



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Optimización de una prueba molecular para la identificación de la alteración cromosómica t(8;21) asociada a Leucemia Mieloide Aguda.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO

PRESENTA:

SERGIO FRANCISCO CORNELIO MARTÍNEZ

ASESOR:

Doctor en Ciencias (Biología Celular) Carlos Cortés Penagos

Morelia. Michoacán, Junio del 2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el amor incondicional que siempre me han regalado, porque lo que he logrado en esta vida es gracias a ustedes, por el apoyo y las enseñanzas que he recibido de su parte y por todo el empeño que realizan día con día para podernos sacar adelante, realmente nunca habrá en este mundo palabras suficientes para poder describir lo agradecido que estoy con ustedes. Muchas gracias papás los amo.

A mis hermanos y mi pequeña sobria por apoyarme siempre, por los momentos agradables que hemos compartido, por todo su apoyo y amor incondicional, porque sé que siempre puedo confiar en ustedes y que ustedes siempre confiaran en mi, gracias, los amo.

A mis amigos y compañeros de la Banda Orgullo Tarasco, por que más que unos amigos en ustedes encontré una familia, por todos los momentos agradables y divertidos que hemos compartido, porque siempre encuentran la manera de relajar las cosas cuando se ponen tensas, porque no hay un solo día que tengamos que trabajar sin que haya bastantes risas y carcajadas, gracias.

A mis amigos porque sé que puedo confiar en ustedes, porque siempre a su lado paso momentos muy agradables y porque siempre sacan lo positivo de mi, gracias.

Al Doctor Carlos Cortés Penagos por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por su apoyo, su paciencia y por todas sus enseñanzas, gracias.

Al Maestro en Ciencias Víctor Alfredo Pérez Contreras por todo su apoyo y sus instrucciones para poder llevar a cabo este trabajo, gracias.

Agradezco por todas las críticas constructivas, consejos y tiempo que me han dedicado mi comité de sinodales:

D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos

Q.F.B Carlos Alonso Muñoz

Q.F.B Virginia Campos Cabrera

M.C. Víctor Alfredo Pérez Contreras

Q.F.B. Judith Esmeralda Prieto Sierra

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. ABSTRACT	1
1. RESUMEN	2
2. Introducción	3
2.1. Sistema hematopoyético	3
2.2. Aspectos generales y clasificación de la leucemia	5
2.3. Clasificación de la FAB para las Leucemias Mieloides Agudas	5
2.4. Clasificación de la OMS para la Leucemia Mieloide Aguda con anormalidades citogenéticas recurrentes	6
2.5. Criterios diagnósticos para las Leucemia Mieloide Aguda	8
2.6. Incidencia de Leucemias	9
2.7. Incidencia de anormalidades citogenéticas recurrentes asociadas a leucemia mieloide aguda	9
2.8. Supervivencia de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda	10
2.9. Leucemia Mieloide Aguda con t(8;21) (q22;q22)	11
2.10. Mecanismos patogénicos de la proteína de fusión AML1-ETO	13
2.11. Anormalidades citogenéticas y mutaciones genéticas moleculares asociadas a LMA con t(8;21)	14
2.12. Diagnóstico genético de la Leucemia Mieloide Aguda	16
2.13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
2.14. Diseño de experimentos basados en la metodología Taguchi	18
3. ANTECEDENTES	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24

6. OBJETIVOS	24
6.1. Objetivo general	24
6.2. Objetivos específicos	24
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	26
8.1. Muestras	26
8.2. Extracción de RNA	26
8.3 Cuantificación e índice de pureza	26
8.4. Preparación del cDNA a partir del RNA	27
8.5. Diseño de los primers control AML1-D y AML1-R	27
8.6. Reacciones de PCR para la detección de la translocación t(8;21)	28
8.7. Análisis electroforético de los productos de PCR	28
8.8. Optimización del ensayo por metodología Taguchi	28
8.9. Análisis de resultados	29
9. RESULTADOS	30
9.1. Selección de muestras para la identificación de la translocación t(8;21).	30
9.2. Diseño de los primers control AML1-D y AML1-R	30
9.3. Prueba de los primers control AML1D y AML1R	31
9.4. Identificación de la translocación t(8;21) en una muestra con LMA	32
9.5. Optimización de la prueba por metodología Taguchi	33
9.6. PCR con las condiciones óptimas para la identificación de la translocación t(8;21)	35
10. DISCUSIÓN	38
11. CONCLUSIONES	42
12. REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación y maduración de las diferentes células sanguíneas a partir de la célula madre hematopoyética	3
Figura 2. Mecanismo de señalización desde la membrana hasta el núcleo de la célula	4
Figura 3. Distribución de anomalías citogenéticas encontradas en 478 casos de LMA en pediátricos	10
Figura 4. Genes AML1 y ETO, involucrados en la t(8;21)	12
Figura 5. Gen de fusión AML1-ETO	13
Figura 6. Esquema de los pasos de la PCR	18
Figura 7. Muestra SC-18 identificada como t(8;21) positiva por análisis de cariotipo	30
Figura 8. Localización de los primers encargados de identificar la t(8;21) (AML1-A y ETO-B), y los primers control (AML1-D y AML1-R)	31
Figura 9. Análisis electroforético de los PCRs realizados con los primers control AML1-D y AML1-R	32
Figura 10. Análisis electroforético de los PCRs realizados tanto con el par de primers control como con el par encargados de identificar la translocación t(8;21)	32
Figura 11. Análisis electroforético de los ensayos realizados con el arreglo ortogonal Taguchi L ₄ en la muestra SC-18 positiva para t(8;21)	34
Figura 12. Análisis electroforético de los ensayos realizados en dos muestras positivas para la t(8;21) y una muestra negativa con las condiciones óptimas	36
Figura 13. Análisis electroforético comparativo de la detección de la translocación t(8;21)	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las leucemias	6
Tabla 2. Clasificación de las leucemias agudas según la FAB	6
Tabla 3. Clasificación de la OMS para las LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes	7
Tabla 4. Principales características morfológicas de las LMAs	
Tabla 5. Porcentaje de pacientes con LMA que muestra características distintas que presentan un rango de supervivencia aproximado de 5 años	11
Tabla 6. Porcentaje de pacientes con LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes que presentan un periodo de supervivencia aproximado de 5 años	12
Tabla 7. Algunas moléculas que interactúan con AML1-ETO para generar leucemia	15
Tabla 8. Porcentaje de asociación de diferentes anormalidades citogenéticas y mutaciones genéticas moleculares a LMA con t(8;21)	16
Tabla 9. Variables que influyen en la técnica de PCR	18
Tabla 10. Arreglo Ortogonal Taguchi L ₄	20
Tabla 11. Localización y secuencia de cada uno de los primers utilizados para la identificación de la t(8;21)	28
Tabla 12. Formulas utilizadas para los cálculos de los análisis de resultados	29
Tabal 13. Muestras utilizadas para la identificación de la t(8;21)	30
Tabla 14. Arreglo Ortogonal Taguchi L ₄ utilizado para lograr la optimización del ensayo .	33
Tabla 15. Valores de la concentración de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal Taguchi L ₄	33
Tabla 16. Sumatoria de los niveles 1 y 2 de cada variable	34
Tabla 17. Contribución de las variables para la detección de la translocación t(8;21)	34
Tabla 18. Condiciones óptimas para la identificación de la t(8;21)	34

Tabla 19. Resultados de la cuantificación de los productos de PCR llevados a cabo con las condiciones óptimas obtenidas	36
---	----

Lista de abreviaturas

AML1	acute myeliod leukemia factor 1
AO	arreglo ortogonal
CAC	clinical advistory committe
dNTP	desoxinucleotido trifosfato
ETO	eight twenty one
FISH	Hibridación fluorescente in situ
LLA	leucemia linfoide aguda
LLC	leucemia linfoide crónica
LMA	leucemia mieloide aguda
LMC	leucemia mieloide crónica
MO	medula ósea
OGG1	8-oxoguanina DNA glucosilasa
OMS	Organización mundial de la salud
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

RHNM	Registro epidemiológico de neoplasias
RT	transcripción reversa
SP	sangre periférica
Tm	temperatura de alineamiento
U	unidades

ABSTRACT

The term among myeloid leukemia (AML) describe a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders with a spectrum of morphologic, immunophenotypic, cytogenetic, molecular characteristics and a similar clinical behavior. However, recently it has been observed that AML with particular chromosomal abnormality often shows unique clinical and biological features that distinguish them from others. For this reason in 2008 the World Health Organization (WHO) published the latest revision of the classification of myeloproliferative disorders of myeloid and lymphoid tissues. This review includes AML with recurrent genetic abnormalities in a different group of leukemias. Briefly, the classification uses all available information, morphology, cytochemistry, immunophenotype, genetics, and clinical features to define clinically significant disease entities.

AML with recurrent chromosomal abnormalities is found in approximately 34% to 47% of pediatric and 21% to 28% of adult. The translocation t(8;21) (q22;q22) is one of the chromosomal abnormalities associated with this type of leukemias. The translocation fuses the AML1 gene (Acute Myeloid Leukemia Factor 1) on chromosome 21 with the ETO gene or MTG8 (Eight Twenty-One o Myeloid Translocation Gene) on chromosome 8 generating the AML1-ETO fusion gene. This abnormality is found mainly in pediatric patients with AML. Patients with t (8;21) have a good prognosis and generally respond to chemotherapy, even after relapse. To achieve identification of this chromosomal abnormality there are various diagnostic tests among which includes morphologic, immunophenotypic and cytogenetic among others. Additionally, fluorescence in situ hybridization (FISH) or polymerase chain reaction (PCR) are use to detect t(8;21)abnormality. PCR is a rapid, sensitive and low cost method for detection of the fusion transcript, being capable to detect one leukemic cell in 10^5 - 10^6 normal cells. A PCR reaction includes some variables that determine the success of the test, therefore optimization of these tests is a challenge.

In this work, We designed a molecular test based on PCR to identify the chromosomal abnormality t(8;21). This test includes an additional pair of control primers to increase the reliability of the test. Then, we perform the optimization of the test using the Taguchi method. The variables analyzed included the annealing temperature, annealing time and cycle number. Identifying that the cycle number was the major factor affecting the PCR reaction.

Key words: Acute Myeloid Leukemia AML; Acute Myeloid Leukemia Factor 1 AML-1; Eight Twenty-One ETO; Fluorescence in Situ Hybridization FISH; polymerase chain reaction PCR; World Health Organization WHO.

1. RESUMEN

El término leucemia mieloide aguda (LMA) describe un grupo heterogéneo de desórdenes clonales de células progenitoras hematopoyéticas, con un espectro de características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas, moleculares, y un comportamiento clínico similar. Sin embargo, recientemente se ha observado que la LMA con alguna anormalidad cromosómica en particular, a menudo muestra características clínicas y biológicas únicas que las distinguen de otras. Por tal motivo en el año 2008 la OMS publicó la más reciente revisión de la clasificación de los desordenes mieloproliferativos de los tejidos mieloides y linfoides, publicación en la que se incluyeron a las LMAs con anormalidades citogenéticas recurrentes en un grupo distinto de leucemias. Esta clasificación usa toda la información disponible morfológica, citoquímica, inmunológica, genética y clínica para definir clínicamente este tipo de trastornos.

Las LMAs con anormalidades citogenéticas recurrentes constituyen aproximadamente del 34% al 47% de casos pediátricos y del 21% al 28% en adultos. Una de las anormalidades cromosómica asociadas con este tipo de leucemia es la translocación t(8;21) (q22;q22), la cual involucra al gen AML1 (Acute Myeloid Leukemia Factor 1) que está localizado en el cromosoma 21q22 y al gen ETO o MTG8 (Eight Twenty-One o Myeloid Translocation Gene) localizado en el cromosoma 8q22, generando el gen de fusión AML1-ETO. Esta anormalidad se encuentra principalmente en pacientes pediátricos afectados por LMA. Los pacientes con t(8;21) presentan un buen pronóstico y responden bien a la quimioterapia, aun después de haber recaído. Para lograr la identificación de esta anormalidad cromosómica existen diferentes pruebas diagnósticas entre las cuales se incluye la morfología celular, inmunofenotipo, citogenética entre otros. Adicionalmente, se hace uso de otras técnicas moleculares para la detección de la misma tales como FISH (Hibridación In Situ Fluorescente) y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta última técnica es rápida, sensible y de bajo costo para la determinación del gen de fusión, siendo capaz de detectar una célula leucémica en 10^5 - 10^6 células normales. Una reacción de PCR incluye algunas variables que determinan el éxito del ensayo, por lo que la optimización de este tipo de pruebas representa un reto.

En el presente trabajo se diseñó una prueba molecular basada en PCR para la identificación de la t(8;21), la cual incluye un par adicional de primers control para incrementar la confiabilidad de la prueba. A continuación se llevó a cabo la optimización de la prueba haciendo uso del diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi. Las variables ensayadas incluyeron la temperatura y tiempo de alineamiento así como número de ciclos de reacción, siendo este último el factor que más contribuye en el desempeño de la reacción.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Sistema hematopoyético

La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre a partir de la célula madre hematopoyética. Es un proceso altamente regulado que se lleva a cabo en el tejido hematopoyético, principalmente en la médula ósea (MO) en el adulto, el cual aporta la celularidad y el microambiente tisular necesario para generar los diferentes constituyentes de la sangre. La figura 1 muestra un esquema de las etapas para la formación de las diferentes células sanguíneas a partir de la célula madre hematopoyética pluripotencial. A medida que se reproducen estas células, una pequeña parte de ellas permanece exactamente igual que las células madre hematopoyéticas y se queda en la MO para mantener un aporte continuo, aunque su número disminuye con la edad. La mayoría de las células reproducidas se diferenciar hasta formar todos los linajes hematológicos.

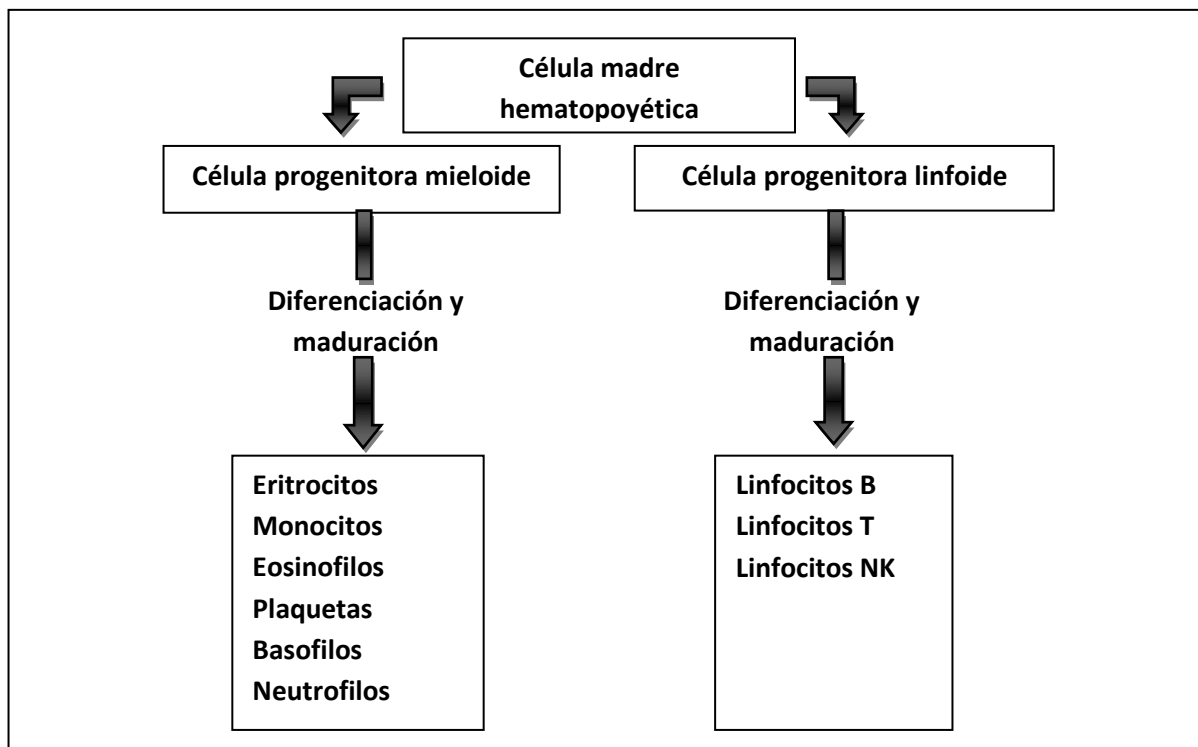


Figura 1. Diferenciación y maduración de las células sanguíneas a partir de la célula madre hematopoyética. Modificado de Guyton and Hall (2006).

La proliferación, diferenciación y maduración de las células progenitoras hematopoyéticas está controlada por glicoproteínas específicas denominadas factores de crecimiento hematopoyéticos. Estos factores de crecimiento pertenecen a un grupo de mediadores solubles denominados citoquinas (citocinas), que funcionan como mensajeros celulares y son producidas por diversas células del ambiente local. Cada factor de crecimiento desempeña múltiples funciones, creando de esta manera un complejo sistema de comunicación célula a célula (Guyton et al 2006). Los factores de crecimiento interactúan con su diana intracelular mediante receptores celulares localizados en la membrana de las células, estos a su vez transmiten una señal desde la superficie hasta el núcleo celular mediante una cascada de señalización compleja que implica múltiples moléculas, entre las cuales figura el segundo mensajero producido por el receptor activado y culmina en una modificación genética y/o bioquímica de la célula (Figura 2). Dicha modificación celular se puede traducir en la diferenciación, maduración, y/o proliferación de las células madre hematopoyéticas para producir las diferentes células sanguíneas y de esta manera mantener el aporte esencial de cada una de estas en el torrente circulatorio (Kaushansky et al 2010).

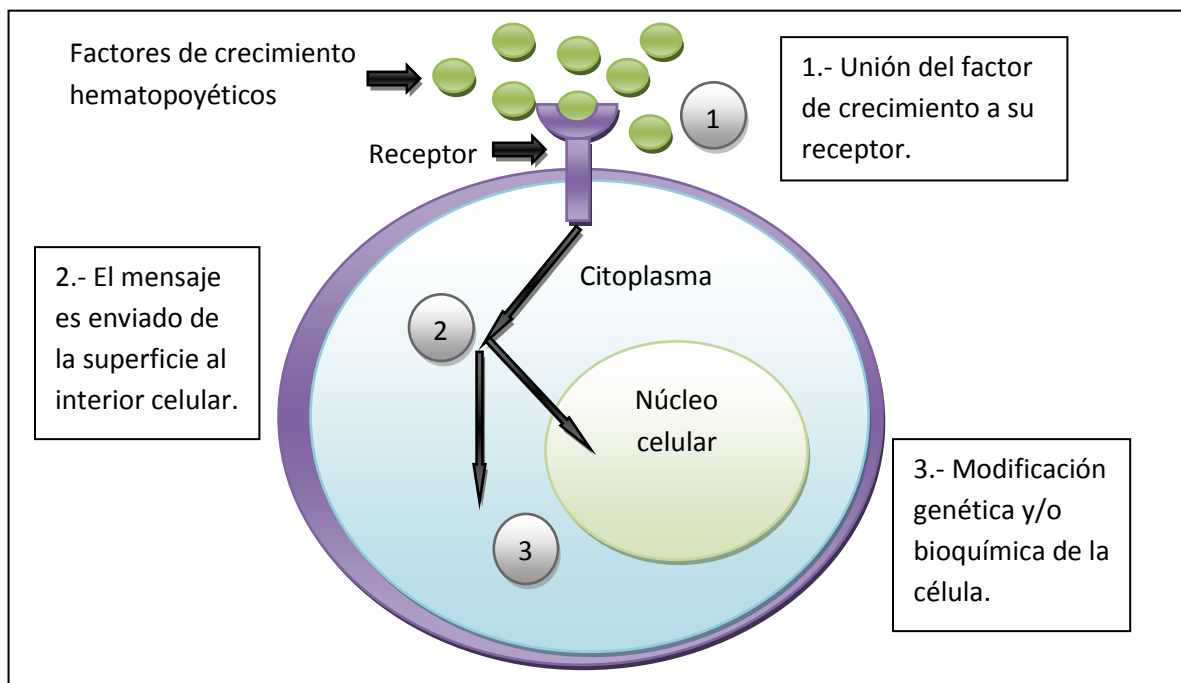


Figura 2. Mecanismo de señalización celular desde la membrana hasta el núcleo de la célula.

Mutaciones adquiridas en las células progenitoras hematopoyéticas les permite escapar a los controles que regulan la proliferación o la diferenciación, o ambas, dando lugar a neoplasias hematopoyéticas, dentro de las cuales encontramos las leucemias. Las principales dianas de este daño genético son cuatro clases de genes reguladores: protooncogenes (promotores del crecimiento), los genes supresores tumorales (inhibidores del crecimiento), genes que regulan la muerte celular programada (apoptosis) y genes implicados en la reparación del DNA. Este daño genético (o mutación) puede adquirirse por la acción de los agentes ambientales, como sustancias químicas, radiación, virus o bien puede heredarse de una línea germinal (Abbas et al 2013)

2.2. Aspectos generales y clasificación de la leucemia

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético caracterizado por una proliferación no regulada de las células progenitoras indiferenciadas o parcialmente diferenciadas. Las leucemias se pueden clasificar como crónica o aguda, con base a la agresividad de la enfermedad. Las leucemias agudas se caracterizan por la acumulación de células inmaduras y tienen un curso progresivo rápido. Las leucemias crónicas se caracterizan por una acumulación de células mas diferenciadas y tienen un curso más lento. Estos dos grupos se subdividen en mieloides o linfoides de acuerdo al origen de la célula progenitora leucémica y se pueden identificar subtipos adicionales de cada clasificación principal con base en los criterios morfológicos, citoquímicos e inmunológicos (Tabla 1) (Mckenzie et al 2009).

2.3. Clasificación de la FAB para las Leucemias Mieloides Agudas.

Desde 1976, la asignación a alguno de los principales grupos de leucemias (mieloide o linfoide) y subgrupos dentro de cada grupo principal, se ha basado en las características morfológicas y citoquímicas establecidas por el sistema de clasificación FAB. En el último decenio, también se ha usado la inmunotipificación de células leucémicas y el análisis citogenético de aberraciones cromosómicas para complementar los datos morfológicos y citoquímicos. En la actualidad es aceptado que el mejor procedimiento para clasificar la leucemia aguda usa una combinación de criterios morfológico, citoquímico, inmunológico y citogenético. En 1976, en un esfuerzo por mejorar y estandarizar la clasificación de las leucemias agudas, un grupo de médicos franceses, americanos y británicos (FAB) propuso un sistema de clasificación y nomenclatura basado en características morfológicas de las células blásticas en frotis teñidos con Romanowsky y en los resultados de las tinciones citoquímicas. Este sistema de clasificación FAB subdivide la leucemias mieloides agudas en ocho grupos FAB, M0 a M7, según la línea celular predominante (por ejemplo, granulocítico, monocítico, eritrocítico, megacariocítico) y el grado de diferenciación celular (Tabla 2) (Merino et al 2007).

Tabla 1. Clasificación de las leucemias.

	Mieloide	Linfoide	Otras
Leucemia aguda	Mieloblástica Promielocítica Monocítica Mielomonocítica Eritrocítica Megacariocítica	Linfocítica T Linfocítica B De células nulas (Indiferenciada)	Indiferenciada De línea celular mixta De células acecinas mieloide/natural
Leucemia crónica	Mielocítica Mielomonocítica	Linfocítica Plasmocítica (mieloma múltiple) Células peludas Prolinfocítica Linfocitosis de células grandes granulares	

Mckenzie et al (2009)

Tabla 2. Clasificación de las leucemias agudas según la FAB.

M0 Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación
M1 Leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mínima
M2 Leucemia mieloblástica aguda con maduración
M3 Leucemia promielocítica, hipergranular
M3v Leucemia promielocítica, variante hipogranular (microgranular)
M4 Leucemia mielomonocítica aguda
M4eo Leucemia mielomonocítica aguda con eosinófilos anormales
M5a Leucemia monoblástica aguda sin diferenciación
M5b Leucemia monoblástica aguda con diferenciación
M6 Eritroleucemia aguda
M7 Leucemia megacariocítica

Mckenzie et al (2009)

2.4. Clasificación de la OMS para la Leucemia Mieloide Aguda con anomalías citogenéticas recurrentes

En 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en colaboración con la European Association for Haematopathology y la Society for Hematopathology, publicaron la más reciente revisión de la clasificación para los desordenes mieloproliferativos de los tejidos linfoides y mieloides (dentro de los cuales incluye a la LMA). Esta cuarta edición de la clasificación de la OMS para dichos desordenes, incorpora nueva información que ha emergido de estudios clínicos y científicos en el intervalo desde la publicación de la tercera edición en 2001. Brevemente, esta clasificación usa toda la información disponible

morfológica, citoquímica, inmunológica, genética y clínica para definir más claramente este tipo de trastornos. Aproximadamente 30 médicos y científicos clínicos de todo el mundo quienes fueron reconocidos por su experiencia en neoplasias mieloides y leucemia aguda fueron invitados a formar parte del Clinical Advisory Committee (CAC) para lograr esta clasificación. Estos expertos estuvieron de acuerdo en la clasificación y el criterio diagnóstico usado para definir las entidades que componen este tipo de trastornos. La edición anterior de la clasificación de la OMS marcó el comienzo de la era de la incorporación de anomalías genéticas en los algoritmos de diagnóstico para la valoración de la LMA. Las 4 anormalidades inicialmente incluidas en el subgrupo de LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes (Tabla 3) implica los reordenamientos de los genes (AML1, CBF β , RARA, y MLL) que codifican factores de transcripción y que se asocian con características clínicas y morfológicas bastante distintivas. Desde la publicación de la tercera edición de la clasificación, se ha vuelto más apreciable que las lesiones múltiples, incluyendo no solo las anormalidades citogenéticas o numéricas si no también mutaciones genéticas submicroscópicas; cooperan para establecer el proceso leucémico e influir en sus características clínicas y morfológicas. La cuarta edición de la clasificación de la OMS para las LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes, además de incluir los reordenamientos de los 4 genes inicialmente implicados, incorpora nuevos desordenes identificados desde la publicación de la tercera edición hasta la publicación de esta cuarta edición (Tabla 3) (Vardiman et al 2008).

Tabla 3. Clasificación de la OMS para LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes.

Leucemia Mieloide Aguda con anormalidades genéticas recurrentes.
AML con t(8;21) (q22;q22), RUNX1-RUNX1T1
AML con inv16 (p13.1q22) o t(16;16), CBFB-MYH11
AML con t(15;17) (q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML con t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML con t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>
AML (megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i>
Entidad provisional: <i>AML con mutaciones en NPM1</i>
Entidad provisional : <i>AML con mutaciones en CEBPA</i>

Modificado de Vardiman et al (2009)

2.5. Criterios diagnósticos para la Leucemia Mieloide Aguda.

Los pacientes con LMA se caracterizan por presentar un cuadro clínico de corta evolución, asociado a síntomas como fiebre, pérdida de peso, petequias, equimosis, púrpura y diaforesis profusa. Puede cursar con visceromegalia, linfadenopatía, compromiso de piel y gingival. El estudio de sangre periférica (SP) muestra leucocitosis o leucopenia, generalmente con blastos, anemia y trombocitopenia. Ocasionalmente, puede no observarse blastos en SP por hallazgo de pancitopenia o bicitopenia. La búsqueda de blastos debe hacerse en médula ósea, y su recuento debe ser mayor al 20%. Se debe practicar, además, un cuadro hemático completo, mielograma o aspirado de médula ósea, biopsia de médula ósea y de sitios extramedulares, citoquímica, inmunocitometría de flujo, citogenética, y también, se pueden solicitar estudios de nitrógeno ureico, creatinina y LDH para lisis tumoral. La biopsia de médula ósea es necesaria cuando el aspirado está diluido o seco (Haferlach et al 2005). Si el paciente tiene más del 20% de blastos en SP y no se puede tomar mielograma por el estado clínico del paciente, se puede hacer la citoquímica, citometría de flujo, citogenética y biología molecular en esta muestra. La morfología celular y la citoquímica se deben observar en el extendido de médula ósea y/o SP. Sin embargo, la morfología celular debe observarse preferiblemente en el mielograma. Luego, se analiza el tipo de blasto en busca de las características descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Principales características morfológicas de las LMAs.

Características celulares	Descripción
Tamaño	Grande (mayor de dos glóbulos rojos juntos) 10-18 μ m
Relación núcleo-citoplasma	Moderadamente baja 1:2
Color del citoplasma	Azul claro
Inclusiones en el citoplasma	Se observan los bastones de Auer, excepto en FAB-M0 y FAB-M7. Raros en FAB-M5A
Vacuolas	Pueden estar presentes o no
Membrana nuclear	Irregular
Cromatina	Laxa (muy homogéneo el color y suelta)
Nucléolos	De dos a cuatro nucléolos prominentes

Modificado de Quintero et al (2005).

En la serie granulocítica hay tres tipos de blastos que se diferencian por la cantidad de gránulos: Tipo I: sin gránulos, son los más indiferenciados; Tipo II: con 20 gránulos en el citoplasma; Tipo III: con más de 20 gránulos en el núcleo y citoplasma. El blasto tipo III se encuentra principalmente en la LMA con translocación t(8;21). Este tipo de blasto es

morfológicamente similar a un promielocito, por lo que su diferenciación se logra sólo con estudios citogenéticos (Quintero et al 2005).

2.6. Incidencia de Leucemias

A nivel mundial se estimó que para el 2008, la incidencia de leucemias tanto en hombres como en mujeres fue del 3% (porcentaje tomado a partir de todos los tipos de cáncer para los cuales se estimó su incidencia ese mismo año), mientras que las muertes estimadas por la misma enfermedad fueron del 4% para los hombres y 3% para las mujeres, tomando en consideración todas las muertes estimadas por cáncer para el mismo año (Tabla 5) (Jemal et al 2008). Otro estudio llevado a cabo en México en el año 2002, demostró que la leucemia fue la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en niños de 5 a 14 años de edad, con una frecuencia de 2.71 por 100,000 habitantes (Tirado-Gómez et al 2007).

En el caso de las leucemias agudas en México, el único registro con estas características es el Registro Epidemiológico de Neoplasias Malignas (RHNM) de la Secretaría de Salud, el cual recopila información con base en el Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones y el Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos. Este sistema fue actualizado por última vez en 2001 y recopila información de 702 hospitales y unidades médicas. En México, el RHNM reporta una frecuencia anual de las leucemias agudas en la población general de 2 por 100,000 habitantes al año; para la leucemia linfocítica aguda (LLA) esta cifra es de 1.3 y para la leucemia mieloide aguda (LMA) es de 0.7 por 100,000 habitantes al año (Crespo-Solís et al 2010).

2.7. Incidencia de anomalías citogenéticas recurrentes asociadas a leucemia mieloide aguda

Algunas anomalías citogenéticas, particularmente las translocaciones t(8;21), t(15;17), inv(16) o t(16;16) y 11q23, representan un considerable porcentaje de anomalías citogenéticas asociadas a LMA. Las LMAs con estas anomalías constituyen aproximadamente del 34%-47% en pacientes pediátricos y del 21%-28% en adultos (Martínez-Climent et al 1995, Grimwade et al 1998, Slovak et al 2000). En otro estudio llevado a cabo por Raimondi et al (1999), se determinó el tipo y frecuencia de anomalías cromosómicas en 478 niños diagnosticados con LMA. 208 (58.6%) de estos pacientes presentaron anomalías citogenéticas, los cuales fueron clasificados en los siguientes subgrupos: 11q23 (n=88, 18.4%), t(8;21) (n=56, 11.7%), t(15;17) (n=55, 11.5%), inv(16)/t(16;16) (n=28, 5.9%), trisomía 8 sola (n=10, 2.1%), monosomía 7 (n=9, 1.9%), trisomía 21 (n=7, 1.5%), y translocaciones raras recurrentes (n=27, 5.6%). los resultados se muestran en la figura 3.

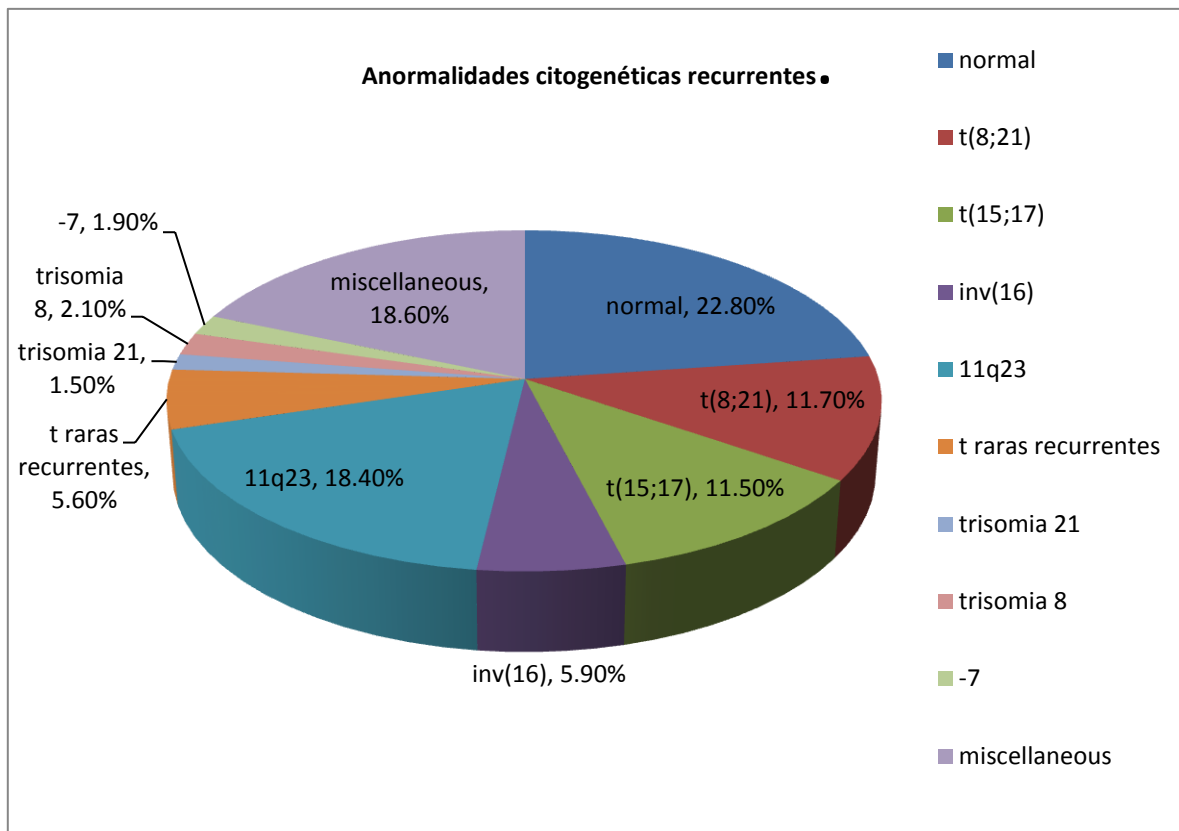


Figura 3. Distribución de anomalías citogenéticas encontradas en 478 casos de LMA en pediátricos. Modificado de Raimondi et al (1999)

2.8. Supervivencia de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda

Los pacientes con LMA presentan un periodo aproximado de supervivencia de 5 años después de haber sido tratados, el cual, varía dependiendo principalmente de las características de la enfermedad y del subtipo de LMA que esté presente. En el año 2003, Arber et al demostraron que no hay diferencias significativas entre la supervivencia de pacientes que presentaron un conteo de blastos del 30% o mayor y aquellos con un conteo menor al 30%, además de demostrar que la supervivencia es similar para los pacientes con un conteo bajo de blastos y los que presentan displasia mixta (Tabla 5). En el mismo estudio se demostró que hay diferencias significativas en la supervivencia de pacientes con anomalías citogenéticas recurrentes tal y como se muestra en la tabla 6.

Tabla 5. Porcentaje de pacientes con LMA que muestra características distintas que presentan un rango de supervivencia aproximado de 5 años.

Características de la LMA	Porcentaje de pacientes con una supervivencia de 5 años
LMA con 20% de blastos o mayor pero menor del 30%	18%
LMA con más de 30% de blastos	37.3%
LMA no clasificada con más de 30% de blastos	39.8%
LMA con displasia mixta	19.3%

Tabla 6. Porcentaje de pacientes con LMA con anomalías citogenéticas recurrentes que presentan un periodo de supervivencia aproximado de 5 años.

LMA con anomalías citogenéticas recurrentes	Porcentaje de pacientes con una supervivencia de 5 años
LMA con t(8;21)	40%
LMA con t(15;17)	60%
LMA con inv16	61%
LMA con 11q23	12%

La anomalía t(8;21) está asociada con un menor riesgo de recaída. En un reciente reporte se analizaron los datos de supervivencia de 5876 pacientes con LMA (con una edad media de 44 años), en los cuales se incluyeron 421 pacientes con la t(8;21) (Grimwade et al 2010), observándose un porcentaje de supervivencia para este grupo de 61% (con un periodo aproximado de 5 años). En otros estudios realizados se han obtenido datos similares (Narimatsu et al 2008, Lin et al 2008). No se han observado diferencias en la supervivencia de pacientes con la t(8;21) sola en comparación con aquellos que presentan anomalías citogenéticas adicionales.

2.9. Leucemia Mieloide Aguda con t(8;21) (q22;q22)

La LMA con t(8;21) es considerada por la OMS como una leucemia con características clínicas y biológicas que la distingue de otros tipos. Los pacientes con este tipo de leucemia presentan un buen pronóstico y responden a la quimioterapia, aun después de haber recaído (Huang et al 2006). Aunque el pronóstico de estos pacientes también depende de mutaciones adicionales, las cuales, pueden ser favorables o desfavorables para el mismo. Los criterios de diagnóstico para LMA con t(8;21) difieren de otros tipos de LMA, ya que las células leucémicas presentes en esta, muestran características biológicas que son poco comunes en otros tipos de leucemia.

La translocación t(8;21) (q22;q22), involucra al gen AML1 (Acute Myeloid Leukemia Factor 1) que está localizado en el cromosoma 21q22 y al gen ETO o MTG8 (Eight Twenty-One o Myeloid Translocation Gene) localizado en el cromosoma 8q22, generando esta translocación. Fue la primera anomalía citogenética encontrada en LMA y actualmente es un buen ejemplo de cómo estas pueden ser usadas para definir a subgrupos distintos de pacientes con LMA (van Dongen et al 1999, Cabezas-Wallscheid et al 2013). La t(8;21) se encuentra en aproximadamente el 40% de los pacientes con LMA M2, el 6% de los casos de LMA M1 y raramente en LMA M0, M4 y M5 según la clasificación FAB (Rosline et al 2004).

El gen de fusión nombrado como AML1-ETO está formado por la porción N-terminal del gen AML1 y la mayor parte de la región codificante del gen ETO. El cDNA correspondiente a AML1-ETO contiene los exónes del 2 al 11 de ETO (Figura 5), y su transcrito de fusión produce una proteína del mismo nombre de 752 aminoácidos (Peterson et al 2007). Los puntos de ruptura en el locus AML-1 son variables, a pesar de que se ha descrito que ocurren frecuentemente en el intrón 5, donde se han localizado tres regiones de corte. En el locus ETO los puntos de ruptura se han localizado en dos intrones, con una región de corte en el intrón 1a y tres en el intrón 1b (Figura 4) (LaFiura et al 2008, Zhang et al 2002). Se han reportado transcritos alternativos de la proteína de fusión AML1-ETO en pacientes con t(8;21), sin embargo, estos transcritos son más cortos que la proteína original y algunos de ellos son de baja frecuencia.

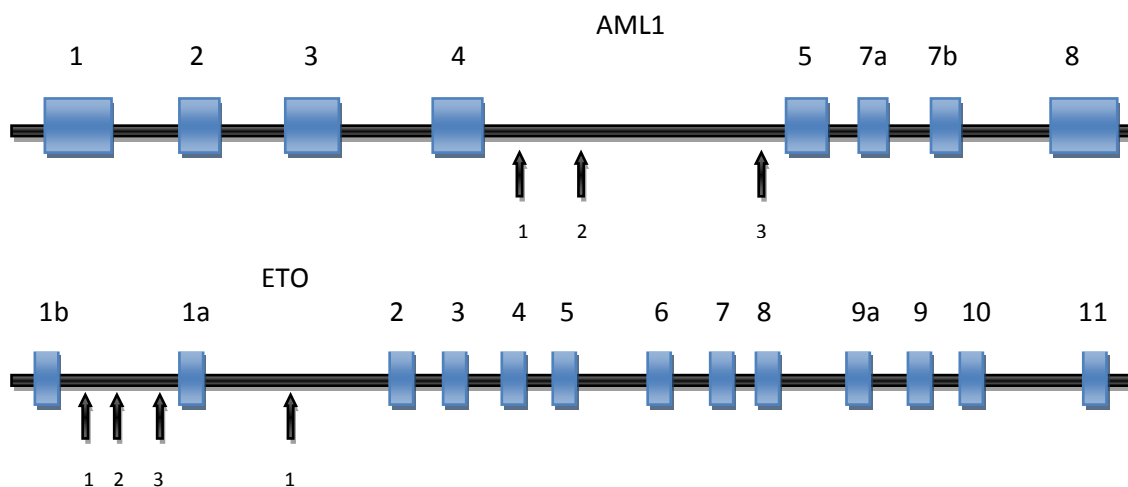


Figura 4. Genes AML1 y ETO, involucrados en la t(8;21). Los números indican los exónes, y las flechas indican las regiones de corte involucradas en la translocación. Modificado de Zhang et al (2002)

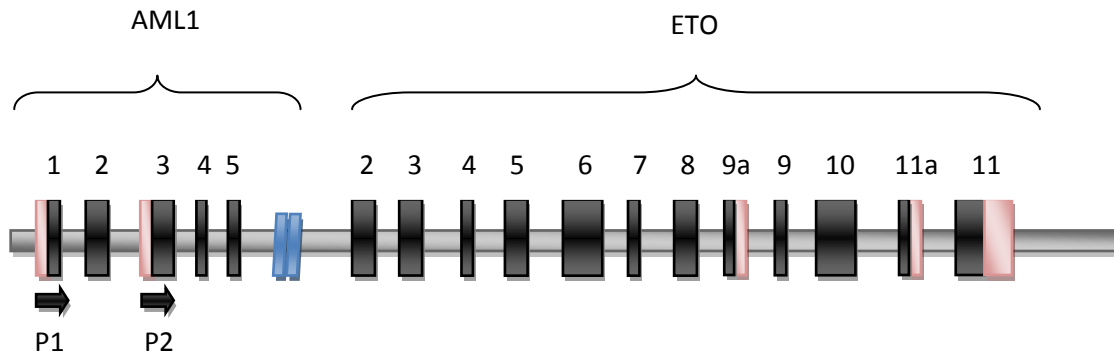


Figura 5. Gen de fusión AML1-ETO, P1 y P2 representan los promotores del gen AML1. Modificado de Peterson et al (2007)

La proteína AML-1 es un factor de transcripción crítico para el desarrollo de las células hematopoyéticas, contiene un dominio de unión al DNA llamado Runt o RD en la porción N-terminal y un dominio de activación de la transcripción en la porción C-terminal. Se han descrito tres variantes de splicing de AML-1, nombradas AML-1a, 1b y 1c, las dos primeras son producidas a partir del promotor P2 de AML1 y ambas tienen un dominio N-terminal homólogo, sin embargo la variante 1a no conserva el dominio C-terminal; por otra parte la variable 1c es producida a partir del promotor P1 y su dominio N-terminal es diferente del de las dos primeras (Figura 5) (Telfer et al 2001, Levanon et al 2004, Fujita et al 2001, Licht et al 2001); a demás, AML-1 es un importante regulador de genes específicos de la hematopoyesis como IL-3, GM-CSF, CSF1/M-CSF, mieloperoxidasa, elastasa de neutrófilos, granzima B y los receptores los linfocitos T (TCRs). ETO a diferencia de AML-1 no se une directamente con el DNA pero lleva a cabo la represión genética indirectamente al interactuar con múltiples proteínas reguladoras de la transcripción (Shimada et al 2000, Ajore et al 2012). Esta proteína contiene cuatro dominios altamente conservados denominados como NHR-1 a NHR-4 respectivamente (Corpora et al 2010).

2.10. Mecanismos patogénicos de la proteína de fusión AML1-ETO

Debido a que la proteína de fusión AML1-ETO pierde la porción C-terminal de AML1, también pierde las funciones asociadas a este dominio como la activación de la transcripción y/o su localización nuclear. En lugar de esto, como el dominio RD se encuentra unido a la proteína ETO, la proteína de fusión lleva a cabo la represión de algunos de los genes diana de AML-1 y es dirigida a un microambiente nuclear distinto al que pertenece AML-1 (Zaidi et al 2009). Se ha demostrado que CBF β al igual que AML-1 es esencial para que se lleve a cabo la hematopoyesis, y debido a que la proteína CBF β se localiza dentro del núcleo junto con AML1-ETO, también se reduce su movilidad. De esta

manera, la proteína de fusión podría interferir con las funciones normales de AML1 debido a su dinámica nuclear aberrante, además de dirigir el secuestro temporal de CBF β y quizás de otros reguladores críticos para la diferenciación mieloide (Qiu et al 2006). Sin embargo, se ha demostrado que AML1-ETO no es suficiente para generar leucemia por sí sola, pero, puede disminuir la expresión de la enzima de reparación del DNA 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), lo cual podría concluir en anormalidades genéticas adicionales requeridas para el desarrollo de LMA (Liddiard et al 2010).

La proteína de fusión AML1-ETO funciona predominantemente reclutando moléculas encargadas de llevar a cabo la represión genética, mediante su porción ETO. De esta manera al formarse el complejo represor con la proteína de fusión se inicia la represión de los genes que normalmente serían activados por la proteína AML-1. El mecanismo molecular seguido de esta interacción varía dependiendo de la molécula represora involucrada en la formación del complejo, pero comprende la alteración de la desacetilación de histonas y alteración de la metilación del DNA. Se ha observado que muchas de estas moléculas involucradas incrementan la viabilidad y la proliferación, y/o disminuyen la diferenciación, pero su relativa contribución al desarrollo de la leucemia suele variar, siendo algunas más contribuyentes que otras en el desarrollo de la enfermedad. En la tabla 7 se enlistan algunas de las moléculas represoras que interactúan con el gen de fusión AML1-ETO y se describen algunos de sus mecanismos de interacción y funciones biológicas (Plevin et al 2006, Hug et al 2004, Gow et al 2013, Reikvam et al 2011).

2.11. Anormalidades citogenéticas y mutaciones genéticas moleculares asociadas a LMA con t(8;21)

La t(8;21) es frecuentemente encontrada junto con anormalidades citogenéticas o mutaciones genéticas adicionales. La pérdida de un cromosoma sexual (cromosoma X para las mujeres y cromosoma Y para los hombres) es común en pacientes con t(8;21), esto sugiere que la pérdida de ciertos genes de los cromosomas sexuales podrían cooperar con la t(8;21) al desarrollo de la LMA. Se han identificado otras anormalidades citogenéticas asociadas a LMA con t(8;21), como la trisomía 8, la trisomía 4 y la delección del cromosoma 9. Además de las anormalidades citogenéticas, mutaciones en los receptores de los factores de crecimiento, protooncogenes y factores de transcripción se han identificado también en LMA con t(8;21), los cuales incluyen c-KIT, FLT3, N-RAS, PU.1 y AML-1 (Arber et al 2003, Peterson et al 2007). La tabla 8, muestra los porcentajes aproximados de asociación de las anormalidades citogenéticas y mutaciones genéticas a LMA con t(8;21). Adicionalmente, se han reportado variantes que involucran la participación de un tercer cromosoma en el rearrreglo, como los cromosomas 1, 2, 5, 6, 8, 11, 13, 15 y 17; así mismo

Tabla 7. Algunas moléculas que interactúan con AML1-ETO para generar leucemia.

Molécula	Función	Mecanismo de interacción	Función biológica
GFI1	Represión de la transcripción	Variantes alelicas de GF35N y GF36S con actividad represora. La proteína de fusión interactúa con la más común GFI136S e inhibe su actividad represora. La proteína de fusión no inhibe la actividad represora de la variante GFI135N	Regula la diferenciación mieloide la interacción y el efecto de la proteína de fusión depende de la variabilidad biológica del individuo.
CBFβ	Represión de la transcripción	Forma heterodímeros con la proteína de fusión a través del dominio RD de AML1	Modelos animales sugieren que CBFβ es importante por su contribución junto con la proteína de fusión a la inhibición de la diferenciación de los neutrófilos.
Proteína-E	factor de transcripción	Interactúa con la proteína de unión a las histonas acetil transferasas p300/CREB, iniciando la transcripción a través de la acetilación de histonas. Este efecto es silenciado por AML1-ETO mediante la activación preventiva E-protein/p300 y el reclutamiento local de HDACs	Las proteínas-E son importantes reguladores del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. Estas funciones son probablemente inhibidas mediante su unión al dominio NHR4 de AML1-ETO.
Complejo SMRT/N-CoR	Regulador de la transcripción	El complejo junto con sus histonas desacetilasas (HDACs) asociadas a genes diana de AML1, causan la represión aberrante de los mismos en presencia de AML1-ETO.	Contribuye al bloqueo de la diferenciación y atenúa el efecto de AML1-ETO en la proliferación celular.
UBF1	Factor de transcripción	Se une al DNA ribosomal y regula la actividad de la RNA polimerasa 1.	Modulación de la transcripción del RNA ribosomal durante la interfase mediante la RNA polimerasa 1
SON	Regulador de crecimiento	Se une al dominio NHR4 y posiblemente se involucra en la señalización antiproliferativa mediante este dominio	Muestra una localización anormal en el citoplasma de las células con t(8;21); sus funciones no se conocen bien pero pareciera estar involucrado en la proliferación y la apoptosis

Modificado de Reikvam et al (2011)

el gen AML1-ETO puede producirse a partir de las inserciones ins(21;8) y ins(8;21) (Reikvam et al 2011).

Tabla 8. Porcentaje de asociación de diferentes anomalías citogenéticas y mutaciones genéticas moleculares a LMA con t(8;21).

Mutaciones	Frecuencia %
Anormalidades citogenéticas	
Perdida del cromosoma X en pacientes femeninos	35
Perdida del cromosoma Y en pacientes masculinos	56
Deleción del cromosoma 9	18
Trisomia 4	11
Trisomia 8	6
Otras	16
Mutaciones genéticas moleculares	
FLT3-ITD	6.9
FLT3 D853	2.7
c-KIT D816	12.3
c-KIT N822K	19
N-RAS codones 12, 13 y 61	8.5
PU.1	5.3
AML1	3.8

Modificado de Reikvam et al (2011)

2.12. Diagnóstico genético de la Leucemia Mieloide Aguda

Para la determinación de algunos marcadores moleculares asociados a LMA tales como las anomalías estructurales, numéricas, inversiones y translocaciones de los cromosomas se hacen estudios de citogenética (Pérez Contreras et al 2012). Un ejemplo claro del uso de esta técnica de laboratorio es la detección de la t(8;21) asociada a LMA, sin embargo, también se hace uso de otras técnicas moleculares para la detección de la misma tales como FISH (Hibridación In Situ Fluorescente) y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Kim et al 2013). El PCR es uno de los métodos más rápidos, sensibles y de bajo costo utilizados para la determinación del gen de fusión, siendo capaz de detectar una célula

leucémica en 10^5 - 10^6 células normales (Rowe et al 2002, Reikvam et al 2011), por lo cual, su uso para el diagnóstico y seguimiento de la LMA es importante.

2.13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR es una técnica de laboratorio que permite sintetizar in vitro un número ilimitado de copias de un fragmento de DNA haciendo uso de una polimerasa termoestable. Para llevar a cabo un PCR primero se requiere del conocimiento de las secuencias que flaquean la región a amplificar. Se generan primers complementarios de estas secuencias mediante síntesis química automatizada y se utilizan en una serie especial de reacciones catalizadas por la polimerasa que se realizan tal como sigue: a) el DNA que contiene la secuencia a amplificar es desnaturalizado utilizando a una temperatura de 90-95°C, b) después se hace el alineamiento de este con los primers a una temperatura que varía de 40-60°C y c) se realiza la extensión de la cadena por la polimerasa a una temperatura de 70°C. Consecutivamente se vuelve a aplicar un segundo ciclo de desnaturalización, alineado y extensión y así sucesivamente hasta lograr entre 25 y 40 repeticiones de los mismos, utilizando un termociclador programado para lograr tal propósito. Al final de cada ciclo se han formado dos moléculas de DNA a partir de cada una de las presentes al inicio del mismo, y su número se duplica con cada ciclo sucesivo (Otago et al 2003, Kainz et al 2000, Mullis et al 1994). En la figura 6 se esquematiza el programa utilizado para realizar las reacciones de PCR. Existen algunas variantes de la técnica de PCR, entre las cuales encontramos el RT-PCR. Esta técnica a diferencia de la PCR estándar, esta acoplada a una transcripción reversa, para generar una molécula de cDNA a partir del RNA, que posteriormente puede ser utilizado como molde.

La técnica de PCR al igual que muchas otras, presenta algunas variables (Tabla 9), de las cuales, habrá que determinar los niveles a utilizar en cada programa de PCR. Para lograr dicho objetivo se realiza un diseño experimental, el cual, por lo general es llevado a cabo a prueba y error, analizando de esta manera los resultados obtenidos de cada prueba realizada. Otras veces se realiza un diseño factorial, este analiza cada una de las variables involucradas a los diferentes niveles, sin embargo suele tomar bastante tiempo y suele ser relativamente costoso. Un método recientemente utilizado para lograr la optimización de determinadas pruebas es la metodología Taguchi, la cual, a diferencias del diseño factorial, suele ser un método rápido, de bajo costo y reproducible.

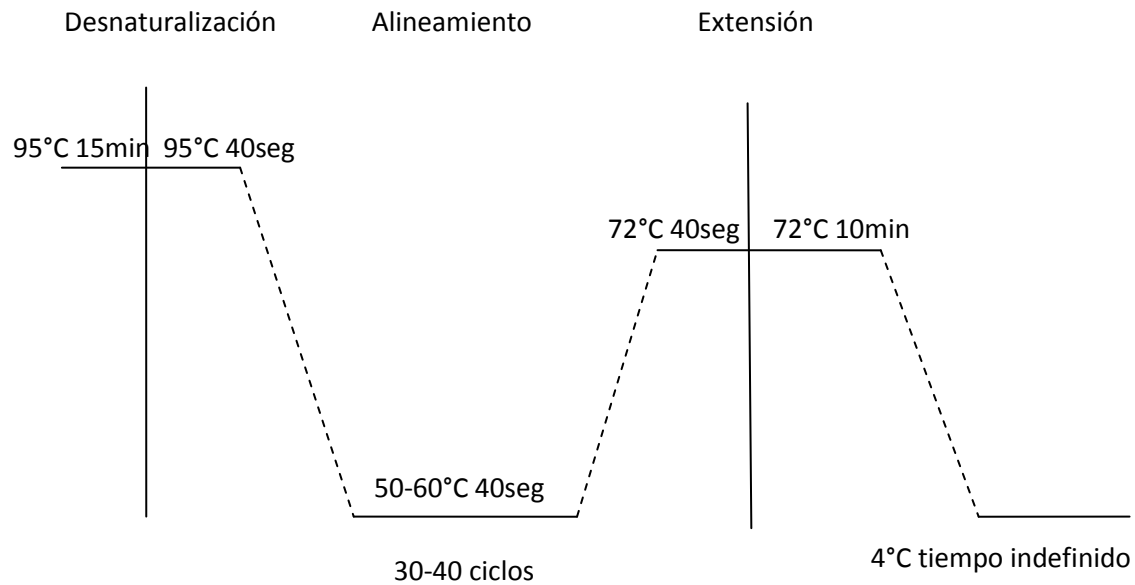


Figura 6. Esquema de los pasos de la PCR. Desnaturalización: desenrollamiento de la doble hélice de DNA, Alineamiento: unión de los primers a sus secuencias complementarias de DNA, Extensión: síntesis de nuevas copias de DNA a partir de los primers.

Tabla 9. Variables que influyen en la técnica de PCR.

Variable	Unidades	Paso critico
Polimerasa	UNIDADES de enzima	Extensión o síntesis
Mg+2	Concentración molar	Extensión o síntesis
Oligonucleótidos	Concentración molar	Alineamiento e inicio de síntesis
Temperatura de alineamiento	Grados centígrados	Alineamiento específico
Temperatura de desnaturalización	Grados centígrados	Desnaturalización del ADNA
Temperatura de extensión	Grados centígrados	Activación de la polimerasa
Nucleótidos	Concentración molar	Materia prima de síntesis

Modificado de Pérez Contreras et al (2012)

2.14. Diseño de experimentos basados en la metodología Taguchi

La técnica que define e investiga todas las posibles condiciones en un experimento que involucra múltiples factores es conocida como el diseño del experimento. Este está basado en modelos estadísticos basados en la experimentación que tiene como objetivo determinar si un factor determinado influye y que tanto lo hace sobre la variable de interés. La finalidad con la cual se realiza un diseño experimental es observar si al utilizar ciertas condiciones definidas se logra una mejora en la calidad del producto obtenido y

cuáles de esas condiciones muestran mejores resultados, para de esta manera, obtener un programa óptimo para el diseño del producto (Ferré et al 2006, Eriksson et al 2008). Después de la segunda guerra mundial, el Doctor Taguchi comenzó a desarrollar en Japón un nuevo modelo para la optimización de los procesos de experimentación de ingeniería conocido ahora como metodología Taguchi. Después, esta nueva técnica fue implantada en los Estados Unidos creando cambios significativos en la calidad de los métodos de ingeniería en este país. La metodología taguchi ha sido exitosamente aplicada en muchas organizaciones industriales y ha cambiado completamente su punto de vista en cuanto a control de calidad.

Para Taguchi, la calidad, antes que por la satisfacción de especificaciones, debe medirse en términos de la así llamada función de pérdida, que establece la pérdida que la sociedad sufre como consecuencia de la mala calidad. Un producto de calidad es para el cliente aquél que cumple con las expectativas de rendimiento cada vez que lo utiliza, sin fallas y en cualquier condición o circunstancia. Por esto, para Taguchi, la calidad debe medirse en función de la pérdida que causa: mientras mayor es la pérdida que se produce, menor es la calidad. Pero, aunque en un sentido más exigente que en el concepto tradicional, las especificaciones también son clave para Taguchi, y calidad significa conformidad con las especificaciones. Apartarse de las especificaciones equivale a ocasionar al cliente y, en última instancia, a la sociedad, una pérdida. La función de pérdida vale cero cuando el desvío con respecto al parámetro objetivo es nulo y se incrementa cuadráticamente cuando los valores de los productos fabricados se acercan a los límites de tolerancia. En otras palabras, los productos cercanos a los límites de tolerancia son productos casi defectuosos y los gerentes deben trabajar para reducir la variabilidad de sus procesos de producción (Roy et al 1990).

La parte fundamental de la metodología ideada por el matemático japonés Taguchi es la optimización de productos y procesos, a fin de asegurar productos robustos, de alta calidad y bajo costo.

La metodología Taguchi consta de tres etapas:

- a) Diseño del sistema
- b) Diseño de parámetros
- c) Diseño de tolerancias

De estas tres etapas, la más importante es el diseño de parámetros cuyos objetivos son:

- a) Identificar qué variables afectan la característica de calidad en cuanto a su magnitud y en cuanto a su variabilidad.
- b) Definir los niveles “óptimos” en que debe fijarse cada factor, a fin de optimizar la operación del producto y hacerlo lo más robusto posible.
- c) Identificar factores que no afectan substancialmente la característica de calidad a fin de liberar el control de estos factores y ahorrar costos de pruebas.

Para lograr lo anterior Taguchi ha propuesto una alternativa no del todo diferente a los diseños factoriales, conocido como Arreglos Ortogonales (AO). El uso de cuadros latinos de AO para el diseño de experimentos data de antes de la segunda guerra mundial. Por la combinación de un cuadro latino ortogonal de una manera única, Taguchi preparo un nuevo set de AOs estándar para ser utilizados en numerosas situaciones experimentales. La tabla 10, muestra un AO L_4 , donde se analizan 3 variables a dos niveles conocidos como nivel 1 y nivel 2 respectivamente. Como se puede observar este AO consta de 4 filas y 3 columnas, donde cada columna corresponde a cada una de las variables a analizar y cada fila corresponde a los ensayos a realizar con los valores indicados de cada variable (donde 1 corresponde al valor del nivel 1 y 2 al valor del nivel 2 de cada variable).

Tabla 10. Arreglo Ortogonal L_4 .

Ensayos	Variable 1	Variable 2	Variable 3
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

Modificado de Roy et al (1990)

Cada una de las variables contiene 2 condiciones al nivel 1 y dos al nivel 2. Los 2 niveles de cada una de las variables se pueden combinar en 4 posibilidades, como lo son (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Se dice que una columna esta balanceada ortogonalmente si dos columnas tienen el mismo número de posibles combinaciones. De esta manera, tal y como se muestra en la figura, en cada par de columnas del AO L_4 hay el mismo número de posibles combinaciones (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Por lo tanto las tres columnas del AO L_4 son ortogonales unas de otras (Roy et al 1990, Hernández et al 2003).

El conocimiento de la contribución de cada factor individual es una clave para decidir la naturaleza del control que se tiene que llevar a cabo para un proceso de producción. El

análisis de varianza (ANOVA o ANDEVA) es la herramienta estadística comúnmente aplicada a los resultados de experimentos para determinar el porcentaje de contribución de cada factor. El estudio con un análisis ANOVA ayuda a determinar cuáles factores necesitan control y cuáles no (Galindo Jiménez et al 2013).

3. ANTECEDENTES

El término leucemia mieloide aguda (LMA) describe un grupo heterogéneo de desórdenes clonales de células progenitoras hematopoyéticas, con un espectro de características morfológicas, inmunofenotípicas, citogenéticas, moleculares, y un comportamiento clínico similar. Sin embargo, recientemente se ha observado que la LMA con alguna anormalidad cromosómica en particular, a menudo muestra características clínicas y biológicas únicas que las distinguen de otras. Entre estos casos la translocación t(8;21) es una de las anormalidades cromosómicas más comunes (Nishii et al 2003). La técnica de RT-PCR es un método rápido y sensible para la detección de la t(8;21), pero, aunque es fácil de realizar no significa que esté exento de retos ya que el RNA se degrada fácilmente y se tienen que realizar pruebas para la calidad del mismo (Pallisgaard et al 1998). PCR al igual que el método anterior también suele ser rápido y sensible, pero, a diferencia del anterior este no presenta las interferencias del RNA ya que utiliza DNA. Además, se ha observado que la técnica de PCR tiene el potencial para identificar la anormalidad citogenética t(8;21) con mayor precisión que el análisis de cariotipo (que hasta la fecha se ha considerado como el estándar de oro para la identificación de esta misma) ya que es capaz de identificar una célula leucémica por cada 10^5 - 10^6 células normales, mientras que el análisis de cariotipo solo identifica una célula leucémica por cada 25-30 células sanas (Reikvam et al 2011). Ya ha sido reportado antes la identificación de la t(8;21) por medio de la técnica de RT-PCR (Van Dongen et al 1999).

No se ha reportado la utilización de la metodología taguchi para la optimización de la técnica de PCR en la identificación de la t(8;21) asociada a LMA. Sin embargo, se ha utilizado en muchos otros campos de la biología, particularmente en diversas aéreas como fermentación, procesamiento de comida y biología molecular dando resultados muy favorables (Rao et al 2008). Por tal motivo, resulta verdaderamente atractivo el uso de esta técnica para lograr las condiciones optimas en la detección de la anormalidad cromosómica t(8;21) por medio de PCR, para de esta manera, poder lograr un diagnostico más acertado.

4. JUSTIFICACIÓN

La LMA no es una sola entidad patológica, sino que representa un grupo heterogéneo de neoplasias. Esta heterogeneidad se ejemplifica con los resultados clínicos variables que se observan en los pacientes con LMA, y es en gran parte el resultado de diversas mutaciones en las células leucémicas. Se requiere de la detección de muchas de estas mutaciones en pacientes con LMA para conocer el pronóstico del afectado, dar un diagnóstico exacto y administrar el tratamiento adecuado. Como tal, muchas modalidades de pruebas se han desarrollado y actualmente se están empleando en los laboratorios clínicos con el propósito de identificar la anormalidad genética asociada a la LMA. Los ensayos incluyen aquellos que identifican específicamente grandes alteraciones cromosómicas, tales como análisis citogenético y de Fluorescencia de Hibridación In Situ (FISH), y los métodos que se orientan más hacia el análisis de pequeñas mutaciones, tales como PCR con primers específicos. Es recomendable el uso de la técnica de PCR para el diagnóstico de la enfermedad, ya que es menos costoso, más rápido y fácil de realizar. Además, el uso de esta técnica nos permite el seguimiento de la enfermedad y de esta manera, administrar al paciente una terapia temprana en caso de recaída, la cual resultaría más eficaz que una terapia tardía. También proporciona una ventaja potencial para la terapia temprana que resulta de la detección de enfermedad mínima residual por PCR (Reikvam et al 2011). Para lograr un diagnóstico más acertado de LMA con t(8;21), es preciso hacer la identificación de esta por medio de una técnica molecular altamente sensible (como la PCR) haciendo uso de un control interno de la reacción, para de esta manera, poder identificar los falsos negativos de la amplificación y aumentar así la fiabilidad de su detección. La optimización de dicha prueba puede lograrse por medio de un experimento factorial. Sin embargo, este suele consumir mucho tiempo y es relativamente costoso. Un método no muy diferente del método factorial es el método Taguchi, el cual, está basado en Arreglos Ortogonales (AO) y a diferencia del primero, éste es mucho más rápido de realizar y suele ser mucho más económico (Pérez Contreras et al 2012).

Ya había sido reportada antes la utilización de la metodología Taguchi para lograr la optimización de un programa de RT-PCR para la identificación de alteraciones cromosómicas asociados a leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) (Galindo Jiménez et al 2013), logrando resultados favorables. Inclusive se había reportado ya antes también la utilización de esta misma metodología para la optimización de otra prueba de RT-PCR, para la identificación de marcadores moleculares asociados a neoplasias mieloproliferativas (NMP) (Pérez Contreras et al 2012), obteniéndose también resultados favorables.

5. HIPÓTESIS

Haciendo uso de la metodología Taguchi es posible la optimización de una prueba molecular basada en PCR para la identificación de la translocación cromosómica t(8;21) asociada a LMA

6. OBJETIVOS

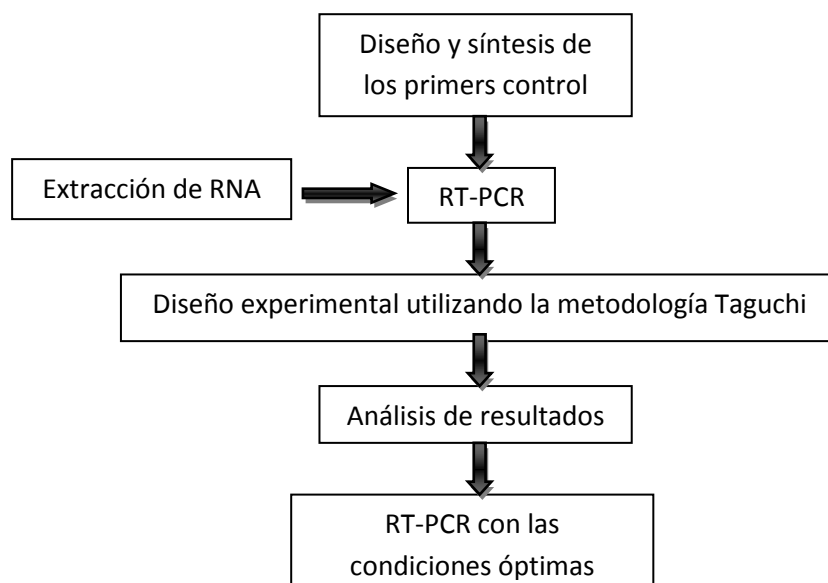
6.1. Objetivo general

Desarrollar una prueba molecular basada en PCR para la identificación de la t(8;21) que incluya un control interno de la reacción.

6.2. Objetivos específicos

- a) Desarrollar un ensayo de PCR para la identificación del marcador molecular t(8;21) asociado a LMA para su uso en la práctica diagnóstica por el laboratorio.
- b) Aplicar la metodología Taguchi basada en Arreglos Ortogonales (AO), para lograr las condiciones óptimas de la reacción de PCR en la identificación de la translocación t(8;21).

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Muestras biológicas

Se utilizaron 3 muestras anónimas con diagnóstico de Leucemia Mieloide Aguda (anteriormente M2 según la FAB) positivas para la translocación t(8;21) por análisis de cariotipo, proporcionadas por los Laboratorios Mendel. La muestra control utilizada fue proporcionada por una persona anónima aparentemente sana.

8.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevo a cabo con el kit de extracción QIAamp RNA Blood Mini Kit® de QUIAGEN® según el protocolo establecido por el proveedor, el cual consiste en lo siguiente: a 1 ml de sangre total se le agregan 5 ml de buffer EL, el cual funciona como solución de lisis estabilizadora; se centrifuga y se desecha el sobrenadante obteniendo una pastilla de células a la cual se le vuelven a agregar 3 ml del buffer EL, se centrifuga y se remueve completamente el sobrenadante. A continuación se le agregan 600 µl del buffer RTL que se encarga de llevar a cabo la lisis de los leucocitos y el lisado es pipeteado directamente en una columna QIAshredder®, se centrifuga y se desecha la columna, se agregan 600 µl de etanol libre de RNasas al 70% y se pipetea la muestra en una columna QIAamp®; se vuelve a centrifugar. La columna se transfiere a un tubo de recolección nuevo y se le agregan 350 µl del buffer RW1 el cual en este paso tiene la función de actuar como tampón de desalado de membrana, se centrifuga nuevamente y se desecha el filtrado. A la columna QIAamp® se le coloca el mix formado por 10 µl DNasa I y 80 µl buffer RDD que actúa como tampón de reacción de la DNasa, se le añade el buffer RW1 que en este paso funcionan como solución stop de la DNasa y se centrifuga desechando el filtrado. Se transfiere la columna a un tubo de recolección nuevo y se agregan 500 µl de buffer RPE o solución de lavado, se centrifuga y se le vuelven añadir 500 µl de buffer RPE a la columna, se centrifuga nuevamente y se transfiere la columna a un tubo de 1.5 ml colocando directamente en la membrana de la columna 30 µl de agua libre de RNasas. Por último se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifuga. Todo el procedimiento se realizó en hielo y se llevo a cabo lo más rápido posible. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

8.3 Cuantificación e índice de pureza

La cuantificación del rendimiento del RNA obtenido se realizó con el espectrofotómetro Biophotometer® de la marca eppendorf® y utilizando las celdas UVette® de 220-1600 nm de la misma marca. Para llevar a cabo la lectura se utilizó como blanco agua libre de

nucleasas, después se preparó la dilución 1:50 de la muestra de RNA con agua libre de nucleasas, se colocó en la celda y se lee en la modalidad RNA. Debido a que el espectrofotómetro nos da la concentración de RNA en ng/ml es necesario hacer la conversión de los mismos a µg/ml, para lo cual utilizamos la siguiente ecuación.

$$\text{concentración de ARN en } \mu\text{g/ml} = \frac{\text{concentración de ARN en ng/ml (factor de dilución)}}{1000}$$

Los índices de pureza fueron obtenidos a partir de la lectura realizada en el espectrofotómetro el cual nos arrojó una lectura en las relaciones 260/280 y 260/230 respectivamente, dichas lecturas proporcionadas por el espectrofotómetro nos indican la pureza del RNA en relación con la cantidad de proteínas y sales presentes una vez ya finalizada la extracción.

8.4. Preparación del cDNA a partir del RNA

La conversión del RNA a cDNA se realizó con el kit Omniscript Reverse Transcription kit® de la marca QIAGEN®, y al igual que con la extracción del RNA se realizó en hielo, lo más rápido posible y según lo establecido en el protocolo proporcionado por el proveedor, en un tubo CERTIFIED® libre de RNasas, DNasas y pirógenos; se agregó 1 µl de la solución de Random Primers, 2 µl de buffer RT al 10x, 2 µl de dNTP Mix y agua libre de RNasas (la necesaria para completar a 20 µl), se mezcló en vortex y se centrifugó brevemente. A continuación se le adicionó la solución del inhibidor de la RNasa, se vuelve a mezclar por vortex y centrifugar brevemente. Por último le agregamos 0.5 µg de RNA y 1 µl de la enzima Omniscript Reverse Transcriptase® y volvemos a mezclar por vortex y centrifugar. Una vez ya preparada la mezcla se lleva a cabo la reacción de RT-PCR en el termociclador corbett® a 37 °C durante una hora.

8.5. Diseño de los primers control

El diseño de los primers control AML1-D y AML1-R se realizó con ayuda del software Oligoanalyzer, a partir de la secuencia del RNAm del gen AML-1 y tomando en cuenta los siguientes parámetros: longitud, la cual, debe de ser de 18 a 30 pares de bases, el contenido de guaninas y citocinas que debe de ser de 45% al 65%, la temperatura de alineamiento que debe de estar entre los 50°C y 65°C, y su secuencia actual; parámetros que pudieran interferir en la interacción de estos con el DNA a amplificar. Además de

verificar que no formaran estructuras secundarias entre ellos mismos o con otros primers utilizados en la misma reacción de PCR, o que no tuvieran repeticiones TTTT, CCCC, GGG o AAAA, que de igual manera pudieran interferir en la interacción de estos con su DNA complementario. Mientras que los primers encargados de identificar la t(8;21) fueron tomados de la publicación de Van Dongen et al (1999). La secuencia y localización de cada uno de los primers se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Localización y secuencia de cada uno de los primers utilizados para la identificación de la t(8;21).

Primer	Gen	Exón	Secuencia
AML1-A	AML-1	2	CTACCGCAGCCATGAAGAACC
ETO-B	ETO	4	AGAGGAAGGCCATTGCTGAA
AML1-D	AML-1	1	CTGAGTCACCCAGCTGATGTAG
AML1-R	AML-1	1	CACGAATCTTGCTTGCAGAGGT

8.6. Reacciones de PCR para la detección de la translocación t(8;21)

Las reacciones de PCR fueron realizadas con el kit QIAGEN Multiplex PCR® y de acuerdo a lo establecido en el protocolo proporcionado por el proveedor. En un tubo CERTIFIED® libre de RNasas, DNasas y pirógenos se agregaron los primers, el agua libre de nucleasas (cuanto sea necesario para completar a 25 µl) y posteriormente se añadieron 12.5µl del Master Mix®, se mezcló mediante vortex y se centrifugó brevemente. A continuación se le adicionaron 2 µl de cDNA, se mezcló y centrifugó nuevamente y se colocó el mix en el termociclador Corbett® para llevar a cabo la reacción de PCR.

8.7. Análisis electroforético de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1.6% y revelados con Bromuro de Etidio al 0.01%. Una vez ya revelados fueron fotografiados con el aparato Chemi-Doc de la marca Bio-Rad®.

8.8. Optimización del ensayo por metodología Taguchi.

Se llevo a cabo la optimización del ensayo para la identificación de la translocación t(8;21) utilizando como referencia la metodología Taguchi, la cual, está basada en arreglos

ortogonales (AO). Se diseñó un AO L_4 (Tabla 10) para poder lograr la optimización de dicho ensayo utilizando las variables y los valores de las variables mostradas en las tablas 14.

8.9. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos de los diseños experimentales fueron analizados por medio de un ANOVA resuelto por mínimos cuadrados, utilizando las formulas necesarias para el análisis por metodología Taguchi basadas en arreglos ortogonales (AO) mostradas en la tabla 12.

Tabla 12. Formulas utilizadas para los cálculos de los análisis de resultados.

Formula	Descripción
$Fi = \frac{(\Sigma Fi)}{n}$	Promedio de los factores, se usa para obtener la sumatoria de los efectos de cada variable a sus diferentes niveles
$SSF = \frac{(F_2 - F_1)^2}{N}$	Suma de cuadrados
$MS = \frac{SSF}{gl}$	Cuadrado medio
$F0 = \frac{MSi}{MSerror}$	F calculada, se utiliza para obtener el estadístico de cada factor y representar el índice de variación respecto al error
$Yest = \bar{y} + \Sigma Effi$	Y estimada, indica la predicción de Y con los valores considerados como óptimos para cada variable

9. RESULTADOS

9.1. Selección de muestras para la identificación de la translocación t(8;21).

Las muestras seleccionadas para la identificación de la t(8;21) (Tabla 13) fueron previamente identificadas como muestras con leucemia mieloide aguda tipo M2 (según la clasificación FAB) y como positivas para la t(8;21) mediante análisis de cariotipo (Figura 7).

Tabal 13. Muestras utilizadas para la identificación de la t(8;21).

Muestra	Clave	t(8;21)
1	SC-18	Positiva
2	SC-25	Positiva
3	SC-28	Positiva
4	SC-27	Negativa

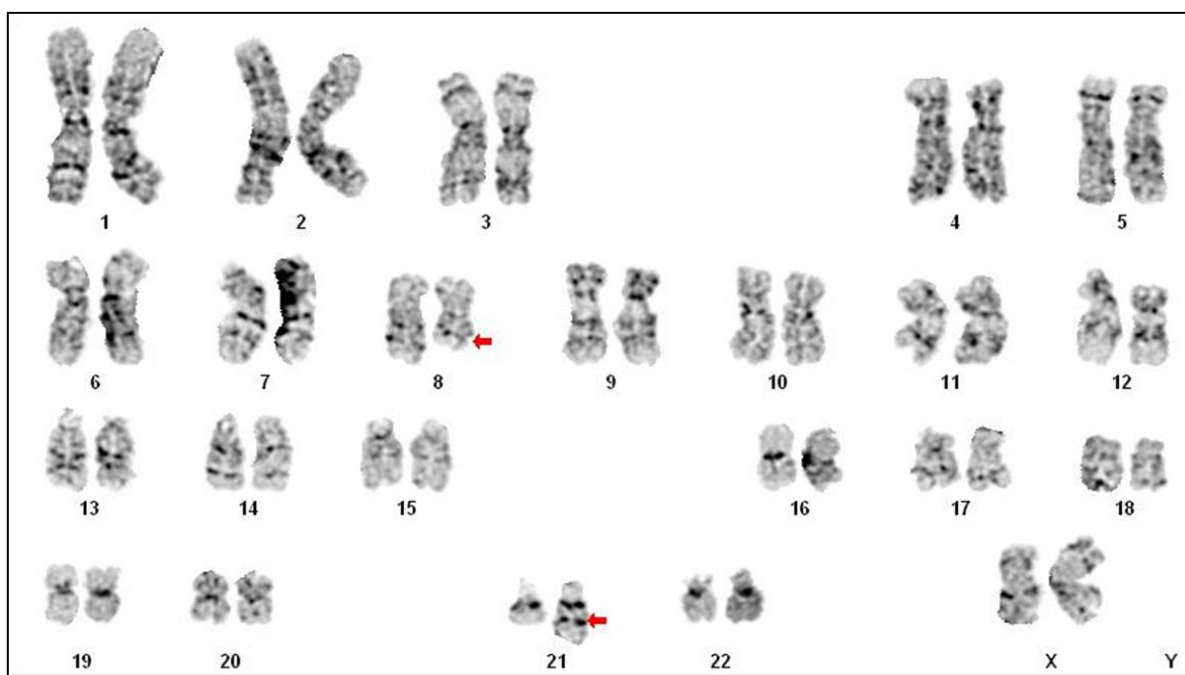


Figura 7. Muestra SC-18 identificada como t(8;21) positiva por análisis de cariotipo.

9.2. Diseño de los primers control AML1-D y AML1-R

Los primers control fueron diseñados en el exón 1 del gen AML-1, ya que esta es una región del gen que se encuentra fuera del alcance de los puntos de ruptura del mismo involucrados en la t(8;21), y por lo tanto, la banda amplificada por este par de primers (de 751 pb) estará presente tanto si se encuentra la t(8;21), o si está ausente en la muestra. En la figura 8 se muestra la región en la cual se encuentra cada uno de los 4 primers, tanto

el par de estos encargados de identificar la t(8;21), como el par diseñado por nosotros que actúan como control interno de la reacción. A demás, se lograron diseñar de acuerdo con los parámetros establecidos, y con los valores de temperatura de alineamiento y porcentaje de guaninas y citocinas cercano a los valores de estos mismos parámetros para los primers encargados de identificar la t(8;21); para que de esta manera, lleven a cabo su función a las mismas condiciones de reacción.

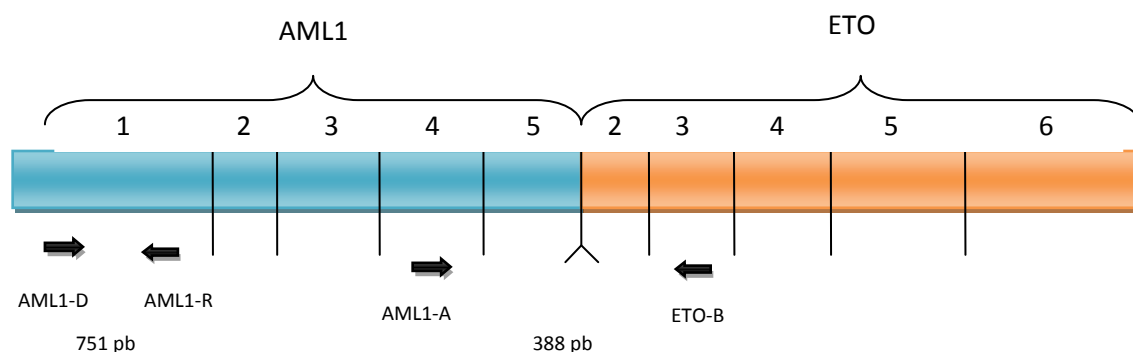


Figura 8. Localización de los primers encargados de identificar la t(8;21) (AML1-A y ETO-B), y los primers control (AML1-D y AML1-R)

9.3. Prueba de los primers control AML1-D y AML1-R.

Con la finalidad de verificar que los primers AML1-D y AML1-R funcionaran adecuadamente y amplificaran la banda esperada de 751 pares de bases, se realizó una reacción de PCR en una muestra positiva por análisis de cariotipo para t(8;21) y una negativa para la misma (muestra 1 y 4 tabla 13) haciendo uso solo de este par. Las reacciones de PCR se llevaron bajo las mismas condiciones establecidas para los primers AML1-A y ETO-B por van Dongen et al (1999) (condiciones iniciales de reacción), ya que al momento de realizarse el diseño del par de estos nombrados como AML1-D y AML1-R se verifico que estos tuvieran unos valores de los parámetros como temperatura de alineamiento y contenido de guaninas y citocinas similar al los de los primers AML-A y ETO-B. Los amplificados obtenidos fueron separados en agarosa, revelados y fotografiados (Figura 9); lográndose observar que efectivamente amplificaron la banda de la longitud esperada, lo cual nos indica que ambos primers cumplen con su función como control interno de la reacción de forma efectiva.

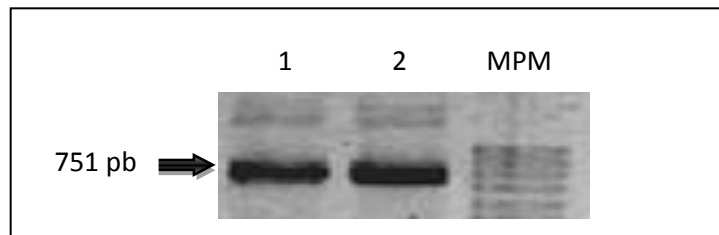


Figura 9. Análisis electroforético de los PCRs realizados con los primers control (AML1-D y AML1-R). Los amplificados obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde a la muestra SC-28 negativa para la t(8;21), el carril 2 corresponde a la muestra SC-18 positiva para la misma. MPM corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

9.4. Identificación de la translocación t(8;21) en una muestra con LMA.

A continuación se realizó una reacción de PCR para las mismas muestras utilizando el par de primers control, más el par encargado de identificar la t(8;21) (primers AML1-A y ETO-B), bajo las condiciones iniciales de reacción. los productos de PCR obtenidos fueron separados, rebelados y fotografiados, obteniéndose en ambas muestras la banda control de 751 pb, además de obtenerse la banda de la translocación de 388 pb en la muestra 1 (muestra positiva para la t(8;21)); los resultados se muestran en la figura 10. Sin embargo, al momento de llevar a cabo el análisis electroforético de los productos de PCR, se observó que en este mismo hubo una marcada presencia de inespecificidades, motivo por el cual fue necesario llevar a cabo la optimización de la prueba para lograr obtener unas bandas más claras libres de inespecificidades, que pueden interferir al momento de la identificación de la translocación t(8;21).

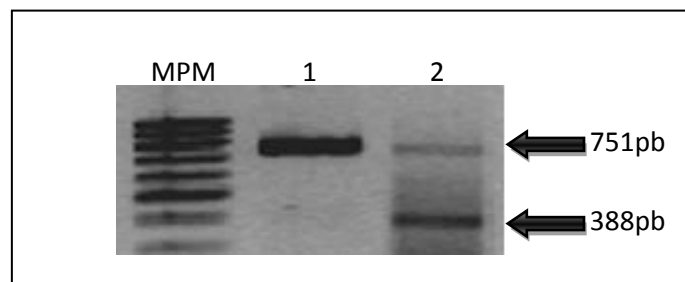


Figura 10. Analisis electroforético de los PCRs realizados tanto con el par de primers control como con el par encargados de identificar la translocación t(8;21). Ambos amplificados fueron separados en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. 1) muestra SC-28 negativa para la t(8;21), 2) muestra SC-18 positiva para la t(8;21), (MPM) Marcador de peso molecular de 100 pb.

9.5. Optimización de la prueba por metodología Taguchi

Para lograr la optimización de la prueba se hizo uso de la metodología Taguchi, la cual, está basada en Arreglos Ortogonales (AOs). Para ello primero se identificaron las variables que más contribuyen en la variabilidad del producto y por tanto en la calidad del mismo, las cuales, fueron las siguientes: A) temperatura de alineamiento, B) tiempo de alineamiento y C) número de ciclos. A continuación se diseñó un AO_{L4}, ya que este es capaz de analizar 3 variables en 4 corridas experimentales (tabla 10), después se le asignó un nivel bajo y un nivel alto a cada una de las variables y se sustituyeron los valores en el AO_{L4} (tabla 14). Ya establecidos las condiciones de cada uno de los 4 PCR, estos fueron realizados utilizando la muestra positiva para la t(8;21) (SC-18); los productos de los PCRs fueron cuantificados en el espectrofotómetro obteniéndose los valores de la tabla 15, consecutivamente se efectuó un análisis electroforético de cada uno de los ensayos observándose en cada uno de los mismos tanto la banda del control como la banda de la mutación (figura 11).

Tabla 14. Arreglo Ortogonal Taguchi L₄ utilizado para lograr la optimización del ensayo.

Ensayo	A) Temperatura de alineamiento	B) Tiempo de alineamiento	C) Número de ciclos
1	56°C	45 seg	30
2	60°C	45 seg	35
3	56°C	90 seg	35
4	60°C	90 seg	30

Tabla 15. Valores de la concentración de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal Taguchi

L ₄	
Ensayo	µg/µl
1	12.2
2	12.6
3	19.1
4	8.5

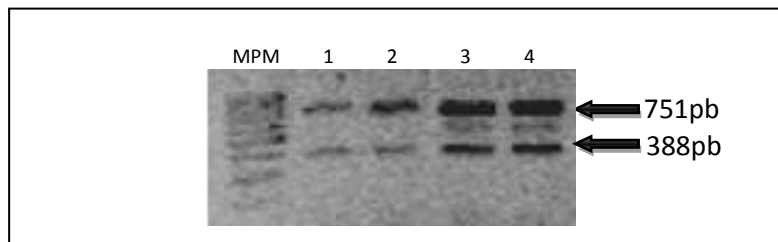


Figura 11. Análisis electroforético de los ensayos realizados con el arreglo ortogonal Taguchi L_4 en la muestra SC-18 positiva para t(8;21). Los amplificados obtenidos de cada uno de los ensayos de este primer AO L_4 , fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. Los números indican el número de cada uno de los ensayos realizados con sus correspondientes condiciones.

Para determinar los valores óptimos a utilizar de cada una de las variables, se realizó lo siguiente: en primer lugar sustituimos los valores de la cuantificación de cada ensayo en el AO L_4 (tabla 16), para calcular la sumatoria de cada uno de los niveles (nivel 1 y nivel 2) para cada variable y determinar qué nivel de cada una de las variables contribuyó mas en el ensayo. A continuación se calculo el estadístico F0 (índice de variación) y el porcentaje de contribución de cada una de las mismas obteniendo los valores mostrados en la tabla 18; y se calculo la Yest dándonos un resultado de 18.4.

Tabla 16. Sumatoria de los niveles 1 y 2 de cada variable. Los números 1 y 2 en superíndice indican los niveles 1 y 2 del AO L_4

Ensayos	A) Temperatura de alineamiento	B) Tiempo de alineamiento	C) Numero de ciclos
1	¹ 12.2 µg/µl	¹ 12.2 µg/µl	¹ 12.2 µg/µl
2	¹ 12.6 µg/µl	² 12.6 µg/µl	² 12.6 µg/µl
3	² 19.1 µg/µl	¹ 19.1 µg/µl	² 19.1 µg/µl
4	² 8.5 µg/µl	² 8.5 µg/µl	¹ 8.5 µg/µl
Σ nivel 1	24.8 µg/µl	31.3 µg/µl	19.1 µg/µl
Σ nivel 2	27.6 µg/µl	21.1 µg/µl	8.5 µg/µl
Σ nivel 1 y 2	52.4 µg/µl	52.4 µg/µl	52.4 µg/µl

Tabla 17. Contribución de las variables para la detección de la translocación t(8;21).

Clave	Variable	F0	% de contribución
A	Temperatura de alineamiento	1.961	3.366
B	Tiempo de alineamiento	13.27	44.675
C	Numero de ciclos	15.43	51.95

Según lo establecido en la metodología Taguchi se toman en cuenta tres criterios para hacer la determinación de cuáles podrían ser los valores óptimos para lograr el ensayo óptimo, dichos criterios son los siguientes.

- El mayor es el mejor
- El menor es el mejor
- El nominal es el mejor

En nuestro caso y de acuerdo a los valores obtenidos de los porcentajes de contribución mostrados en la tabla 17, fue tomado en cuenta el primer criterio, el mayor es el mejor, por lo cual, se tomaron los valores de los niveles bajos de la temperatura de alineamiento y el numero de ciclos (variables B y C tabla 16) y el nivel alto del tiempo de alineamiento (variable A tabla 16); obteniendo al final las condiciones óptimas para la identificación de la t(8;21) (tabla 18).

Tabla 18. Condiciones óptimas para la identificación de la t(8;21).

Variable	Condiciones óptimas
Temperatura de alineamiento	60 °C
Tiempo de alineamiento	45 seg
Nuero de ciclos	30 ciclos
Concentración de Master mix	12.5 µl
Concentración de cADN	2 µl
Concentración de AML1-A	1 µl al 10 µM
Concentración de ETO-B	1 µl al 10 µM
Concentración de AML1-D	1 µl al 5 µM
Concentración de AML1- R	1 µl al 5 µM
H ₂ O libre de nucleasas	Cuanta sea necesaria para 25 µl

9.6. PCR con las condiciones óptimas para la identificación de la translocación t(8;21).

Una vez ya determinadas las condiciones óptimas a utilizar para la identificación de la t(8;21), se procedió a realizar un PCR con estas mismas en dos muestras positivas por análisis de cariotipo para la t(8;21) (muestras 2 y 3 tabla 13) mas la muestra control (muestra 4 tabla 13). A continuación se cuantifico la concentración de DNA amplificado en cada uno de los PCRs (tabla 19) obteniendo resultados cercanos al calculado con la Yest, lo cual indica que el experimento es reproducible; y se realizó el análisis electroforético de cada uno de estos mismos (figura 12), en el cual se observa que las inespecificidades que se presentaban con las condiciones iniciales fueron eliminadas, logrando de esta manera unos resultados más claros y precisos.

Tabla 19. Resultados de la cuantificación de los productos de PCR llevados a cabo con las condiciones óptimas obtenidas de ambos arreglos ortogonales Taguchi.

Muestra	µg/ml
SC-28	21
SC-25	18.2
SC-27	19.3

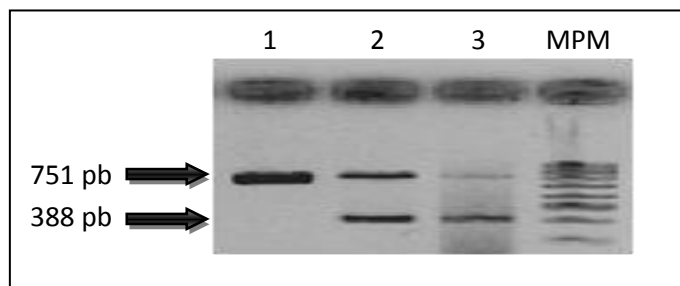


Figura 12. Análisis electroforético de los ensayos realizados en dos muestras positivas para la t(8;21) y una muestra negativa con las condiciones óptimas. Los amplificados fueron separados en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. 1) muestra SC-28 negativa para la t(8;21), 2) muestra SC-27, 3) muestra SC-25, MPM) Marcador de peso molecular.

Por último se compararon dos productos de PCR realizados con las condiciones iniciales, contra otros dos realizados con las condiciones óptimas, verificando que efectivamente se lograron eliminar casi por completo las interferencias que se presentaban en los primeros ensayos con las condiciones iniciales. En la figura 13 se puede preciar la comparación entre los productos antes mencionados. Para ambas reacciones de PCR se utilizaron las mismas muestras una positiva para la t(8;21) (muestra 2) y la muestra control negativo (muestra 4). En la imagen se puede observar que en los productos de PCR con las condiciones iniciales hay bastante interferencia que incluso pareciera que la muestra control negativo tuviera presente la banda de la translocación t(8;21) cuando realmente no es así, mientras que en el amplificado de la misma muestra con las condiciones óptimas, esta banda desaparece por completo; además de eliminarse el barrido que se presentaba con las condiciones iniciales, mostrando unas bandas más claras que pueden ser interpretadas de mejor manera, disminuyendo la posibilidad de obtener falsos positivos y logrando una mayor veracidad en el ensayo.

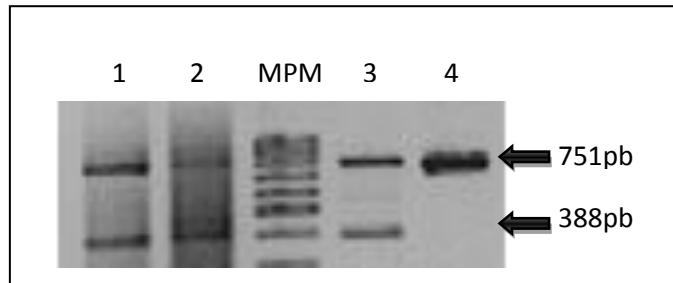


Figura 13. Análisis electroforético comparativo de la detección de la translocación t(8;21). Los amplificados fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%. 1) PCR de la muestra SC-25 con las condiciones iniciales, 2) PCR de la muestra SC-28 (negativa para la t(8;21)) con las condiciones iniciales, 3) PCR de la muestra SC-25 con las condiciones óptimas finales, 4) PCR de la muestra SC-28 con las condiciones óptimas finales. (MPM) Marcador de peso molecular.

10. DISCUSIÓN

Recientemente la OMS ha clasificada a las LMA con anormalidades citogenéticas recurrentes en un grupo distinto, ya que cada una de estas presenta un criterio de diagnostico diferente, además de que no todas responden al mismo tratamiento y de la misma manera. La identificación de la anormalidad citogenética asociada a la LMA que afecta a los pacientes, nos ayuda en la pronta y adecuada terapia de los mismos con fármacos selectivos. La translocación t(8;21) es uno de los marcadores moleculares más comunes asociados a LMA, principalmente en pacientes pediátricos y geriátricos. Es recomendable el uso de la técnica de PCR para la identificación de esta anormalidad citogenética, ya que este método consume poco tiempo y es relativamente económico; además de ser altamente sensible.

En 1999 Van Dongen et al reporta la identificación de la t(8;21) en pacientes con enfermedad mínima residual mediante RT-PCR, haciendo uso de cinco primers diseñados por ellos mismos (nombrados como AML1-A, ETO-B, AML1-C, ETO-D y AML1-E5'), de los cuales, tres están posicionados en el gen AML1 y los otros dos en el gen ETO respectivamente. Para poder identificar la t(8;21), nosotros hicimos uso de los primers AML1-A y ETO-B (tabla 11) que amplifican un fragmento de DNA de 388 pares de bases aproximadamente (figura 8), pero, además del par de estos encargados de la identificación de la translocación, necesitábamos otro par adicional que funcionara como control interno de la reacción. Pallisgaard et al (1998) reporta la identificación de la t(8;21) mediante RT-PCR haciendo uso de un par de primers encargados de identificar la t(8;21), y otro par que funciona como control interno de la reacción, sin embargo, el par de estos que funcionan como control interno están localizados en una región diferente a la de los genes involucrados en la translocación. Por tal motivo se diseñaron los primers AML1-D y AML1-R, los cuales, están localizados en el exón 1 del gen AML-1. De esta manera, el par de estos diseñados por nosotros que funcionan como control interno de la reacción está localizado en una región de uno de los genes involucrados en la translocación, pero a su vez, están fuera del alcance de los puntos de ruptura y su secuencia no se ve afectada por dicha anormalidad; y por lo tanto el amplificado por estos dos, estará presente en todas las muestras ya sean positivas o negativas para la t(8;21). Una vez ya establecida la región a partir de la cual se diseñarían el par de primers control, estos fueron diseñados con ayuda del software Oligoanalyzer® y tomando en cuenta determinados parámetros que pudieran interferir en la interacción de estos con su DNA a amplificar. Debido a que los primers encargados de identificar la t(8;21) ya habían sido previamente diseñados, se cuidó que el par diseñado por nosotros tuviera unos valores de estos parámetros similares a los del par encargados de identificar la t(8;21), para que de esta manera, ambos pares llevaran a cabo su función a las mismas condiciones de reacción. Tomando en

consideración también que el par de primers diseñados por nosotros amplificaran un número de bases distinto al amplificado por los ya previamente diseñados, de tal forma que al momento de ejecutar el análisis electroforético las 2 bandas amplificadas por ambos pares, se separaran una de la otra. De esta manera, es posible identificar cada una de las bandas como independientes una de otra sin que haya problemas de interferencia por amplificar un número de bases similares.

Una vez ya diseñados y sintetizados los primers AML1-D y AML1-R, estos fueron probados con las mismas condiciones establecidas por van Dongen et al (1999) para el par de estos diseñados por ellos mismos (primers AML1-A y ETO-B), para verificar que precisamente funcionaran con las mismas condiciones de reacción y que amplificaran el número de bases esperado (751 pb), observando que efectivamente cumplieron con este objetivo, pero, produciendo una gran cantidad de inespecificidades (figura 9). Logrado lo anterior, a continuación se probaron ambos pares de primers con las mismas condiciones en dos muestras, una muestra proveniente de un paciente aparentemente sano y la otra proveniente de un paciente con LMA, la cual previamente ya había sido identificada como t(8;21) positiva por análisis de cariotipo (ambas muestras fueron de pacientes anónimos), identificando en ambas muestras la banda control de 751 pb y en la segunda además la banda de la t(8;21) de 388 pb, pero, al igual que en la primera reacción de PCR, también hubo una marcada presencia de inespecificidades (figura 10). Para lograr la eliminación de estas, producidas durante el ensayo, se optó por hacer un diseño experimental basándonos en la metodología Taguchi, y de esta manera, obtener unas condiciones óptimas para la reacción de PCR y lograr un análisis electroforético sin inespecificidades; y poder dar al paciente un diagnóstico fiable y acertado. Para poder llevar a cabo la optimización del ensayo usando la metodología Taguchi primero se identificaron las variables que más contribuyen en la reacción de PCR, lográndose identificar como las más importantes tres de estas, las cuales fueron, la temperatura de alineamiento, el tiempo de alineamiento y el número de ciclos según lo establecido en la literatura; además de estas tres, otras variables han sido reportadas como contribuyentes en la variabilidad del producto tales como: la concentración del MgCl₂, la concentración del DNA y la concentración de los dNTPs (Mullis et al 1994), sin embargo, debido al hecho de que para el presente trabajo se utilizó el kit QIAGEN Multiplex PCR® para llevar a cabo los PCRs, estas no se tomaron en consideración, ya que este proporciona un Master mix con las concentraciones adecuadas de MgCl₂ y dNTPs, además de proporcionar un protocolo el cual establece la concentración apropiada de cDNA a utilizar. Una vez ya identificadas las variables que más contribuyen en el proceso de la reacción, se debe de seleccionar el arreglo ortogonal a utilizar, el cual, va a depender del número de variables que se tenga; en nuestro caso, debido al hecho de que tenemos 3 variables que analizar, se seleccionó un AOL₄, que nos permitió hacer el análisis de estas tres variables en cuatro corridas

experimentales. A cada variable se le asignó un nivel alto y un nivel bajo (tabla 14), se efectuó cada uno de las reacciones de PCR con los correspondientes valores de cada variable y se realizó el análisis electroforético de los cuatro ensayos (figura 11). Obtuvimos los valores de concentración del DNA amplificado de cada uno de los mismos, y los utilizamos para determinar los porcentajes de contribución y el índice de variación (F) de cada una de las variables (tabla 17). Si el índice de variación de determinada variable es mayor a 2, nos indica que el aporte de contribución de esta es significativo para el experimento, y tanto la temperatura de alineamiento como el número de ciclos tienen un índice de variación mayor a 2. Este análisis también determina el nivel óptimo a utilizar de cada variable y su efecto sobre la reacción. Para lograr los valores óptimos de cada variable, Taguchi propone tres criterios que deben de considerarse: el mayor es el mejor, el menor es el mejor y el nominal es el mejor. Dependiendo lo que se desee obtener se deberá de tomar en consideración el criterio que más convenga. En nuestro caso el criterio más conveniente y el que se tomó en consideración fue el mayor es el mejor, tomando de esta manera el nivel bajo del tiempo de alineamiento y el nivel alto de la temperatura de alineamiento y el número de ciclos (tabla 16). Por último se calculó la Yest, la cual, nos dio un valor de 18.4ng/μl, esta nos da un valor aproximado de la concentración que se debería de obtener al realizar un PCR con las condiciones óptimas determinadas a partir del AO Taguchi. El cálculo de la Yest que estuvo entre el rango del DNA amplificado en cada una de las corridas experimentales, indica que estas reflejan el comportamiento de la reacción en un 98.039%, de acuerdo al grado de confianza de la prueba (aportación del error = 1.961%).

Ya establecidos los valores a utilizar de cada una de las variables, se llevó a cabo una reacción de PCR con las condiciones óptimas (tabla 18) en dos muestras anónimas que resultaron ser previamente positivas para la t(8;21) por análisis de cariotipo y una muestra negativa (figura 12). Obsérvese que para realizar los PCRs con las condiciones óptimas se utilizó un volumen de los primers AML1-A y ETO-B de 1μl a una concentración de 10μM (concentración final en la mezcla de reacción 0.4μM), mientras que de los primers AML1-R y AML1-D se utilizó un volumen de 1μl a una concentración de 5μM (concentración final en la mezcla de reacción 0.2μM); esto debido al hecho de que el fragmento amplificado por los primers AML1-D y AML1-R se encuentra presente tanto en el gen de fusión (AML1-ETO) como en el gen normal (ya que esta anomalía cromosómica suele ser heterocigota), mientras que el fragmento amplificado por los primers AML1-A y ETO-B solo está presente en el gen de fusión ya que su finalidad es la identificación de esta misma. Los productos de los PCRs fueron cuantificados en el espectrofotómetro utilizando una dilución 1:50 (tabla 19), obteniéndose unos valores de concentración de DNA amplificado en cada uno de los PCRs cercano al esperado (Yest=18.4), lo cual, indica que el experimento es reproducible. A continuación se realizó el análisis electroforético de los

productos de los PCRs (figura 12) observando que se lograron eliminar las inespesificidades que se presentaban al realizarse la identificación de la t(8;21) con las condiciones iniciales. Para finalizar el presente trabajo de investigación, se realizaron dos reacciones de PCR utilizando dos muestras diferentes, una muestra positiva para la t(8;21) y otra negativa para la misma. La primera reacción de PCR fue llevada a cabo con las condiciones iniciales (condiciones con las que se hicieron las primeras reacciones de PCR del presente trabajo). Mientras que la segunda reacción se efectuó con las condiciones optimas finales obtenidas a partir del AO realizado. Los productos de ambos PCRs fueron analizados mediante un mismo análisis electroforético, esto con la finalidad de compararlos, logrando observar como los productos del PCR con las condiciones iniciales presentan bastantes inespecificidades, que incluso pareciera estar presente la banda de la translocación t(8;21) en la muestra negativa para la misma. Mientras que en los productos del PCR con las condiciones optimas, estas inespecificidades fueron eliminadas casi por completo dándonos unos resultados más claros y precisos (figura 13).

11. CONCLUSIONES

- Se realizó una prueba molecular basada en PCR para la identificación de la anormalidad cromosómica t(8;21), que incluye un par de primers encargados de identificar esta misma y otro par adicional que funcionara como control interno de la reacción. De esta manera, se logro una prueba molecular más fiable capaz de identificar los falsos positivos de la amplificación.
- Haciendo uso de la metodología Taguchi se llevo a cabo la optimización de la prueba, lográndose eliminar varias inespecificidades que se presentaban al principio del presente trabajo, que interferían con la identificación de la banda de la t(8;21) al momento de realizar el análisis electroforético de los PCRs.
- Por último, logramos una prueba molecular óptima basada en la técnica de PCR, para identificar la t(8;21) asociada a LMA, la cual, puede ser utilizada en la práctica diagnostica por el laboratorio.

12. REFERENCIAS

Abbas, A.K., Robbins, S.L., Fausto, N., Mitchell, R.N. (2013). Patología Humana. (9ª edición): Elsevier España.

Ajore, R., Kumar, P., Dhanda, R.S., Gullberg, U., Olsson, I. (2012). The leukemia associated nuclear corepressor ETO homologue genes MTG16 and MTGR1 are regulated differently in hematopoietic cells. *BMC Molecular Biology*, 13:11.

Arber, D.A., Stein, A.S., Carter, N.H., Ikle, D., Forman, S.J., Slovak, M.L. (2003). Prognostic Impact of Acute Myeloid Leukemia Classification. *Am J Clin Pathol*, 119, 672-680.

Cabezas-Wallscheid, N., Eichwald, V., de Graaf, J., Löwer, M., Lehr, H.A., Kreft, A., Eshkind, L., Hildebrandt, A., Abassi, Y., Heck, R., Dehof, A.K., Ohngemach, S., Sprengel, R., Wörtge, S., Schmitt, S., Lotz, J., Meyer, C., Kindler, T., Zhang, D.E., Kaina, B., Castle, J.C., Trumpp, A., Sahin, U., Bockamp, E. (2013). Instruction of haematopoietic lineage choices, evolution of transcriptional landscapes and cancer stem cell hierarchies derived from an AML1-ETO mouse model. *EMBO Mol Med* 5, 1–17.

Corpora, T., Roudaia, L., Oo, Z.M., Chen, W., Manuylova, E., Cai, X., Chen, M.J., Cierpicki, T., Speck, N.A., Bushweller, J.H. (2010). Structure of the AML1-ETO Nervy domain – PKA(RII α) complex and its contribution to AML1-ETO activity. *J Mol Biol.* 24, 402(3), 560–577.

Crespo-Solís, E. (2010). Epidemiología de las leucemias agudas. *Revista de Hematología Vol. 11*, Supl, p. 37-39

Ferré, F.J. Rius, X. (2006). Introducción al diseño estadístico de experimentos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica Universitat Rovira i Virgili.

Fujita, Y., Nishimura, M., Taniwaki, M., Abe, T., Okuda, T. (2001). Identification of an alternatively spliced form of the mouse AML1/RUNX1 gene transcript AML1c and its expression in early hematopoietic development. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1248-1255.

Galindo Jiménez LI. (2013). Desarrollo de un RT-PCR multiplex para el diagnóstico de la Leucemia Linfocítica Aguda de tipo B (LLA-B) basado en metodología Taguchi. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich.

Gow, C.H., Guo, C., Wang, D., Hu, Q., Zhang, J. (2013). Differential involvement of E2A-corepressor interactions in distinct leukemogenic pathways. *Nucleic Acids Research* 1. doi:10.1093. Vol 42.

Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., Burnett, A.K. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials, *Blood*, vol. 116, no. 3, pp. 354–365.

- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., Goldstone, A., (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*, 92,2322-2333.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., (2006). Tratado de Fisiología Médica. (11ª Edición): Elsevier.
- Haferlach, T., Kern, W., Schnittger, S., Schoch, C., (2005). Modern diagnostics in acute leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol*, 56(2):223-34.
- Hernández R, M.A., Santillán, G.S., Savelkin, V., López Parra, M. (2003). Caso de aplicación de metodología Taguchi en diseño de herramientas de muestreo de hidrocarburos. Instituto Mexicano de Petróleo. Vol 1.
- Huang, L., Abruzzo, L.V., Valbuena, J.R., Medeiros, L.J., Lin, P. (2006). Acute Myeloid Leukemia Associated With Variant t(8;21) Detected by Conventional Cytogenetic and Molecular Studies. *Am J Clin Pathol*, 125, 267-272.
- Hug B.A, Lazar, M.A. (2004). ETO interacting proteins. *Oncogene* 23, 4270–4274.
- Jemal, A., Siegel, B., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., (2008). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 58:71–96.
- Kainz, P. (2000) The PCR plateau phase- towards an understanding of its limitations. *Biochem Biophys Acta*, 1494, 23–27.
- Kaushansky, K., Lichtman, M.A., Beutler, E., Kipps, T.J., Seligsohn, U., Prchal, J.T., (2010). Williams Hematology. (8ª edición): McGraw-Hill.
- Kim, H.J., Oh, H.J., Lee, J.W., Jang, P.S., Chung, N.G., Kim, M., Lim, J., Cho, B., Kim, H.K. (2013). Utility of a multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay (HemaVision) in the evaluation of genetic abnormalities in Korean children with acute leukemia: a single institution study. *Korean J Pediatr*, 56(6), 247-253.
- L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wilström, S. (2008). Wold Design of Experiments. Principles and Applications. Umetrics AB. Umea. Suecia.
- LaFiura, K.M., Edwards, H., Taub, J.W., Matherly, L.H., Fontana, J.A., Mohamed, A.N., Ravindranath, Y., Ge, Y. (2008). Identification and characterization of novel aml1- eto fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Oncogene*, 27(36), 4933–4942.
- Levanon, D., Groner, Y. (2004). Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23, 4211–4219.
- Licht, J.D. (2001). AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene* 20, 5660 - 5679.

- Liddiard, K., Hills, R., Burnett, A.K., Darley, R.L., Tonks, A. (2010). OGG1 is a novel prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 29, doi:10.1038/onc.2009.462.
- Lin, P., Chen, L. Luthra, R., Konoplev, S.N., Wang, X., Medeiros, L.J. (2008). Acute myeloid leukemia harboring t(8;21)(q22;q22): a heterogeneous disease with poor outcome in a subset of patients unrelated to secondary cytogenetic aberrations. *Modern Pathology*, 21, 1029–1036.
- Martinez-Climent, J.A., Lane, N.J., Rubin, C.M., et al. (1995). Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. *Leukemia*;9, 95-101.
- Mckenzie, S.B. (2009). Hematología clínica. (2ª edición). Manual Moderno.
- Merino. A. (2007). Leucemias Agudas. *Ed Cont Lab Clín*, 11:48-55
- Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R.A. (1994). The polymerase chain reaction (PCR). Birkhäuser Verlag AG, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-3607-2 (H.b.). ISBN 3-7643-3750-8 (P.b.).
- Narimatsu, H. 2008. Clinical Characteristics of Acute Myeloid Leukemia with t(8;21) in Japan and Western Countries. *Leukemia vol. 22*, no. 2, pp. 428–432.
- Nishii, K., Usui, E., Katayama, N., Lorenzo, F 5th., Nakase, K., Kobayashi, T., Miwa, H., Mizutani, M., Tanaka, I., Nasu, K., Dohy, H., Kyo, T., Taniwaki, M., Ueda, T., Kita, K., Shiku, H. (2003). Characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive subtype of t(8;21) AML. *Leukemia* 17, 731–737.
- Otago, A.C. (2003). Polymerase chain reaction in the diagnosis and monitoring of patients with AML1-ETO and CBF-MYH11 gene rearrangement in acute myeloid leukaemia. Commonwealth of Australia, MSAC reference 9a (III).
- Pallisgaard, N., Hokland, P., Riishoj, D.C., Pedersen, B., Jorgensen, P. (1998). Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. *Blood*, Vol 92, No 2, 1998, pp 574-588
- Pérez Contreras, V.A. 2012. Desarrollo y validación de un panel de pruebas moleculares para el diagnóstico por laboratorio de neoplasias mieloproliferativas clásicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich.
- Peterson, L.F., Boyapati, A., Ahn, E.Y., Biggs, J.R., Okumura, A.J., Lo, M.C., Yan, M., Zhang, D.E. (2007). Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*, 110, 799-805.
- Plevin, M.J., Zhang, J., Guo, C., Roeder, R.G., Ikura, M. (2006). The acute myeloid leukemia fusion protein AML1-ETO targets E proteins via a paired amphipathic helix-like TBP-associated factor homology domain. *PNAS* 27, VOL 103, 10242–10247.

Qiu, J., Wong, J., Tweardy, D.J., Dong, S. (2006). Decreased intranuclear mobility of acute myeloid leukemia 1-containing fusion proteins is accompanied by reduced mobility and compartmentalization of core binding factor β . *Oncogene* 25, 3982–3993.

Quintero M.V. (2005). Diagnóstico práctico de las leucemias mieloides agudas. *Rev Colomb Cancerol*, 10(4):282-290.

Raimondi, S.C., Chang, M.N., Ravindranath, Y., Behm, F.G., Gresik, M.V., Steuber, C.P., Weinstein, H.J., Carroll, A.J. (1999). Chromosomal Abnormalities in 478 Children With Acute Myeloid Leukemia: Clinical Characteristics and Treatment Outcome in a Cooperative Pediatric Oncology Group Study--POG 8821. *Blood*, 94, 3707-3716

Rao, R.S., Kumar, C.G., Prakasham, R.S., Hobbs, P.J. (2008). The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnol J* 3(4),510–523.

Reikvam, H., Hatfield, K.J., Kittang, A.O., Hovland, R., Bruserud, O. (2011). Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 104631, 23 pages doi:10.1155/2011/104631.

Rosline, H., Narazah, M.Y., Illunihayati, I., Isa, M.N., Baba, A.A. (2004). The Detection of AML1/ETO Fusion Transcript in Acute Myeloid Leukaemia in Universiti Sains Malaysia Hospital. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*, Vol. 12 (1&2).

Rowe, D., Bown, N.P. (2002). Diagnostic detection of AML1/ETO gene fusion by polymerase chain reaction. *Leukemia*, vol. 16, no. 8, pp. 1576–1577.

Roy, R.K. (1990). A Primer on the Taguchi Method, *Van Nostrand Reinhold, New York*.

Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I., Ohki, M. (2000). Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood*. volume 96, number 2.

Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Cassileth, P.A., Harrington, D.H., Theil, K.S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C.L., Head, D.R., Rowe, J.M., Forman, S.J., Appelbaum, F.R., (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 96, 4075-4083.

Telfer, J.C., Rothenberg, E.V. (2001). Expression and Function of a Stem Cell Promoter for the Murine CBFa2 Gene: Distinct Roles and Regulation in Natural Killer and T Cell Development. *Developmental Biology* 229, 363–382.

Tirado-Gómez, L.L., Betancourt, A.M., (2007). Epidemiología de las Neoplasias Hemato Oncológicas. *Cancerología* 2, 109-120

van Dongen, J.J., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Díaz, M.G., Malec, M., Langerak,

A.W., San Miguel, J.F., Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13, 1901–1928.

Vardiman, J.W., Thiele J., Arber A.D., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Lee Harris N., Le Beau M.M., Hellström-Lindberg E., Tefferi A., Bloomfield C.D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114: 937-951.

Zaidi, S.K., Dowdy, C.R., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Raza, A., Stein, J.L., Croce, C.M., Stein, G.S. (2009). Altered Runx1 Subnuclear Targeting Enhances Myeloid Cell Proliferation and Blocks Differentiation by Activating a miR-24/MKP-7/MAPK Network. *Cancer Res* 69, 8249-8255.

Zhang, Y., Strissel, P., Strick, R., Chen, J., Nucifora, G., Le Beau, M.M., Larson, R.A., Rowley, J.D. (2002). Genomic DNA breakpoints in AML1RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *PNAS* vol. 99, 3070–3075.