha evaluado el compromiso del gen RB1 en pacientes con LLC.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

- Investigar el rol de la delección 13q expandida al gen del retinoblastoma (RB1) en el pronóstico de pacientes con LLC y diagnóstico citogenético de delección 13q aislada.

2.2 Objetivos específicos

- Analizar si la delección 13q extendida al gen del retinoblastoma tiene relación con las características clínicas y paraclínicas pronósticas de los pacientes con LLC.
- Describir la muestra obtenida de acuerdo a las variables planteadas y analizar su relación con la presencia o ausencia del gen de retinoblastoma.
- Aplicar la sonda RB1 en el Laboratorio de Citogenética de la Facultad de Medicina de UdelaR por FISH.

3. Metodología

3.1 Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico y retrospectivo sobre muestras de pacientes que tengan diagnóstico de LLC y del 13q, buscando si presentan o no la alteración en el gen del retinoblastoma, correlacionando con su evolución clínica. Fueron reclutados todos los pacientes con diagnóstico de LLC y delección 13q registrados en el Laboratorio de Diagnóstico Citogenético del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, UdelaR y del servicio de hematología del Hospital Maciel. El período de tiempo estipulado para la recolección de muestras almacenadas fue de 5 años (2016 - a la fecha). Se consideraron pacientes con delección 13q en el estudio FISH, sin ninguna otra alteración, tanto en el estudio citogenético como FISH. Los criterios de inclusión fueron: pacientes con diagnóstico confirmado de LLC y la presencia de delección 13q aislada. Se utilizaron como criterios de exclusión la presencia de otras alteraciones genéticas que no impliquen el cromosoma 13. La presencia de otras mutaciones podrían dar lugar a sesgos en los resultados.

Se solicitó la autorización de los pacientes seleccionados mediante un consentimiento informado. Debido al estado de emergencia sanitaria decretado el 13 de Marzo del presente año en Uruguay por la pandemia COVID-19⁽²²⁾, no se recogieron las firmas de los pacientes en forma presencial. Se contactó por vía telefónica con los mismos para presentación y explicación sobre el estudio. Este contacto telefónico duró 15 minutos aproximadamente. Se les envió el consentimiento vía email para ser leído y firmado, si estuvo de acuerdo. Debí escanearlo para mandarlo vía email a los investigadores.

Una vez obtenido el consentimiento, se extrajeron los datos evolutivos de la historia clínica y se recolectaron los pellets (células fijadas y criocongeladas) almacenados de los pacientes, que se encuentran almacenados en tubos Eppendorf (1,5ml), en el Laboratorio de

Citogenética del Hospital Maciel y de la Facultad de Medicina. Una vez obtenidas las muestras se procedió a realizar la técnica FISH (ver anexo I) para valorar la presencia o ausencia de la delección del gen de retinoblastoma. La sonda para RB1 utilizada fue *Vysis LSI 13 (RB1) 13q14 SpectrumOrange Probe*, la cual marca con fluorescencia naranja la posición del gen dentro del cromosoma 13. Esta sonda no posee control. Patrón normal: dos señales naranjas dentro de un núcleo. Patrón de compromiso: una señal naranja dentro de un núcleo. El *cut off* utilizado para el conteo de núcleos fue de 5%. Se analizaron 200 núcleos por paciente, mediante dos observadores independientes.

Se contó con una muestra inicial de catorce pacientes. Se excluyeron cinco por: no obtener el consentimiento, no presentar señal en el preparado de FISH y/o poseer otra patología hematológica concomitante.

Para el procesamiento de las imágenes capturadas por el microscopio de fluorescencia, se utilizó el programa ImageJ.

La recolección de datos a partir de las historias clínicas consistió en el estudio retrospectivo de las variables determinantes de pronóstico. Estas fueron:

- Edad al diagnóstico
- Sexo
- Estadio Rai y Binet
- Tiempo de duplicación linfocitaria
- LDH al diagnóstico y al último control
- Beta-2-microglobulina al diagnóstico y al último control
- Plaquetas al diagnóstico y al último control
- Hemoglobina al diagnóstico y al último control
- Tiempo libre de progresión. Definido como el tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio de la progresión de la enfermedad
- Tratamientos anteriores
- Tiempo hasta el primer tratamiento. Definido como el tiempo desde el diagnóstico hasta la iniciación del primer tratamiento

Éstas fueron contrastadas con la presencia o ausencia de la delección del gen del retinoblastoma (RB1).

Para la recolección y análisis de datos, se utilizaron los programas Excel, Jasp y Graphpad Prism, realizando para las variables cuantitativas el test de Student para muestras independientes y para las variables cualitativas el test exacto de Fisher. Para evaluar el tiempo

hasta el primer tratamiento, se utilizó la estimación de supervivencia de Kaplan-Meier y el modelo de Mantel-Cox (test Log-Rank). Se consideró un nivel de significancia de 0,05.

Dado que se trató de una investigación que implica seres humanos, todos los procedimientos fueron realizados al aval del comité de ética de Facultad de Medicina, UdelaR, una vez aprobado el protocolo de investigación por dicha institución.

4. Resultados

Se incluyeron nueve pacientes con diagnóstico de LLC y con delección 13q aislada. Se obtuvieron dos grupos: los que presentaban delección RB1 y los que no: Grupo sin delección RB1 (grupo sin delRB1) (n=6) y Grupo con delección RB1 (grupo con delRB1) (n=3). Se capturaron imágenes representativas de dicha técnica que se observa en la Imagen 1 y Imagen 2.

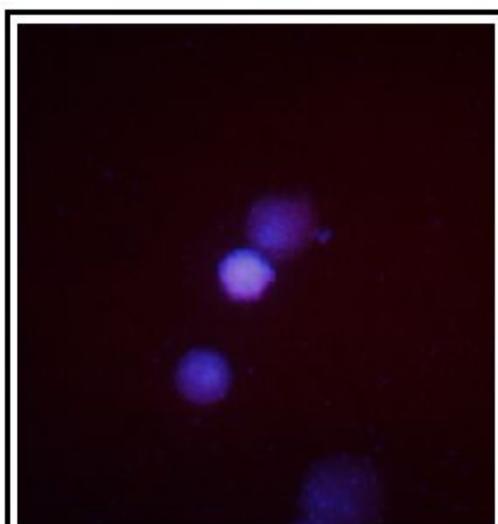


Imagen 1. Fotografía de lámina de paciente n°3. Se observa una fluorescencia de la sonda RB1 (naranja) en núcleos teñidos con DAPI. Este patrón es compatible con delección heterocigota del gen de retinoblastoma.

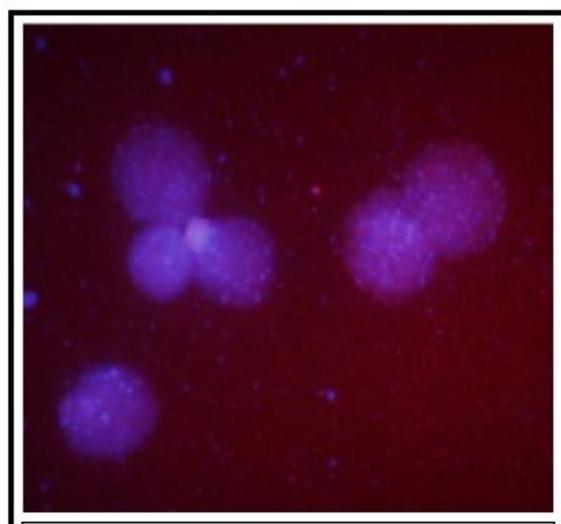


Imagen 2. Fotografía extraída de lámina de paciente n°1, donde se observan 6 núcleos teñidos con DAPI, y en su interior se observa solo una señal naranja, compatible con delección heterocigota de RB1. Este paciente presentó un 60% de delección en los núcleos analizados.

Los datos se resumen en la Tabla 1.

La edad media al diagnóstico en la muestra estudiada fue de 62,78 años, mientras que en el grupo sin delRB1 fue de 64,17 años y en el grupo con delRB1 se obtuvo una media de 60 años. En cuanto a la proporción hombres/mujeres, se encontró una relación de 7/2.

El estadio Rai/Binet al diagnóstico fue mayormente bajo/intermedio: siete pacientes del total de la muestra tuvieron estadio bajo/intermedio, en contraste con dos pacientes que

presentaron un Rai/Binet alto. En cuanto a los grupos, de los seis pacientes del grupo sin delRB1, cuatro tuvieron un estadio bajo/intermedio, mientras dos presentaron un Rai/Binet alto. En el grupo con delRB1, los tres pacientes tuvieron un estadio bajo/intermedio. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (valor p 0,5).

Con respecto a la duplicación linfocitaria, del total de la muestra se obtuvo que: cinco tuvieron una duplicación en menos de 1 año, siendo tres pacientes del grupo sin delRB1 y dos pacientes del grupo con delRB1, mientras que cuatro pacientes presentaron duplicación linfocitaria mayor a 1 año, siendo tres de ellos pertenecientes al grupo sin delRB1 y un paciente del grupo con delRB1, con un valor p no significativo (igual a 1)

Se observaron valores medios de hemoglobina en el total de la muestra de 12,84 g/dL al diagnóstico y de 13,58 g/dL al último control. Al analizar los valores de ambos grupos, se percibe que el grupo sin delRB1 tenía un promedio de 12,52 g/dL y 13,18 g/dL al diagnóstico y al último control, respectivamente, mientras el grupo con delRB1 presentó un promedio de hemoglobina al diagnóstico de 13,96 g/dL y al último control 11,27 g/dL. Con respecto a los valores plaquetarios, se observó que el promedio total fue de 146,2 ($\times 10^9/L$) al diagnóstico y 135 ($\times 10^9/L$) al último control. En el promedio del grupo con delRB1 tenía 182.3 ($\times 10^9/L$) al diagnóstico y 138 ($\times 10^9/L$) al último control. El grupo sin delRB1 presentó cifras de 128 ($\times 10^9/L$) al diagnóstico y 133.5 ($\times 10^9/L$) al último control. Sin embargo, ninguna de estas variables presentó diferencias significativamente entre ambos grupos.

En cuanto al valor de LDH, el promedio global fue de 260 U/L al diagnóstico y 233 U/L al último control. El grupo sin delRB1 presentó 292,83 U/L al diagnóstico y 216,67 U/L al último control. El grupo con delRB1 presentó 194 U/L al diagnóstico y 265,67 U/L al último control. Por último, los valores de beta 2 microglobulina globales fueron 2,98 mg/L al diagnóstico y de 3,55 mg/L al último control. En el grupo con delRB1, los valores fueron de 2,45 mg/L al diagnóstico y de 4,17 mg/L al último control. En el grupo sin delRB1, fueron de 3,25 mg/L al diagnóstico y de 3,24 mg/L al último control. Para ambos valores de actividad tumoral, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

En consideración al tiempo libre de progresión, se encontró una tendencia global a la evolución de la enfermedad después del año, dado que de los nueve participantes, siete se comportaron de esta forma. Se observa que en el grupo sin delRB1, de los seis individuos, uno progresó antes del primer año de diagnóstico, mientras que los otros cinco, evolucionaron después. En tanto que, el grupo con delRB1, de los tres individuos, uno progresó antes del año, mientras que dos lo hicieron después del año del diagnóstico. Con respecto a si hubo tratamiento previo al último control, se constata que, en el conjunto total de participantes, cuatro no tuvieron

tratamiento previo, mientras que cinco sí lo tuvieron. Dentro del grupo sin delRB1, se registró que cuatro de los seis participantes no presentaron tratamiento previo. Cabe destacar que, en el grupo con delRB1, la totalidad de participantes presentó tratamientos previos. Ninguna de las dos variables estudiadas tuvieron diferencias estadísticamente significativas (valor p de 1 y 0,167 respectivamente).

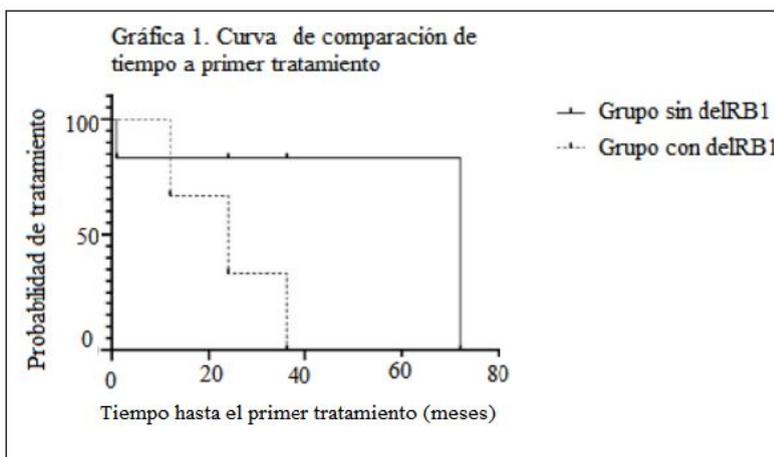
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes				
Características	Total N=9	Del 13q aislada N=6	Del 13q ext. RB1 N=3	Valor P
Sexo F/M	2/7	1/5	1/2	1
Edad al diagnóstico	62,78 (9,43)	64,17 (9,58)	60 (10,44)	0,568
Rai - Binet al diagnóstico				0,5
Bajo/Intermedio	7	4	3	
Alto	2	2	0	
Duplicación linfocitaria				1
Menor a 1 año	5	3	2	
Mayor a 1 año	4	3	1	
Paraclinica al diagnóstico				
Hb (g/dL) media	12,84 (3)	12,52 (3,15)	13,96 (0,85)	0,473
Plaquetas ($\times 10^9/L$) media	146,2 (80,726)	128,1 (86,03)	182,3 (68,04)	0,377
LDH (U/L) media	260 (76,44)	292,83 (67,93)	194 (45,51)	0,06
β -2- μ g (mg/L) media	2,98 (1,02)	3,25 (1,18)	2,45 (0,14)	0,292
Paraclinica al último control				
Hb (g/dL) media	13,58 (2,23)	13,18 (2,15)	11,27 (4,1)	0,373
Plaquetas ($\times 10^9/L$) media	135 (54,518)	133,5 (68,15)	138 (16)	0,916
LDH (U/L) media	233 (95,28)	216,67 (46,83)	265,67 (168,62)	0,373
β -2- μ g (mg/L) media	3,55 (0,91)	3,24 (0,58)	4,17 (1,27)	0,163
Tratamientos anteriores				0,167
Ausentes	4	4	0	
Presentes	5	2	3	
Tiempo libre de progresión				1
Menor a 1 año	2	1	1	
Mayor a 1 año	7	5	2	

F: femenino; M: masculino; LDH: lactato dehidrogenasa; β -2- μ g: b2 microglobulina; Hb: hemoglobina

En siete pacientes a quienes se les estudió el perfil mutacional de IgVH se vio que cinco de siete tenían un perfil mutado. Dentro del grupo con delRB1, solo un paciente contaba con este estudio, resultando en IgVH mutado. En el grupo sin delRB1, cuatro pacientes presentaban IgVH mutado mientras que dos pacientes no. De los dos pacientes con IgHV no mutado, uno de ellos debutó al diagnóstico con un estadio Rai-Binet alto.

	Grupo sinRB1	Grupo con delRB1
Con mutación de IGVH	4	1
Sin mutación IGVH	2	
No se realizó estudio		2

El tiempo hasta el primer tratamiento se encuadra en la Gráfica 1. A fin de esclarecer diferencias significativas entre ambos grupos, se realiza una comparación entre las curvas (tabla 3), obteniendo un valor p de 0,0751, por lo tanto, no significativo. Se obtuvieron cuatro observaciones censuradas pues no han presentado el evento de interés hasta el final del estudio.



Log-Rank Test	
Chi Cuadrado	3,169
Grado de Libertad	1
Valor P	0,0751

5. Discusión

Los objetivos primordiales de este estudio consistieron en pesquisar las características clínicas y paraclínicas de los participantes portadores de LLC, divididos en dos grupos de interés, los portadores de delección 13q no extendida y extendida al gen de RB1. Se hizo énfasis en las variables que rutinariamente son utilizadas en la práctica clínica para valorar la progresión y sobrevida de dicha enfermedad.

En el presente estudio se encontraron diversos obstáculos que significaron un gran impedimento para la realización de las distintas fases del estudio. La emergencia sanitaria por la

pandemia de COVID19 ocasionó que el reclutamiento de pacientes se viera afectada, dado que los mismos son inmunodeprimidos y, en consecuencia, la obtención de muestras nuevas se vio impedida. Por lo tanto, solo se pudo acceder a muestras citogenéticas almacenadas que permanecen por un período de 5 años, generando la reducción de participantes del estudio. Otros factores cruciales que desencadenaron este resultado fue la gran variabilidad clínica, generando en muchas personas un gran período asintomático. Los análisis citogenéticos se encuentran centralizados en Montevideo, lo que condiciona el estudio y seguimiento adecuado de muchos pacientes. El tamaño muestral del estudio fue menor al esperado, y esto se vio reflejado en los resultados arrojados por los test estadísticos utilizados.

Otro obstáculo que se presentó en la investigación fue no poder obtener todos los datos de IgVH, ya que el estudio no se realiza en todas las instituciones de forma rutinaria. Se enfatiza en la necesidad de realizarlo, debido a que es un marcador pronóstico inalterable en el tiempo a diferencia de los otros marcadores que pueden oscilar.

En la muestra estudiada se encontró un promedio de 33% de deleciones extendidas al gen del retinoblastoma. Un porcentaje similar ha sido descrito por Puiggros et al⁽²⁰⁾ en una muestra de 25 pacientes, donde encontró un 32% de deleción extendida al RB1, en contraste con el estudio realizado por Ouillate et al.⁽¹⁵⁾, con un tamaño muestral mayor, que obtuvo un promedio de aproximadamente un 20%. A pesar de que en el presente estudio se trabajó con un número muestral reducido, se llegó a resultados similares que en estudios con mayor número de pacientes.

De acuerdo a la bibliografía, la proporción de hombres/mujeres con diagnóstico de LLC es de 2/1.⁽¹⁾ En el presente estudio, se encontró una incidencia similar, con evidente predominio en el sexo masculino (relación 7/2). Según Yamamoto⁽²³⁾, existe un predominio en el sexo masculino, a pesar de variar en distintos países. Pinto Neto⁽²⁴⁾ comparó la incidencia en los EUA y Europa, donde la proporción entre hombres y mujeres es de aproximadamente 6 hombres para 3 mujeres. Del mismo modo, se encontró que la edad media al diagnóstico fue concordante con otros estudios que obtuvieron un promedio de 65-70 años.⁽¹⁰⁾ Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para las variables sexo y edad, ya que el valor-p obtenido fue de 1 y 0,568, respectivamente.

En cuanto a la estadificación clínica de Rai y Binet, se sabe que predicen el riesgo de los pacientes con LLC y orientan la decisión terapéutica. Teniendo en cuenta que éste no logra precisar el pronóstico de un paciente con LLC de manera individual, muchos estudios agregan marcadores clínicos y biológicos en las investigaciones con fines de aumentar el valor predictivo al sistema de estadio.⁽¹⁰⁾⁽²⁰⁾ Ésto se tomó como base para elegir las variables del

estudio. En esta cohorte, el 77,8% de los participantes presentaron un estadio Rai-Binet al diagnóstico de bajo a intermedio, lo que se aproxima a resultados obtenidos por Huang et al.⁽¹⁰⁾, con 96% en una muestra de 248 participantes. Ouillette et al⁽¹⁵⁾, obtuvo valores de Rai entre grupo sin o con delRB1, bien balanceados, no encontrando diferencias significativas entre ambos, resultado similar al presente estudio, como puede verse en la Tabla 1, con un valor p de 0,5. En el estudio realizado por Yi et al⁽²¹⁾, en el cual comparan grupos con deleciones 13q cortas y largas, no encuentran significancia estadística entre los estadios Binet de ambos.

Con respecto a las variables paraclínicas, se compararon en ambos grupos la hemoglobina, plaquetas y parámetros humorales de carga tumoral (lactato deshidrogenasa y beta 2 microglobulina) tanto al diagnóstico como al último control, los cuales no presentaron valor p significativo. Ésto es similar a los resultados establecidos por Yi et al⁽²¹⁾, con un tamaño muestral de 203 pacientes. Haciendo referencia a la muestra presente en este estudio, cabe destacar que al tratarse de grupos pequeños, el potencial del test se ve afectado, lo que impulsa a siguientes investigaciones al respecto. A pesar de no tener resultados estadísticamente significativos, los datos obtenidos en esta investigación siguen una tendencia similar a estudios de mayor tamaño muestral.

Otro parámetro que toma relevancia en la valoración de los pacientes portadores de LLC es el estado mutacional de la región variable de cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgVH).⁽⁵⁾ Se obtuvieron estos datos de siete de los nueve pacientes totales. Un paciente del grupo con delRB1 presentó la mutación, mientras que del grupo sin delRB1 cuatro son mutadas. Ouillette et al⁽¹⁵⁾ encontró resultados más balanceados entre ambos grupos con una relación de IgVH no mutada de 29% contra 32%, teniendo en consideración que incluyeron un mayor número de pacientes.

A fin de establecer parámetros que evidencian la progresión de la enfermedad, se tomó como base el estudio del tiempo al primer tratamiento, en ambos grupos, obteniéndose la gráfica 1 y su comparación estadística. Este estudio no encontró cambios en la progresión de la enfermedad entre los grupos establecidos. Estos resultados fueron comparables con la investigación de Huang et al⁽¹⁰⁾, el cual no encontró diferencias en la sobrevida global ni en el tiempo al primer tratamiento en ambos grupos. Estos mismos resultados fueron observados por Yi et al⁽²¹⁾. Sin embargo, la investigación realizada por Ouillette et al⁽¹⁵⁾, evidenció una menor sobrevida al estudiar 255 pacientes portadores de delRB1. Por lo tanto, aún son contrapuestos los resultados obtenidos en diferentes análisis, lo que denota la necesidad de futuras investigaciones para obtener resultados más precisos y universales.

Además, Huang et al⁽¹⁰⁾ observó el impacto en el pronóstico de sobrevida y sobrevida sin tratamiento en pacientes que presentaron 60% o más núcleos con del13q. Esto podría ser objeto de futuras discusiones.

6. Conclusión

Finalmente, a pesar de que no se establecieron relaciones significativas entre las variables pronósticas analizadas y la delección de RB1, este trabajo muestra resultados con tendencia similar a estudios de tamaño muestral superiores. Si bien no se puede rechazar la hipótesis nula, el compromiso de RB1 amerita ser estudiado con mayor profundidad. Se espera dejar información clínicamente relevante sobre las características de esta población, en base a la muestra estudiada, que marque un comienzo para investigaciones futuras.

Como perspectivas a largo plazo, puede ser de gran utilidad implementar el estudio de la delección de retinoblastoma en la práctica clínica. A su vez, el compromiso de este gen puede ser objeto de nuevas investigaciones con cultivos celulares simples o clastogénicos a fin de estudiar la fragmentación genética, y por ende, la inestabilidad genómica.

7. Bibliografía

1. San Miguel JF, Sánchez-Guijo FM. Hematología: manual básico razonado. 3ª ed. Madrid, España: ELSEVIER; 2009. Vol. n°1.
2. Isaurralde H, Stevenazzi M, Nese M, Gabus R, et al. Pautas de Diagnóstico y Tratamiento en Hematología: Consenso Nacional de Leucemia Linfocítica Crónica. [Internet]. Montevideo, Uruguay; 2005 [Acceso el 16 mayo 2020]. Disponible en: http://www.shu.com.uy/images_hematologia/socios/consensos/leucemialinfoidecronica_definitivo2.pdf
3. Sociedad de Hematología del Uruguay. Presentación Datos Registro año 2018. [Internet]. Asamblea SHU; agosto 2020. [Acceso el 20 de octubre 2020]. Disponible en: http://www.shu.com.uy/images_hematologia/info_util/registro_leucemias/DATOS_REGISTRO_2018.pdf

4. Vasconcelos Y. Marcadores de pronóstico na leucemia linfocítica crónica. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2005; 27 (4): 253-256
5. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999 Sep 15; 94 (6):1848-54.
6. Tobin G, Thunberg U, Laurell A, Karlsson K, Aleskog A, Willander K, Söderberg O, Merup M, Vilpo J, Hultdin M, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. Patients with chronic lymphocytic leukemia with mutated VH genes presenting with Binet stage B or C form a subgroup with a poor outcome. *Haematologica.* 2005 Apr; 90 (4): 465-9.
7. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019 Nov; 94 (11): 1266-1287
8. Sans-Sabrafen J, Besses Raebel, C, Vives Corrons, JL. *Hematología Clínica.* 5ª ed. Madrid: ELSEVIER; 2006
9. Liehr T. Characterization of RB1 Deletions in Interphase and Metaphase by Molecular Cytogenetics Exemplified in Chronic Lymphatic Leukemia. *Methods Mol Biol.* 2018; 1726:1-6.
10. Huang, SJ, Gillan TL, Gerrie AS, et al. Influence of Clone and Deletion Size on Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with an Isolated Deletion 13q in a Population-Based Analysis in British Columbia, Canada. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 2016 Jan; 55 (1): 16–24.
11. Hernandez, JA, Rodriguez AE, Gonzalez M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica.* 2009 Mar; 94 (3): 364–371
12. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al. 2010. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010 Feb; 148 (4): 544–550
13. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011; 50 (8): 633–643
14. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma.* 2013 Nov; 54 (11): 2351-2364.

15. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov; Vol 17 (21): 6778-6790.
16. Mosca L, Fabris S, Lionetti M, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res.* 2010; 16 (23): 5641–5653
17. Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, et al. Del(13q14.3) length matters: An integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematol Oncol.* 2012 Mar; 30 (1): 46–49
18. Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C, et al. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematol Oncol.* 2013; 31 (3): 136–142
19. Nava-Rodríguez MP, Domínguez-Cruz MD, Aguilar-López LB, et al. Genomic instability in a chronic lymphocytic leukemia patient with monoallelic deletion of the DLEU and RB1 genes. *Molecular Cytogenetics.* 2019; 12 (2)
20. Puiggros, Anna, Venturas M, Salido M, et al. Interstitial 13q14 Deletions Detected in the Karyotype and Translocations with Concomitant Deletion at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia: Different Genetic Mechanisms but Equivalent Poorer Clinical Outcome. *Gen, Chrom & Cancer.* 2014; 53 (9): 788–797
21. Yi S, Li H, Li Z, et al. The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study. The Japanese Society of Hematology. *Int J Hematol.* 2017 Sep; 106 (3): 418-425.
22. Decreto N° 93/020 promulgado el 13 de marzo del año 2020. Declaración de Estado de Emergencia Nacional Sanitaria como consecuencia de la Pandemia originada por el virus COVID-19 (Coronavirus). Normativas de avisos legales en Uruguay. IMPO. [Acceso el 10 de oct 2020]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/93-2020>
23. Yamamoto M, Figueiredo Vera LP. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2005; 27 (4): 229-232
24. Pinto Neto JV. Investigação de alteraç es citogenéticas relacionadas a leucemia linfóide cr nica familiar por meio da técnica de análise cromoss mica por microarranjo.

[Tese Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia] Universidade Católica de Brasília – DF; 2013.

8. Agradecimientos

Agradecemos en primer lugar al Departamento de Genética de la Facultad de Medicina por prestarnos el laboratorio, materiales y los recursos necesarios para realizar la investigación. A nuestras tutoras; Faride Uturbey y María Noel Spangenberg por su disposición y aprendizajes adquiridos. También agradecer a los Dres. Vanina Silva, Viviana Díaz y Nicolás Dell’Ocra y Sebastián Machado.

A su vez, a la Cátedra de Métodos Cuantitativos y al docente Santiago Mansilla por su ardua dedicación al brindar su tiempo para enseñar y ayudarnos en las dificultades presentadas durante el transcurso de la investigación.

Finalmente, al Sector de Hematología del Hospital Maciel, y en particular a la Dra. Ana Inés Landoni por su apoyo durante este proceso. También agradecer a Jorge Souto y Analía Sanguinetti del equipo del Servicio de Hematología.

9. Anexos

Anexo I: Protocolo de FISH

1) Preparación de extendidos

- Sacar tubos eppendorf del freezer y dejarlos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Resuspender el contenido con pipeta Pasteur y traspasar su contenido a un tubo Falcon (14ml).
- Centrifugar a 2500rpm durante 10 min.
- Quitar el sobrenadante sin absorber el pellet. Añadir 1.5 -2 ml de solución 3:1 (3 partes de Metanol y 1 parte de Ácido Acético), según pellet.
- Lavar los portaobjetos a utilizar con Alcohol 70 y rotularlos con el número correspondiente a cada paciente.
- Realizar los extendidos mediante 2 gotas de pellet con pipeta Pasteur.
- Observar calidad del extendido: presencia de núcleos y sin suciedad.
- Poner a envejecer las láminas en plancha a 90°C por 30 minutos.

1) Preparación de Reactivos

Utilizar kit comercial (Dako) y sondas comerciales (Vysis) utilizando diluciones de las mismas en aquellas que sea necesario.

- Tampón de lavado: Diluir 1/20 en agua destilada. (solución 1).
- Formaldehído 37%: Diluir 5ml en 45 ml de solución tampón de lavado
- Alcoholes: Preparar tres soluciones de alcohol, 70%, 90% y 100%
- Tampón astringente: Diluir 1/20 en agua destilada (solución 2).

Día 1

1. Sumergir las láminas en formaldehído 37% durante 2 min.
2. Traspasar las láminas a un koplín con solución 1 y dejarlas durante 5 min.
Repetir este paso en solución 1 nueva 5min.
3. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% 2 min en cada uno.
4. Dejar secar en posición vertical.
5. Hibridizar con la sonda correspondiente. En oscuridad.
6. Cubrir las láminas con cubreobjetos.

7. Programar el HyBrite: desnaturalización a 82° C durante 5 min, hibridación a 45° C de 14-20 horas.

8. Colocar las láminas y correr el programa.

Día 2

Todos los pasos deben realizarse en oscuridad.

1. Preparar 2 koplín con solución 2.

2. Colocar uno de ellos en baño a 65° C.

3. Retirar las láminas de Hybrite y sumergirlas en koplín con solución 2 (a temperatura ambiente) el tiempo necesario para que se desprendan los cubreobjetos.

4. Sumergir las láminas en koplín a 65° C durante 10 min.

5. Traspasar las láminas a koplín con solución 1 durante 4 min a temperatura ambiente. Repetir en solución 1 nueva durante 4 min.

Lol6. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% durante 2 min en cada uno.

7. Dejar secar en posición vertical.

8. Aplicar 5 µl de DAPI (marcador fluorescente para teñir células)

9. Guardar láminas en freezer durante 24 hrs.

10. Observar láminas al microscopio.

Anexo II: Información para el paciente y consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado participante, usted ha sido invitado a participar del estudio *“Implicancia pronóstica de la delección 13q expandida a gen de Retinoblastoma en pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoide Crónica”*. Este proyecto de investigación se desarrolla en el marco de la asignatura “Metodología Científica II” que llevan a cabo estudiantes de 6° año de Medicina para la realización de su Monografía de fin de carrera. Este estudio se desarrolla en el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina, contando con los insumos de este centro.

Por favor, **lea detalladamente** este consentimiento. Siéntase libre para plantear todas las preguntas que tenga para asegurarse de que entiende toda la información otorgada. Puede contactarse con las personas que llevan a cabo la investigación a través de teléfonos y e-mail de contacto que se detallan al final del documento, en caso de tener dudas o preguntas antes, durante o después de su participación.

El proyecto tiene como objetivo el estudio de pacientes que tuvieron diagnóstico de leucemia linfoide crónica con demostración de delección 13q a través de la técnica de Hibridación in Situ Fluorescente (FISH) en los que se investigará el compromiso del gen del Retinoblastoma (RB1) en glóbulos blancos y la evolución clínica de la enfermedad en términos de necesidad de tratamiento y recaída. Es por este motivo que nos hemos contactado con usted. Este estudio se realizará hasta octubre del año 2020.

Se solicita su consentimiento para utilizar las muestras sangre periférica almacenadas en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Genética de Facultad de Medicina o del servicio de Hematología del Hospital Maciel y para la inclusión de sus datos médicos provenientes de su historia clínica. Con esta muestra criocongelada, se estudiará si presenta, además de la alteración 13q ya diagnosticada previamente, la alteración sobre el gen del Retinoblastoma, sabiendo que podría llegar a tener implicancias en la evolución de esta enfermedad. Debido a esto último, se revisará la historia clínica para determinar qué tipo de evolución tuvo.

Todos los datos obtenidos del proceso son estrictamente confidenciales y los resultados serán presentados de forma anónima de modo que sólo el equipo que desarrolle el proyecto tendrá acceso a los mismos. Esta investigación no implicará alteraciones en su seguimiento, ni en su terapéutica en caso de que la requiera. El estudio no conlleva ningún riesgo para su salud. Usted no obtendrá beneficio directo de la participación de este estudio. No hay remuneración ni retribución económica de ningún tipo por participar. La participación es voluntaria y usted tiene

el derecho de no participar o abandonar el estudio en el momento en que desee sin explicaciones de por medio. Los resultados del estudio podrán ser publicados, manteniendo siempre el anonimato de los participantes. Si es de su interés, podrá acceder a los resultados del estudio posteriormente. Si ha leído y comprendido la información brindada y todas sus preguntas sobre el estudio y su participación fueron atendidas, por favor complete la siguiente información y firme.

Declaro que he sido informado por el Dr. Dra. sobre: la finalidad del estudio, mi rol como participante y la opción de participar o no al igual que mi libertad para abandonar el estudio.

Declaración del médico que ha informado debidamente al paciente

Nombre:

Firma:

Fecha:

Por la presente doy mi autorización para el uso de mis datos y mis muestras criocongeladas, en forma anónima con finalidades académicas. Asimismo, autorizo el uso de mis datos para su inclusión en registros nacionales y para su publicación a nivel nacional y eventualmente internacional.

Nombre:

CI:

Fecha:

Firma:

Datos de contacto

- Teléfono Departamento de Genética- Facultad de Medicina: 2924 34 14. Interno 3469.

Encargadas de investigación:

- Faride Uturbey: 099 734 636. Email: farideuturbey@gmail.com

- María Noel Spangenberg: Email: noyisp@hotmail.com

Equipo técnico: Lafarge, María Victoria; Núñez, Tatiana; Salcedo, Delia; Sarragúa, Tamara; Stens, Joana; Tarouco, Lisiane.