



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**Facultad de Químico Farmacobiología**

**TESIS**

**“Estandarización de PCR multiplex para la detección de los marcadores moleculares más comunes en la leucemia linfoblástica aguda pediátrica”.**

Para obtener el título de Químico Farmacobiólogo

**PRESENTA:**

p. Q.F.B. César Xavier Rueda Suárez

**DIRECTOR DE TESIS:**

Doctor en Ciencias Químico Biológicas  
Sergio Gutiérrez Castellanos

**COASESOR:**

Doctora en Ciencias Químico Biológicas  
Sandra Guadalupe Sánchez Ceja

Morelia, Michoacán; octubre 2019

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....	IX
<b>CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 HEMATOPOYESIS .....	1
1.1.2 MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO.....	1
1.1.3 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA) .....	5
1.1.4 ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA.....	5
1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA.....	6
1.1.6 DATOS CLÍNICOS Y HEMATOLÓGICOS .....	6
1.1.7 DIAGNÓSTICO .....	7
1.1.8 ÍNDICE DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ÍNDICE DE DNA) .....	10
1.1.9 ASIGNACIÓN DE RIESGO .....	10
1.1.10 TRATAMIENTO .....	11
1.1.11 EVALUACIÓN MOLECULAR .....	12
1.1.12 TRANSLOCACIÓN t(9;22) (q34;q11) .....	12
1.1.13 TRANSLOCACIÓN t(12;21) (p13;q22) .....	13
1.1.14 TRANSLOCACIÓN t(1;19) (q23;p13) .....	14
1.1.15 TRANSLOCACIÓN t(4;11) (q21;q23) .....	14
1.1.16 GEN CONTROL ABL .....	15
1.1.17 SÍNTESIS DE cDNA.....	16
1.1.18 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): TIPOS DE PCR Y VARIABLES QUE AFECTAN LA REACCIÓN .....	16
1.1.19 LÍNEAS CELULARES .....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	21
1.2.1 PREGUNTA GENERAL .....	21
1.2.2 PREGUNTAS PARTICULARES.....	21

OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN .....	22
1.3.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
1.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	22
PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS .....	23
1.4.1 HIPÓTESIS .....	23
1.4.2 HIPOTESIS NULA $H_0$ .....	23
<b>CAPÍTULO II – METODOLOGÍA</b> .....	24
2.1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	24
2.1.2 UNIVERSO DE TRABAJO .....	24
2.1.3 TAMAÑO DE MUESTRA BIOLÓGICA .....	24
2.1.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	24
2.1.5 ESQUEMA DE TRABAJO .....	25
PROCEDIMIENTOS .....	26
2.2.1 RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS .....	26
2.2.2 ESTUDIOS DE LABORATORIO .....	26
2.2.3 PURIFICACIÓN DE LEUCOCITOS .....	26
2.2.4 CUENTA DE LEUCOCITOS Y DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD .....	27
2.2.5 EXTRACCIÓN DE RNA .....	27
2.2.6 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL RNA .....	28
2.2.7 INTEGRIDAD DEL RNA .....	28
2.2.8 SÍNTESIS DE cDNA .....	28
2.2.9 ESTANDARIZACIÓN DE PCR MULTIPLEX .....	29
2.2.10 ESTANDARIZACIÓN DE PCR ANIDADA (NESTED) MULTIPLEX .....	30
2.2.11 DESCRIPCIÓN DE LÍNEAS CELULARES .....	32
2.2.12 TESTIGOS .....	33
2.2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
<b>CAPÍTULO III - RESULTADOS</b> .....	34
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MULTIPLEX .....	34
3.1.1 CALIDAD DEL RNA .....	34
3.1.2 EVALUACIÓN DE OLIGOS .....	35
3.1.3 CURVA DE MEZCLA DE OLIGOS PARA PCR MULTIPLEX Y <i>taq</i> POLIMERASA .....	37
3.1.4 CURVA DE TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO ( $T_m$ ) .....	38

3.1.5	CURVA DE CLORURO DE MAGNESIO (MgCl <sub>2</sub> ) .....	40
3.1.6	CURVA DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) .....	42
3.1.7	DISMINUCIÓN DE AMPLIFICADOS INESPECÍFICOS EN CASOS NEGATIVOS .....	44
	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES .....	46
3.2.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	46
3.2.2	DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL .....	46
3.2.3	ASIGNACIÓN DE RIESGO .....	46
3.2.4	INMUNOFENOTIPO .....	48
3.2.5	DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES .....	48
	<b>CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
	<b>CAPÍTULO V - CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Clasificación morfológica de Leucemias Linfoblásticas Agudas.....	9
TABLA 2	Secuencias de los oligos para la PCR multiplex.....	30
TABLA 3	Tamaño del producto de PCR en pares de bases (pb).....	31
TABLA 4	Secuencia de oligos para PCR anidado multiplex.....	31
TABLA 5	Datos clínicos de los pacientes con leucemia aguda.....	47
TABLA 6	Inmunofenotipo.....	49
TABLA 7	Translocaciones detectadas.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema de la hematopoyesis y sitios de acción de los factores de crecimiento más importantes.....	3
FIGURA 2	Estructura de la médula ósea normal.....	4
FIGURA 3	Integridad del RNA.....	34
FIGURA 4	Análisis de oligos.....	35
FIGURA 5	Ajuste de oligos.....	36
FIGURA 6	Curva de mezcla de oligos para PCR multiplex y <i>taq</i> polimerasa en la línea celular K562.....	37
FIGURA 7	Curva de temperatura de alineación en PCR multiplex.....	38
FIGURA 8	Curva de temperatura de alineación en PCR anidado multiplex.....	39
FIGURA 9	Curva de MgCl <sub>2</sub> en PCR multiplex.....	40
FIGURA 10	Curva de MgCl <sub>2</sub> en PCR anidado multiplex.....	41
FIGURA 11	Curva de DMSO en PCR Multiplex.....	42
FIGURA 12	Curva de DMSO en PCR anidado multiplex.....	43
FIGURA 13	Disminución de amplificadores inespecíficos en PCR multiplex.....	44
FIGURA 14	Disminución de amplificadores inespecíficos en PCR anidado multiplex.....	45
FIGURA 15	Detección de genes de fusión en muestras de pacientes por PCR Multiplex.....	50
FIGURA 16	Detección de genes de fusión en muestras de pacientes por PCR anidado multiplex.....	51

## RESUMEN

Las alteraciones genéticas en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA), influyen en el tratamiento y pronóstico del paciente. La detección de genes de fusión en forma individual por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional es poco práctica y laboriosa; por ello, la implementación de una técnica PCR multiplex simplificaría el análisis molecular. El objetivo del presente estudio fue establecer las condiciones de la técnica PCR multiplex, para detectar marcadores moleculares de LLA. Se incluyó un panel de oligonucleótidos para los genes de fusión *AF4/MLL*, *BCR/ABL* p190, *BCR/ABL* p210, *ETV6/RUNX1* y *TCF3/PBX1* y del gen control *ABL*. Se reclutaron 18 pacientes con leucemia aguda en el periodo de 2018 a 2019 y se extrajo RNA de muestras de sangre periférica al diagnóstico, por el método TriPure. Las líneas celulares RS4, SUPB15, K562 y REH, se utilizaron como controles positivos en la estandarización. Muestras de sujetos sanos y de pacientes con leucemia aguda que no expresaron genes de fusión, fueron utilizadas como control negativo. La técnica PCR multiplex estandarizada, redujo en un 81% la cantidad de reacciones necesarias para detectar marcadores moleculares de LLA. De los 12 pacientes diagnosticados con LLA, 4 casos (33.3%) presentaron algún gen de fusión; de los cuales 2 casos (16.6%) fueron *ETV6/RUNX1*, 1 caso (8.3%) *BCR/ABL* p210 b2a2 y 1 caso (8.3%) *AF4/MLL*. En conclusión, las condiciones estandarizadas de PCR multiplex y PCR anidado multiplex redujeron el tiempo y esfuerzo necesarios para la evaluación molecular, sin afectar la sensibilidad y especificidad del método.

**PALABRAS CLAVE:** Neoplasia infantil, reacción en cadena de la polimerasa, leucemia en México, diagnóstico molecular, genes de fusión.

## ABSTRACT

Genetic alterations in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL), affects the treatment and prognosis of the patient. The individual detection of fusion genes by conventional polymerase chain reaction (PCR) is impractical and laborious; thus, the implementation of a multiplex PCR would simplify molecular analysis. The objective of this study was to establish the conditions of multiplex PCR, in order to detect molecular markers of ALL. A panel of primers for fusion genes was included: *AF4/MLL*, *BCR/ABL* p190, *BCR/ABL* p210, *ETV6/RUNX1* and *TCF3/PBX1*. Furthermore, the primers for the control gene *ABL* were added. Eighteen patients with acute leukemia were recruited within a period between 2018 and 2019 and RNA was extracted from peripheral blood samples at diagnosis, by the TriPure method. The cell lines RS4, SUPB15, K562 and REH, were used as positive controls in the standardization. Samples of healthy subjects and samples of patients with acute leukemia that don't expressed fusion genes, were used as negative control. The standardized multiplex PCR reduced the necessary number of reactions for detecting molecular markers of ALL by 81 percent. Of the 12 patients diagnosed with ALL, 4 (33.3%) cases expressed some type of gene rearrangement; 2 (16.6%) were *ETV6/RUNX1*, 1 (8.3%) was *BCR/ABL* p210 b2a2, and 1 (8.3%) was *AF4/MLL*. In conclusion, the standardized conditions of multiplex PCR and multiplex nested PCR reduced the time and effort necessary for molecular evaluation, without affecting sensitivity and specificity of the method.

**KEY WORDS:** Childhood neoplasia, polymerase chain reaction, leukemia in Mexico, molecular diagnosis, fusion genes.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Unidad de absorbancia
ABL1	Homólogo de oncogén viral de la leucemia murina de Abelson
B.M.	Biología Molecular
BCR/ABL1	Breakpoint cluster region/Abelson
cbp	Cuanto baste para
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CTH	Célula Troncal Hematopoyética
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMR	Enfermedad Mínima Residual
ETV6/RUNX1	E-twenty-six variant 6/Runt-related transcription factor 1
g	Gramo
H <sub>2</sub> O	Agua
KMT2A/AFF1	Lysine (K)-specific methyltransferase 2A / AF4/FMR2 family member 1
L	Litro
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
min	Minuto
MLL/AF4	Mixed Lineage Leukemia/ ALL1-fused gene from chromosome 4 protein
M-MLV-RT	Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney
MO	Médula Ósea
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ng	Nanogramo
Oligo	Oligonucleótido
p. ej.	Por ejemplo
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico

RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
S	Unidad Svedberg
s	Segundo
SNC	Sistema Nervioso Central
SP	Sangre Periférica
TCF3/PBX1	transcription factor 3/ pre-B-cell leukemia homeobox 1
Tm	Temperatura de alineación (Melting temperature)
U	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
V	Volts
°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro

# CAPÍTULO I - MARCO TEÓRICO

---

## 1.1.1 HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es un mecanismo fisiológico complejo y altamente regulado, responsable de la formación continua de todas las células sanguíneas. Estas células derivan de un progenitor en común, llamado: célula troncal hematopoyética (CTH) o célula madre hematopoyética multipotencial. Estas células se caracterizan por dos funciones: capacidad de auto-renovación (al menos una de las células hija mantienen las propiedades de la célula madre) y capacidad multipotencial (facultad de diferenciación hacia uno o varios linajes sanguíneos) (1, 2).

Las células sanguíneas se dividen en dos grandes grupos: mieloides y linfoides. El grupo mieloides incluye a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos o plaquetas. El grupo linfoides está conformado por linfocitos T, linfocitos B y células NK (1).

Las células progenitoras son estimuladas por diversos factores de crecimiento e interleucinas, promoviendo la activación del ciclo celular, mecanismos de proliferación y de diferenciación escalonada, culminando con la maduración celular (Fig. 1). La maduración celular se define por la pérdida definitiva del potencial de auto-renovación y la adquisición de una identidad celular específica (2).

## 1.1.2 MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

La hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea (MO), la cual proporciona un microambiente hematopoyético óptimo para el anidamiento, proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (2). El microambiente

hematopoyético también regula la cantidad de células madre producidas por auto-renovación (3).

La MO es un tejido productor de los elementos formes de la sangre, localizado entre las trabéculas del hueso esponjoso, es un tejido conjuntivo rico en células y altamente vascularizado. La MO se compone por médula roja hematopoyéticamente activa y médula amarilla grasa hematopoyéticamente inactiva (4).

El microambiente está conformado por células (endoteliales, reticulares adventicias, macrófagos, linfocitos, adipocitos, osteoblastos, entre otras), factores solubles (factores de crecimiento, citocinas, interleucinas y quimiocinas) y proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, laminina, etc.), los cuales en conjunto son esenciales para el desarrollo y regulación celular (Fig. 2) (2).

## Hematopoyesis

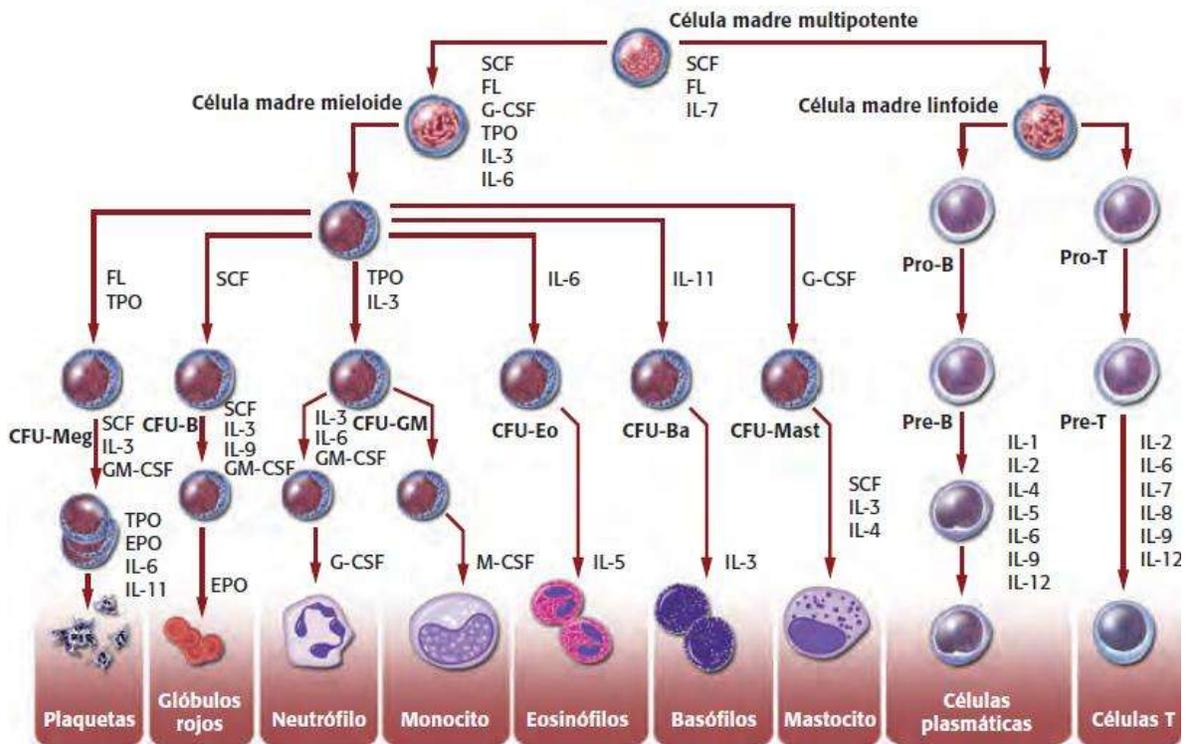
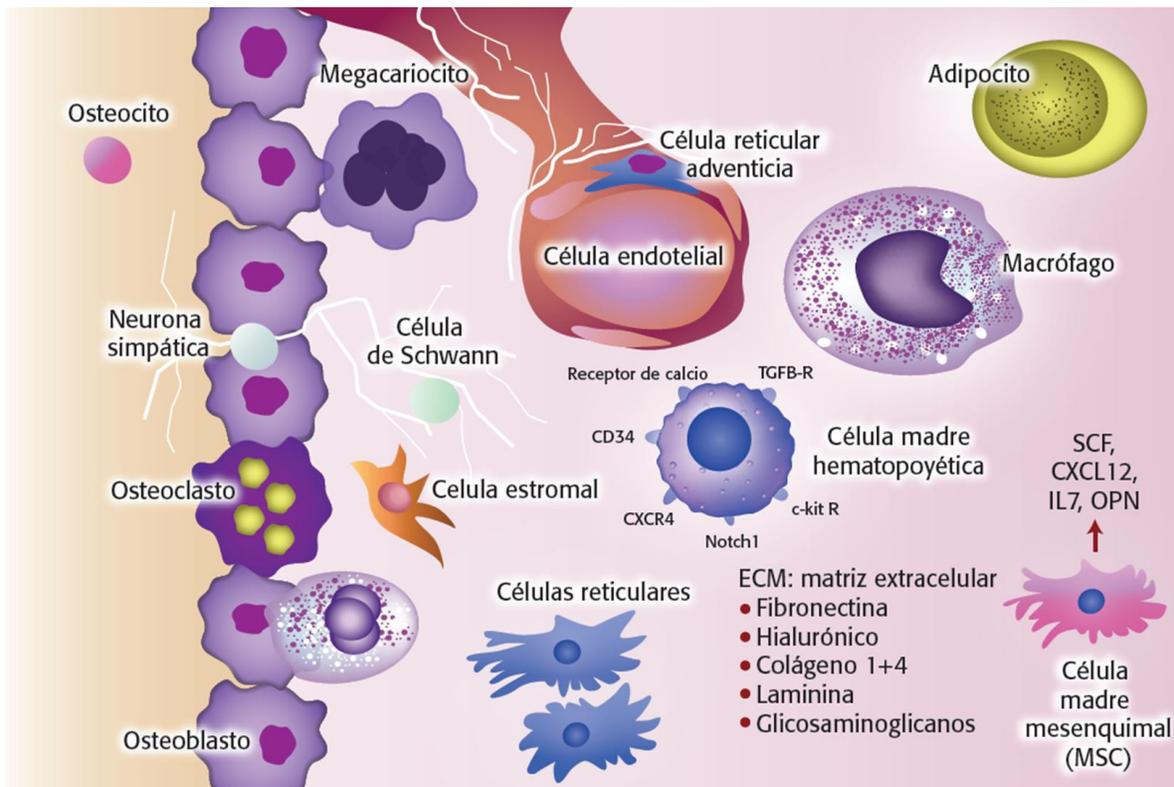


Figura 1. Esquema de la hematopoyesis y sitios de acción de los factores de crecimiento más importantes. Tomado de Moraleda-Jiménez y col, 2017(2).



**Figura 2. Estructura de la médula ósea normal.** Se observan los componentes celulares, factores solubles y proteínas de la matriz extracelular que conforman el microambiente hematopoyético. Tomado de Moraleda-Jiménez y col, 2017 (2).

### **1.1.3 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)**

La leucemia linfocítica aguda es un trastorno de la célula progenitora linfocítica, caracterizado por una proliferación neoplásica maligna y acumulación de células hematopoyéticas inmaduras en la MO. Estas células tienen la capacidad de expandirse y generar clones malignas, manteniéndose en un punto de su diferenciación. Estas células malignas reemplazan al tejido hematopoyético normal de la MO y se diseminan a la sangre periférica (SP), los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, sistema nervioso central (SNC) y piel (2, 4, 5).

### **1.1.4 ETIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA**

La etiología de la leucemia está relacionada a múltiples causas. Los factores intrínsecos relacionados son: herencia genética, daños cromosómicos e hiperdiploidía. En cuanto a los factores extrínsecos tenemos: exposición a radiación ionizante, exposición a productos químicos citotóxicos (pesticidas, benceno, solventes industriales) e infecciones (virus Epstein-Barr). La mayoría de los pacientes requieren de un conjunto de factores para desarrollar LLA. Se sigue estudiando nuevas causas potenciales para la LLA infantil (5, 6).

Las aberraciones cromosómicas que se presentan en la LLA, alteran la expresión y función de los factores de transcripción que son necesarios para el desarrollo normal de los linfocitos B y T. Este proceso patológico detiene la maduración celular y la auto-renovación se ve aumentada (7). Los genes alterados en la leucemia pueden ser resultado de una ganancia o pérdida de función a través de distintos mecanismos. Por ejemplo: recombinación anormal (translocación cromosomal, inversión, o inserción), pérdida de material genético (delección), ganancia de material genético (duplicación), mutaciones puntuales y presencia de copias adicionales de ciertos cromosomas (hiperdiploidía). Estas

alteraciones promueven la activación de oncogenes codificantes de proteínas que controlan la proliferación celular y/o la apoptosis (8).

Cuando un oncogén es activado por mutaciones, la proteína codificada se modifica estructuralmente, generando una actividad aumentada y continua, transmitiendo señales constantemente a través de la unión de tirosina y treonina cinasas. Estas señales inducen un continuo e incesante crecimiento celular. Los productos de oncogenes se pueden clasificar en: factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y reguladores de la apoptosis (8).

### **1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA**

La incidencia de leucemia infantil fue de 78.1 por cada millón de habitantes, de entre 0 a 18 años en el año 2012. La prevalencia con respecto a otras neoplasias en el periodo del 2007 a 2012 fue de 49.8%, con predominio de LLA. La LLA presentó una prevalencia del 83% con respecto a otros tipos de leucemia y síndromes mielodisplásicos (9). Un hallazgo importante fue la incidencia y prevalencia en constante aumento, considerando que la población estudiada proviene de áreas rurales con una alta exposición a pesticidas y órganofosforados, además de la exposición a múltiples factores extrínsecos descritos como posibles agentes causales de la enfermedad (6, 9).

### **1.1.6 DATOS CLÍNICOS Y HEMATOLÓGICOS**

Habitualmente la enfermedad se manifiesta de forma subaguda en el curso de varios días o semanas, los signos y síntomas más frecuentes son: cansancio, malestar, pérdida de apetito, pérdida de peso, fiebre, infecciones de curso prolongado, hemorragias cutáneas (petequias y equimosis), dolores de extremidades, dolor óseo y dolor abdominal. En la exploración física los hallazgos

más frecuentes son: palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatías y púrpura (4, 10).

En LLA destacan los siguientes datos hematológicos: anemia con hemoglobina inferior a 10 g/dL en más del 80% de los casos, leucocitosis superior a  $20 \times 10^9/L$  en el 30-35% de los casos y superior a  $100 \times 10^9/L$  en 15% de los casos y trombocitopenia con cifras de plaquetas inferiores a  $100 \times 10^9/L$  en el 80% de los pacientes (10). En el frotis de SP se puede detectar: neutropenia, presencia de linfoblastos, trombocitopenia y anemia normocítica normocrómica. Comúnmente no hay presencia de anisocitosis y poiquilocitosis (4).

Frecuentemente la deshidrogenasa láctica (LDH) se encuentra elevada y existe presencia de hiperuricemia. En casos con leucocitosis elevadas y presencia pronunciada de hepatomegalia, esplenomegalia o adenomegalia, puede presentarse al inicio del tratamiento un síndrome de lisis tumoral, con insuficiencia renal, alteraciones en los iones y coagulopatía (10).

### **1.1.7 DIAGNÓSTICO**

La confirmación del diagnóstico de LLA se realiza mediante el estudio morfológico, citogenético, determinación de inmunofenotipo y la evaluación molecular del aspirado de MO (11).

La evaluación morfológica de los linfoblastos en SP o MO, ayuda a clasificar el tipo de leucemia en función del fenotipo celular. Se realizan tinciones inmunohistoquímicas para describir las siguientes características: tamaño celular, forma de cromatina nuclear, contorno nuclear, presencia de nucléolo, presencia de vacuolas citoplasmáticas y basofilia del citoplasma. Clasificando el tipo de LLA dentro de tres grupos: L1, L2 y L3 (ver tabla 1) (5, 12, 13).

La evaluación citogenética permite detectar anomalías cromosómicas (translocaciones, deleciones, hiperdiploidías) que permite subclasificar la LLA. Esto aporta un gran valor pronóstico y permite planear el tratamiento (5). El

análisis de inmunofenotipo por citometría de flujo, determina la presencia de antígenos en la superficie membranal (p. ej. CD4, CD8, CD34) y de componentes citoplasmáticos que poseen las células (p. ej. Mieloperoxidasa, IgM); con el objetivo de clasificar el tipo de LLA, en función de la célula que originó la enfermedad y el estadio de diferenciación que posee (14).

El método que provee una mayor sensibilidad y rapidez para detectar clonas con reordenamientos genéticos, es la evaluación molecular. En la cual, se pueden aplicar técnicas de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa y Microarreglos, analizando la expresión de genes de interés diagnóstico (p. ej. Gen de fusión ETV6/RUNX1) (5).

**Tabla 1.** Clasificación morfológica de la leucemia linfoblástica aguda.

CARACTERÍSTICAS	L1	L2	L3
<b>TAMAÑO</b>	El linfocito es hasta dos veces más pequeño	Grande	Grande y homogéneo
<b>CROMATINA</b>	Homogénea	Heterogénea	Finamente punteada y homogénea
<b>CONTORNO NUCLEAR</b>	Regular o con hendiduras ocasionales	Irregular y hendido	Regular, oval o redondo
<b>NUCLÉOLO</b>	No visible o pequeño	Uno o más, a veces grande	Prominente, uno o más
<b>CITOPLASMA</b>	Escaso	Variable, a veces moderadamente abundante	Moderadamente abundante, con múltiples vacuolas superpuestas al núcleo
<b>BASOFILIA CITOPLASMÁTICA</b>	Ligera o moderadamente intensa	Variable	Muy intensa
<b>VACUOLAS CITOPLASMÁTICAS</b>	Variables	Variables	A menudo prominentes

Modificado de Bennet, J.M. y col, (1976) (12).

### **1.1.8 ÍNDICE DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ÍNDICE DE DNA)**

La ploidía del DNA es un indicador del número de cromosomas en una célula. La presencia de anomalías en la replicación del DNA de células cancerígenas, puede generar un contenido anormal de DNA y, en consecuencia, una ploidía distinta. El índice de DNA es la cantidad de DNA presente en la población celular estudiada, con respecto a la cantidad de DNA que poseen las células diploides normales (15).

El índice de DNA es un factor pronóstico en la LLA infantil, este factor es considerado en la asignación de riesgo del paciente y en su tratamiento. Un mayor tiempo de supervivencia está relacionado con un índice de DNA hiperdiploide  $\geq 1.16$  (mayor a 54 cromosomas), en contraste, la hipodiploidia ( $< 44$  cromosomas) está vinculada con un pobre pronóstico (16). Se han establecido los siguientes puntos de corte: índice de DNA de 0.95 – 1.05 (diploide, 46 cromosomas),  $< 0.95$  (hipodiploide) y  $> 1.05$  (hiperdiploide) (17).

### **1.1.9 ASIGNACIÓN DE RIESGO**

La tendencia actual, es realizar un tratamiento adaptado al riesgo de cada paciente que haya sido diagnosticado con LLA. Se administra un tratamiento intensivo al paciente que tiene mayor riesgo de recaída al diagnóstico, por el contrario, no se deberá aplicar un tratamiento tan agresivo al paciente de riesgo estándar (11).

En función de los factores pronósticos, los grupos de pacientes se pueden dividir en tres grupos de riesgo: bajo, estándar y alto. La clasificación dentro de estos tres grupos está determinada por las características etiológicas, clínicas y de laboratorio. Los aspectos a evaluar son: edad, sexo, raza, cantidad de glóbulos blancos al diagnóstico, morfología celular, inmunofenotipo, citogenética, presencia

de reordenamientos genéticos y la respuesta al tratamiento de inducción a la remisión (11, 18).

### **1.1.10 TRATAMIENTO**

El tratamiento de los pacientes con LLA, se adapta al riesgo del paciente y está comprendido por tres fases: inducción a la remisión, consolidación (intensificación) y mantenimiento. La duración total es de dos años (11).

Inducción a la remisión: su objetivo es erradicar más del 99% de la masa leucémica inicial, restaurar la hematopoyesis normal y alcanzar un correcto estado funcional. Las drogas que deben ser incluidas en el esquema de tratamiento son: glucocorticoides (prednisona o dexametasona), vincristina, antraciclina, ciclofosfamida y L-asparaginasa. Un paciente alcanza la remisión completa cuando no existe evidencia de leucemia en su exploración física, SP y MO, ni tampoco afectación de SNC o de tejidos extramedulares (11, 18, 19).

Consolidación: su objetivo es la erradicación de células leucémicas residuales que han sido resistentes al tratamiento de inducción, contribuyendo con ello a disminuir el riesgo de recaída. El esquema de tratamiento incluye dosis altas de citarabina, metotrexate, mercaptopurina o tioguanina y ciclofosfamida fraccionada. Con este esquema se intenta evitar la recaída no solo a MO sino también a SNC (11, 18).

Mantenimiento: Se ha demostrado que pacientes con LLA en aparente remisión completa, pueden presentar enfermedad mínima residual (EMR) positiva, incluso a los 24 meses de haber sido diagnosticados (20). Es por ello que el mantenimiento tiene una duración promedio de 2 a 2.5 años. Este consiste en la administración de 6-Mercaptopurina diaria y la administración de metotrexate semanal. El mantenimiento se alterna con ciclos de intensificación trimestral y profilaxis al SNC (18).

### 1.1.11 EVALUACIÓN MOLECULAR

Las alteraciones genéticas en la LLA, afectan a las complejas rutas de señalización que controlan la proliferación celular, diferenciación celular y la muerte celular por apoptosis. Las translocaciones cromosómicas originan genes de fusión quiméricos, que proporcionan marcadores sensibles y estables. Estos son únicos para la clona leucémica de cada paciente y se pueden usar para rastrear su origen y monitorizar la respuesta al tratamiento. Las proteínas codificadas por genes de fusión, bloquean la diferenciación celular y proporcionan dianas potenciales para nuevos tratamientos (21). La presencia de cualquier translocación cromosomal en las células malignas, ha sido reportada como un factor de pronóstico adverso en pacientes pediátricos con LLA (22).

Las técnicas de diagnóstico molecular se han vuelto indispensables para la detección de reordenamientos genéticos. La técnica de RT-PCR permite caracterizar los transcritos de fusión formados por las translocaciones (23). La técnica de RT-PCR Multiplex, permite la detección simultánea de distintas translocaciones en muestras de pacientes con LLA. Optimiza el costo y el tiempo necesarios para el análisis, manteniendo su sensibilidad (24).

### 1.1.12 TRANSLOCACIÓN t(9;22) (q34;q11)

La translocación *BCR/ABL1* también llamada cromosoma Philadelphia (Ph), presentó una prevalencia de 1.8% en pacientes pediátricos con LLA en 2014 (25).

Esta translocación resulta del intercambio recíproco de material genético entre los brazos largos del cromosoma 9 y el 22, con puntos de corte en los genes *ABL* y *BCR*, respectivamente. Esta translocación resulta de la unión de la secuencia 3' del proto-oncogén *ABL* (Abelson) con secuencias 5' del gen *BCR* (breakpoint cluster region) (26, 27).

Los puntos de ruptura más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones 1 (e1), 12 (b2), 13 (b3) y 19 (e19). El punto de ruptura del gen *ABL* se produce en el exón 2 (a2). Al unirse los exones b3a2 o b2a2, se codifica una proteína de 210kD (p210<sup>BCR/ABL</sup>); si los exones e1 y e2 son removidos en el corte y empalme (splicing) del ácido ribonucleico mensajero (mRNA), la unión de e1a2 se transcribe en una proteína de 190kD (p190<sup>BCR/ABL</sup>). Estos transcritos se asocian a la leucemia mieloide crónica (LMC) y LLA respectivamente (23, 28).

Esta translocación codifica una enzima de actividad tirosina cinasa (proveniente del gen *ABL*), dirigiendo la célula hacia una proliferación no dependiente de factores de crecimiento y bloqueando su apoptosis (21). Los pacientes con esta translocación poseen un mal pronóstico, debido a la ineficacia del tratamiento antineoplásico convencional (26).

### 1.1.13 TRANSLOCACIÓN t(12;21) (p13;q22)

La translocación *ETV6/RUNX1* (*TEL/AML1*), ha sido reportada como el reordenamiento cromosómico más frecuente en niños con LLA de precursores B, con una prevalencia de 25% (29, 30).

El gen de fusión resulta de la unión de los siguientes genes: *ETV6* (Ets Variant Gene 6) mapeado en el cromosoma 12p13 y el *RUNX1* (Runt-related Transcription factor 1) localizado en el cromosoma 21p22 (31). Esta fusión codifica para un factor de transcripción quimérico que compromete la porción N-terminal de *ETV6* y casi toda la proteína *RUNX1*, convierte a esta última de ser un modulador transcripcional, a un represor transcripcional de genes diana del *RUNX1* (29). La expresión de este gen de fusión desencadena una expansión de precursores de células B, con un aumento en su capacidad de su auto-renovación y un deterioro en su diferenciación hacia estadios más maduros de la célula B (32).

La LLA positiva a esta translocación, está biológicamente caracterizada por una remisión completa y una excelente supervivencia libre de enfermedad a largo

plazo. La mayoría de las publicaciones asocian esta alteración con un pronóstico favorable (30). Sin embargo, otros estudios plantean que este no parece ser un factor independiente, por lo que la respuesta favorable de los pacientes pudiera estar relacionada con otros factores como edad, sexo, recuento de leucocitos, inmunofenotipo, hiperdiploidía y respuesta a la terapia (29).

#### **1.1.14 TRANSLOCACIÓN t(1;19) (q23;p13)**

La translocación *TCF3/PBX1* (*E2A/PBX1*) en pacientes pediátricos con LLA, ha sido reportada con un 7.4% de prevalencia en el año 2014 (25).

Este rearrreglo génico, resulta de la unión del gen *TCF3* (transcription factor 3) situado en el cromosoma 19p13, con el gen *PBX1* (pre-B-cell leukemia homeobox 1) localizado en el cromosoma 1q23. Este gen de fusión codifica un factor de transcripción quimérico que causa una activación anormal y la disfunción del gen homeobox *PBX1*, provocando la activación de múltiples genes y culminando en un fenotipo celular maligno (33). La presencia de este gen de fusión ha sido relacionada con un pésimo pronóstico, no obstante, el adverso valor pronóstico de esta translocación ha sido superado gradualmente por la eficacia de los protocolos quimioterápicos contemporáneos (34, 35).

#### **1.1.15 TRANSLOCACIÓN t(4;11) (q21;q23)**

Los reordenamientos de tipo *MLL* presentaron una prevalencia en la población infantil con LLA de 1.4% en el año 2014 (25). La translocación *MLL/AF4*, ahora es llamada *KMT2A/AFF1*, siendo *KMT2A* correspondiente a lysine (K)-specific methyltransferase 2A y *AFF1* a AF4/FMR2 family, member 1 (36).

El reordenamiento genético más frecuente del gen *MLL* humano, fusiona el gen *MLL* al gen *AF4*, resultando en una LLA infantil de células B clasificada de alto

riesgo. Estas aberraciones cromosómicas son consecuencia de la mala reparación de rupturas de la doble cadena del DNA. A nivel molecular, el gen *MLL* situado en el cromosoma 11q23, se fusiona con el gen *AF4* en la región del cromosoma 4q21 (37).

El gen *MLL* es necesario para una regulación correcta de la hematopoyesis y la expresión del gen Homeobox HOXA (Homeobox A cluster) (38). La desregulación de estos mecanismos, asocia a los pacientes a un muy mal pronóstico, baja respuesta al tratamiento, infiltración a SNC y baja supervivencia (38).

### **1.1.16 GEN CONTROL ABL**

El gen *ABL1* codifica una proteína con actividad tirosina cinasa. La cinasa *ABL1* normalmente se encuentra inactiva y deberá ser activada para realizar sus funciones. Se encuentra incorporada en múltiples procesos celulares, incluyendo el crecimiento celular, división celular (Proliferación), maduración y migración celular. Puede ayudar en la supervivencia celular o desencadenar la apoptosis, dependiendo de las condiciones celulares. La cinasa *ABL1*, interactúa con las proteínas involucradas en el citoesqueleto de actina, apoyando en el control de la migración celular y su adhesión. El gen *ABL1* también participa en la regulación de otros genes (39).

El gen *ABL1* es considerado como un gen control de alta confiabilidad en el diagnóstico y seguimiento de la EMR. Permite corregir variaciones en la calidad o cantidad de RNA, debido a que la variación de la expresión de los transcritos de *ABL* y los genes de fusión están correlacionadas. Además, ofrece la posibilidad de evaluar la sensibilidad en análisis de cuantitativos de PCR para la detección de genes de fusión en el diagnóstico o seguimiento de la EMR (40).

### **1.1.17 SÍNTESIS DE cDNA**

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), inicia con la hibridación de un cebador o primer (oligodesoxinucleótido) a la molécula del mRNA, posteriormente es extendido por una enzima Transcriptasa Reversa (RT) y da como resultado una copia de cDNA, que será utilizada como plantilla en la PCR. Dependiendo del propósito del análisis, el cebador necesario para la síntesis de cDNA puede ser diseñado para unirse a genes de interés, o unirse a todos los mRNAs presentes en una muestra si se utilizan hexámeros aleatorios u Oligo dT (41).

### **1.1.18 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): TIPOS DE PCR Y VARIABLES QUE AFECTAN LA REACCIÓN**

La PCR es una técnica de biología molecular utilizada para sintetizar de miles a millones de fragmentos de una secuencia de DNA en particular, utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas (42). La PCR está conformada por tres grandes pasos: desnaturalización, alineación y extensión. Estos pasos se diferencian entre sí por la temperatura y el tiempo de duración de cada uno. En el primer paso se utiliza una temperatura de 90-97°C, la cual permite que la doble cadena del DNA se desnaturalice, quedando en forma de cadena sencilla. Posteriormente, la temperatura se ajusta a un intervalo entre 40-60°C, en estas condiciones los puentes de hidrógeno tienden a formarse y romperse constantemente, provocando una interacción entre los oligonucleótidos (cebadores) y el DNA, las uniones más estables (las que son complementarias) permanecerán unidas al DNA, de esta manera los oligonucleótidos se alinean y forman una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se acopla a los fragmentos de DNA de doble cadena y comienza a copiar en sentido de 5' a 3'; agregando nucleótidos, formándose puentes de hidrógeno y obteniendo estabilidad de la unión previa del oligonucleótido. La temperatura aumenta a 72°C,

condición en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad enzimática y continúa con la síntesis de fragmentos de DNA a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado, dando paso a la extensión (42, 43).

Lo descrito anteriormente corresponde al primer ciclo de amplificación. Los ciclos consecutivos repiten las mismas condiciones, pero los oligonucleótidos además de unirse al DNA molde, se unirán a los fragmentos recién sintetizados en ciclos anteriores. Antes de iniciar los ciclos, es necesario programar un paso a 95°C durante varios minutos para iniciar con la desnaturalización del DNA y al final de los ciclos se añade un paso de extensión final a 72°C, en el cual la *taq* terminará de sintetizar todos los fragmentos incompletos. Es necesario que uno de los oligonucleótidos sea complementario para el gen de interés del DNA analizado y que el otro tenga la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se busca amplificar (llamados forward y reverse) (42).

El análisis por PCR de genes de fusión, posee una sensibilidad de al menos  $10^{-3}$  (una célula leucémica entre cada  $10^3$  células normales). La amplificación exponencial de los transcritos de fusión, permite detectarlos aun cuando la cantidad de mRNA es limitada o cuando se analizan genes de muy baja expresión (28, 41).

La PCR anidada (nested) se realiza como una segunda ronda de PCR, con la finalidad de aumentar la sensibilidad de detección y disminuir la posibilidad de falsos positivos o falsos negativos, considerándose una prueba confirmatoria (44). Para aplicar esta técnica es necesario que la PCR inicial se haya amplificado con un par de oligonucleótidos externos, conocidos como A+B, que amplifican una región relativamente extensa. El producto de PCR amplificado será utilizado como el nuevo DNA molde, al cual, se le añadirán un par de primers internos conocidos como C+D, que son específicos para el producto de PCR de primera ronda. En esta técnica se aplica un protocolo de amplificación parecido al de PCR convencional, limitando la cantidad de ciclos, para evitar la amplificación de productos no específicos (28, 45). Se ha reportado una sensibilidad de al menos

$10^{-4}$  (una célula leucémica por cada  $10^4$  células normales), en la detección de transcritos de fusión (28, 46).

La PCR multiplex es una variante de la PCR convencional, donde dos o más genes de interés son amplificados de manera simultánea, debido a la inclusión de más de un par de oligonucleótidos en el mismo tubo de reacción. La PCR Multiplex tiene el potencial de ahorrar reactivos, tiempo y cantidad de muestra utilizada (47, 48). Esta técnica ha resultado de gran utilidad en la detección de reordenamientos genéticos presentes en el mRNA de pacientes con LLA, debido a la disminución en la cantidad de reacciones necesarias para realizar un cribado (screening) completo al paciente (49). La sensibilidad del método estandarizado es comparable a las reacciones que solo poseen un par de primers, dada a la incorporación de la PCR nested en estos protocolos (50).

La estandarización de la PCR Multiplex incluye muchas dificultades, que pueden afectar a la sensibilidad y especificidad de la reacción. La presencia de más de un par de oligonucleótidos incrementa las posibilidades de obtener productos inespecíficos, primordialmente causado por la formación de dímeros entre los oligonucleótidos. En consecuencia, es necesaria la optimización de múltiples condiciones de la reacción, en las que se incluye la concentración de los siguientes reactivos: primers utilizados, dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato),  $MgCl_2$  (cloruro de magnesio), Buffer de PCR, DNA molde y *taq* polimerasa. Además, es necesario utilizar aditivos que optimicen la reacción, tales como: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, betaína, formamida y albúmina de suero bovino (BSA) (47). La temperatura de alineación ( $T_m$ ), el tiempo de duración de cada paso del ciclo y la cantidad de ciclos en la PCR multiplex, deberán valorarse, obteniéndose las condiciones donde la sensibilidad y especificidad sean idóneas (48).

El Dimetilsulfóxido (DMSO), es probablemente el aditivo más utilizado en la optimización de protocolos de PCR. El DMSO interfiere con la unión de los puentes de hidrógeno entre las bases nucleicas, facilita la separación de las

hebras del DNA y disminuye la temperatura de alineación ( $T_m$ ), mejorando la especificidad de los oligonucleótidos con el DNA molde (51).

La concentración final de DMSO sugerida en una PCR va desde el 1-10%. Sin embargo, el hecho de adicionar más de 2% de DMSO requerirá de un aumento en la cantidad de *taq* polimerasa utilizada. El rendimiento de la amplificación puede ser reducido drásticamente si la concentración de DMSO está por arriba del 5%, inhibiendo por completo la amplificación de productos deseados a una concentración del 10%. Debido a esto, diversos autores recomiendan utilizar el DMSO a una concentración no mayor al 5%, ya que una concentración mayor podría inhibir la actividad enzimática de la *taq* polimerasa (51, 52).

### 1.1.19 LÍNEAS CELULARES

Son células aisladas de un tejido, las cuales han adquirido la capacidad de crecer continuamente en condiciones *in vitro*. Son consideradas células inmortales y ofrecen las siguientes ventajas: a largo plazo son económicas, proveen una fuente ilimitada de material biológico y evita las preocupaciones éticas asociadas al uso de tejidos animales y humanos en la experimentación. Las líneas celulares proveen una población pura de células, lo cual aporta una muestra consistente y con resultados reproducibles (53). La línea celular K562 es un control positivo para el gen de fusión *BCR/ABL1* p210 b3a2 (28). La línea celular SUP-B15 presenta el gen de fusión *BCR/ABL1* p190 e1a2 (54). La línea celular REH es un control positivo del gen de fusión *ETV6/RUNX1* (*TEL/AML1*) (55). Por último, la línea celular RS4 es control positivo de la t(4;11) (q21;q23) y expresa el gen de fusión *MLL/AF4* e10e4 (*KMT2A-AFF1*) (28, 56).

## JUSTIFICACIÓN

---

México posee una de las mayores incidencias de leucemia infantil a nivel mundial, siendo la LLA el tipo de neoplasia más frecuente en los niños mexicanos (9, 57). Además, la leucemia en México posee una alta tasa de mortalidad (58). El tratamiento de LLA se adapta al riesgo del paciente y uno de los factores de mayor importancia para determinar el nivel de riesgo, es el diagnóstico molecular.

El diagnóstico por RT-PCR se utiliza para evaluar molecularmente al paciente, sin embargo, el costo y el tiempo que representa elaborar estos estudios es muy alto. Además, la detección de reordenamientos genéticos en pacientes pediátricos con leucemia, no es un análisis rutinario en México (25). Es por esto, que el establecimiento de una técnica de PCR multiplex, contribuirá con la reducción del tiempo necesario para ejecutar un análisis molecular completo a pacientes pediátricos con LLA. La implementación de esta técnica en laboratorios especializados, podría beneficiar a la población infantil mexicana que haya sido diagnosticada con LLA.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

---

### **1.2.1 PREGUNTA GENERAL**

¿Cuáles son las condiciones de la PCR multiplex para la detección de marcadores moleculares de la LLA pediátrica?

### **1.2.2 PREGUNTAS PARTICULARES**

¿Cómo reducir los factores de interferencia sin afectar la sensibilidad y especificidad del método diagnóstico PCR multiplex?

¿Cuáles son los datos clínicos y los resultados de los análisis clínicos de los casos incluidos en el estudio?

## **OBJETIVO DE INVESTIGACIÓN**

---

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer las condiciones de la técnica PCR multiplex, para detectar marcadores moleculares de LLA.

### **1.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Reducir los factores de interferencia, manteniendo la reproducibilidad del método diagnóstico PCR multiplex.
- Analizar los datos clínicos y los resultados de los análisis de laboratorio, de los casos incluidos en la estandarización de PCR multiplex.

## **PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS**

---

### **1.4.1 HIPÓTESIS**

El establecimiento de una técnica de PCR multiplex que incluye un panel de oligonucleótidos para los genes de fusión más comunes en la LLA pediátrica, permite la detección de marcadores moleculares.

### **1.4.2 HIPOTESIS NULA $H_0$**

El establecimiento de una técnica de PCR multiplex que incluye un panel de oligonucleótidos para los genes de fusión más comunes en la LLA pediátrica, no permite la detección de marcadores moleculares.

## CAPÍTULO II – METODOLOGÍA

---

### 2.1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, observacional y transversal.

### 2.1.2 UNIVERSO DE TRABAJO

Líneas celulares positivas para translocaciones y genes de fusión de interés: **K562** t(9;22) *BCR/ABL1* p210 b3a2, **SUPB15** t(9;22) *BCR/ABL1* p190 e1a2, **REH** t(12;21) *ETV6/RUNX1* y **RS4** t(4;11) *AF4/MLL* e10e4. Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda dentro del rango de edad de 0-16 años, que ingresaron a oncología en el Hospital infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”.

### 2.1.3 TAMAÑO DE MUESTRA BIOLÓGICA

Se incluyeron 18 muestras de sangre periférica de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda. Las cuales fueron recolectadas en el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019.

### 2.1.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

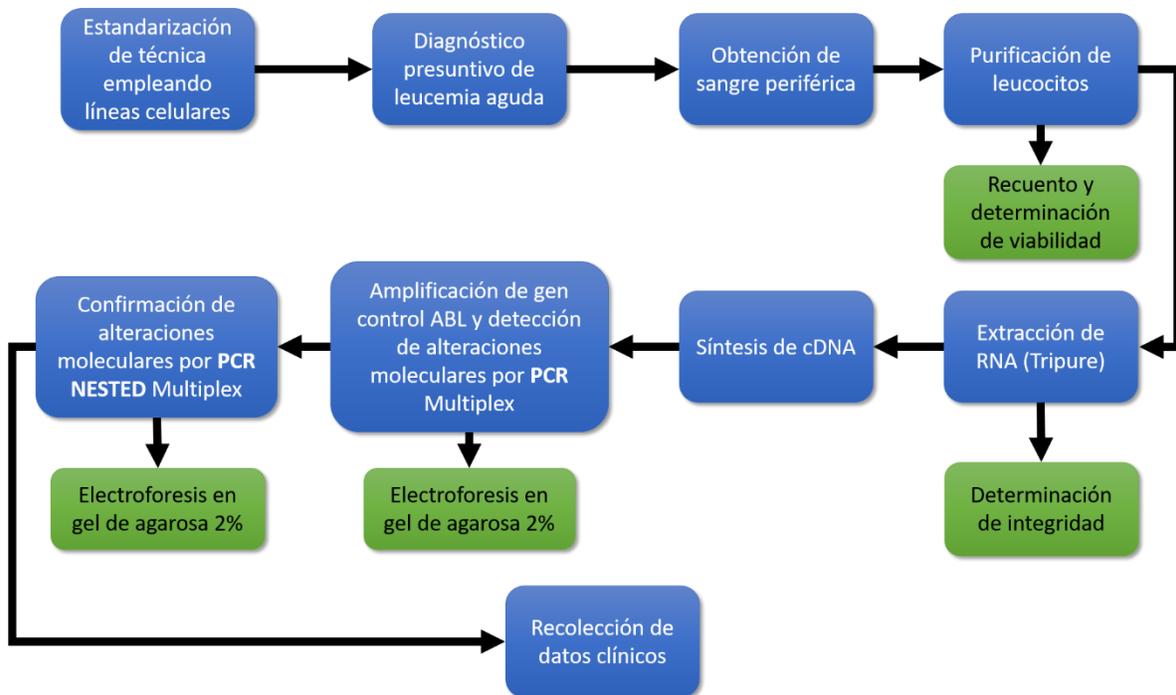
-Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda.
- Pacientes sin tratamiento previo de quimioterapia.

-Criterios de no inclusión:

- Muestras de pacientes con tratamiento antineoplásico previo.
- Muestras de pacientes recolectadas en tubos erróneos, con presencia de hemólisis, volumen insuficiente o presencia de coágulo.
- Muestras de pacientes con más de 24 horas de haber sido recolectadas.

### 2.1.5 ESQUEMA DE TRABAJO



## **PROCEDIMIENTOS**

---

### **2.2.1 RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS**

Del expediente clínico de cada paciente se obtuvo la siguiente información: edad, sexo, lugar de procedencia, tiempo de evolución y examen físico al diagnóstico (adenopatías, palidez, petequias, equimosis, fiebre, dolor óseo, hepatomegalia y esplenomegalia).

### **2.2.2 ESTUDIOS DE LABORATORIO**

Los resultados de los análisis de laboratorio incluidos en el estudio fueron: biometría hemática al diagnóstico, química sanguínea al diagnóstico y evaluación morfológica.

### **2.2.3 PURIFICACIÓN DE LEUCOCITOS**

Las muestras de SP fueron lisadas con solución de lisis de glóbulos rojos (0.149 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.126 mM EDTA, 9.988mM  $\text{KHCO}_3$ ) en proporción 1:10. Se incubó durante 15 min a 4°C y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió y se lavó con solución de fosfatos (PBS) en proporción 1:5. La suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió con 1 mL de PBS.

#### **2.2.4 CUENTA DE LEUCOCITOS Y DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD**

Se preparó una dilución 1:40 de los leucocitos purificados con azul de tripano 0.04%, después, se cargó la cámara de Neubauer y se contaron las células en microscopio de luz óptica. El promedio de las células contadas en los cuatro cuadrantes se multiplicó por 10 (volumen de la cámara), posteriormente por 40 (factor de dilución) y el producto resultante representó la cantidad de leucocitos en 1  $\mu$ L. Para determinar la viabilidad celular, se realizó a partir del porcentaje de células vivas (incoloras) y muertas (teñidas de azul), el cual debe ser >90% de células viables para seguir con el proceso de extracción de RNA.

#### **2.2.5 EXTRACCIÓN DE RNA**

Se colocaron 10 millones de células en microtubo de 1.5 mL libre de RNAsas y DNAsas, se adicionó 1 mL del reactivo TriPure Isolation Reagent® (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), se homogenizó la muestra con micropipeta y jeringa de insulina. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 200 $\mu$ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 1 min. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (fase superior) se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL y se agregaron 500 $\mu$ L de isopropanol, se incubó durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de Etanol al 75%, se homogenizó en Vortex durante 30 s, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de RNA se secó al aire, luego el RNA se resuspendió con 20  $\mu$ L de agua libre de RNasa y se almacenó a -70°C hasta su uso.

### **2.2.6 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL RNA**

El RNA se cuantificó en el equipo NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) a una longitud de onda de 260 nm. Una unidad de absorbancia (1A) equivale a 40 ng/μL de RNA. La pureza se determinó midiendo el cociente de la absorbancia de la muestra a 260 nm/280 nm. Un valor del cociente mayor a 1.7 se consideró puro.

### **2.2.7 INTEGRIDAD DEL RNA**

Un μL de muestra RNA se mezcló con 2 μL de buffer de carga 6X (0.25% de Azul de bromofenol, 0.25% de xilen-cianol y 30% de glicerol) y 7 μL agua inyectable. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y se corrió a 85 V durante 45 min. Se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 10 min y se visualizó en fotodocumentador de UV. La presencia de 3 bandas bien delimitadas correspondientes a las bandas 28S, 18S y 5S, además de una relación 2:1 de la intensidad de las bandas 28S y 18S, indicaron un RNA de buena calidad.

### **2.2.8 SÍNTESIS DE cDNA**

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se efectuó de acuerdo al protocolo de la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®). En un microtubo para PCR (0.2mL) se adicionaron por reacción 2 μg de RNA, 1 μL de Random Primers (Promega®) y agua libre de RNasa cbp 10 μL. Se incubó a 70°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo a 4°C. En otro tubo se elaboró la master mix con Buffer 1X (Promega®), 0.5 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs Invitrogen®), 20 U Inhibidor de RNAsas (Invitrogen®), 200 U de Retrotranscriptasa (M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/μL Promega) y agua libre de RNasa cbp 10 μL. Posteriormente la master mix se agregó al primer tubo, se

incubó a 37°C durante 1 hora y después se desnaturalizó la enzima a 93°C durante 5 min. El cDNA sintetizado se almacenó a -30°C hasta su uso.

### 2.2.9 ESTANDARIZACIÓN DE PCR MULTIPLEX

La PCR Multiplex se realizó con base a lo descrito por Pakakasama y col, (2008), aplicando algunas modificaciones. Se incluyeron los oligos del gen de fusión *BCR/ABL* b3a2 y b2a2 y del gen control *ABL*, así como dimetilsulfóxido (DMSO).

En microtubo para PCR se añadieron 2.5% de DMSO (Solución de DMSO al 20% grado cultivo celular SIGMA®), solución amortiguadora 1X (*taq* DNA Polymerase PCR Buffer 10X Invitrogen®), 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP's, 0.8U de *taq* polimerasa (Invitrogen®), 0.16 µM de mezcla de oligos para PCR Multiplex (mezcla de 11 oligos externos A y B, ver tabla 2), 2 µL de cDNA de muestra de paciente o 1 µL de cDNA de líneas celulares y H<sub>2</sub>O inyectable cbp 20 µL. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 45s, 62°C durante 60s y 72°C durante 60s. Por último 1 ciclo a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se mezcló 1µL de Buffer de carga 6x y 3 µL de producto de PCR. Se corrieron las muestras en solución 0.5X de TBE a 85 voltios durante 45 minutos. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio al 0.01% y se documentó la imagen en un fotodocumentador modelo Gel Doc 2000 de la marca Bio-Rad, utilizando el programa *Quantity One*® versión 3.6.9. La presencia de una banda con peso molecular correspondiente a cada reordenamiento molecular, indicó un resultado positivo (ver tabla 3).

## 2.2.10 ESTANDARIZACIÓN DE PCR ANIDADA (NESTED) MULTIPLEX

En un microtubo de PCR se mezcló 5% de DMSO, solución amortiguadora 1X, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP's, 0.8 U de *taq* polimerasa, 0.16 μM de mezcla de oligos para PCR anidado Multiplex (mezcla de 9 oligos internos C y D, ver tabla 4), 1 μL de producto de PCR y H<sub>2</sub>O cbp 20 μL. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, seguido de 20 ciclos a 94°C durante 45s, 64.5°C durante 60s y 72°C durante 60s. Para finalizar 1 ciclo a 72°C durante 7 min. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa como se describió en la estandarización de PCR multiplex.

**Tabla 2.** Secuencias de los oligos para la PCR multiplex.

Oligo	Secuencia	Gen de fusión
MLL-A	CCGCCTCAGCCACCTAC	<i>AF4/MLL</i>
AF4-B	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	
BCR-e1-A	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	<i>BCR/ABL</i> p190
ABL-a3-B	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	
BCR-b1-A	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC	<i>BCR/ABL</i> p210
TEL-A	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	<i>ETV6/RUNX1</i>
AML1-B	AACGCCTCGTCATCTTGC	
E2A-A	CACCAGCCTCATGCACAAC	<i>E2A/PBX1</i>
PBX-B	TCGCAGGAGATTTCATCACG	
ABL-F ENF1003	TGGAGATAAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	Gen control
ABL-R ENR1063	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	

**Tabla 3.** Tamaño del producto de PCR en pares de bases (pb)

Gen de fusión	Isoforma	A - B	C - D	A - B + C - D
<b>AF4/MLL</b>	e10-e5	514	457	457
	e10-e4	559	502	502
	e11-e4	673	616	616
<b>BCR/ABL p190</b>	e1-a2	521	381	381
<b>BCR/ABL p210</b>	b3-a2	417	360	360
	b2-a2	342	285	285
<b>ETV6/RUNX1 (TEL/AML1)</b>	estándar	298	181	181
	variante -39pb	259	142	142
<b>TCF3/PBX1 (E2A/PBX1)</b>	estándar	373	289	289
	variante +27pb	400	316	316
<b>ABL (GEN CONTROL)</b>		123		

**Tabla 4.** Secuencia de oligos para PCR anidado multiplex

Oligo	Secuencia	Gen de fusión
<b>MLL-C</b>	AGGACCGCCAAGAAAAGA	<b>AF4/MLL</b>
<b>AF4-D</b>	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG	
<b>BCR-e1-C</b>	CAGAACTCGCAACAGTCCTTC	<b>BCR/ABL p190</b>
<b>ABL-a3-D</b>	TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	
<b>BCR-b2-C</b>	CAGATGCTGACCAACTCGTGT	<b>BCR/ABL p210</b>
<b>TEL-C</b>	AAGCCCATCAACCTCTCTCATC	<b>ETV6/RUNX1</b>
<b>AML1-D</b>	TGGAAGGCGGCGTGAAGC	
<b>E2A-C</b>	CACCCTCCCTGACCTGTCT	<b>E2A/PBX1</b>
<b>PBX-D</b>	GGCCTGCTCGTATTTCTCC	

## **2.2.11 DESCRIPCIÓN DE LÍNEAS CELULARES**

### **A) K562**

La línea celular K562 fue aislada de un derrame pleural de una mujer de 53 años de edad, con diagnóstico de leucemia mieloide crónica en una crisis blástica terminal. Los blastos de K562 son multipotenciales, pudiendo diferenciarse a progenitores reconocibles de la serie eritroide, granulocítica y monocítica (60).

### **B) SUP-B15**

La línea celular SUP-B15 es derivada de células malignas recolectadas de la MO de un niño caucásico de 8 años de edad, positivo para el cromosoma Philadelphia y con LLA de estirpe celular B (61).

### **C) REH**

La línea celular REH, fue aislada de la SP de una niña de 15 años perteneciente al norte de África y con diagnóstico de LLA de precursores celulares B (55).

### **D) RS4**

La línea celular RS4, fue aislada de la MO de una mujer caucásica de 32 años de edad con diagnóstico de LLA tipo L2 (28, 56).

## 2.2.12 TESTIGOS

### A) Controles negativos:

Se emplearon muestras de SP de sujetos sanos y de pacientes con leucemia aguda, negativos a los genes de fusión.

### B) Controles positivos:

Se utilizaron líneas celulares positivas a los genes de fusión: **K562** (*BCR/ABL1* p210 b3a2), **SUPB15** (*BCR/ABL1* p190 e1a2), **REH** (*ETV6/RUNX1*) y **RS4** (*AF4/MLL* e10e4).

## 2.2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La media aritmética y desviación estándar, se obtuvieron por análisis estadístico descriptivo en el programa *IBM SPSS Statistics*® 23.

## CAPÍTULO III - RESULTADOS

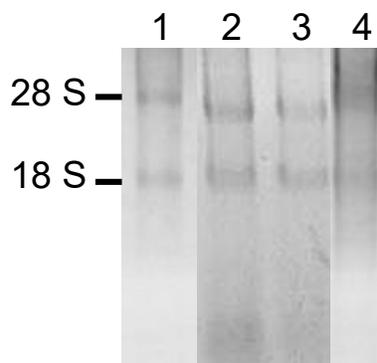
---

### ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR MULTIPLEX

---

#### 3.1.1 CALIDAD DEL RNA

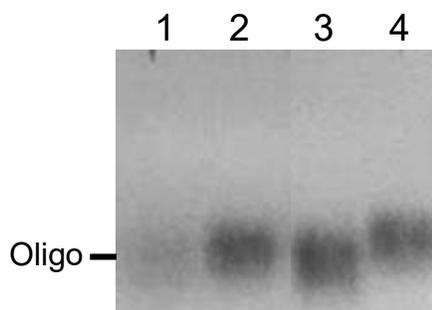
El primer paso en la estandarización de la PCR multiplex es la verificación de la calidad del RNA, que incluye la evaluación de pureza e integridad. En nuestros casos encontramos valores de pureza entre 1.74 y 2.48. Del análisis de integridad, 12 casos presentaron las bandas 28S y 18S en una relación 1:1 (Fig. 3), 3 casos presentaron la banda 5S y se eliminó una muestra en la que se vieron barridas las bandas 28S y 18S (Fig. 3).



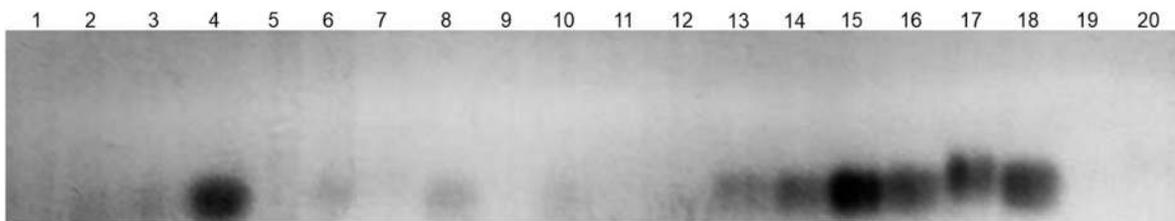
**Figura 3. Integridad del RNA.** Las bandas 28S y 18S corresponden a RNA ribosomal. Carril 1: sujeto sano, carril 2: línea celular K562, carril 3: línea celular REH y carril 4: RNA de mala calidad. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y visualizado en cámara de luz UV.

### 3.1.2 EVALUACIÓN DE OLIGOS

Debido a que la eficiencia de síntesis de los oligos no la puede controlar el fabricante, con frecuencia la concentración reportada presenta variaciones entre los oligos. Es importante cuidar la equimolaridad en cada par de oligos. Se analizó la solución concentrada de cada oligo en electroforesis de gel de agarosa, encontrando 7 pares de oligos con igualdad equimolar y 4 pares de oligos en desigualdad equimolar (Fig. 4). Después, de manera subjetiva se ajustó la proporción de cada par de oligos, tomando como base la concentración y la intensidad de banda mostrada en el gel de agarosa (Fig. 5).



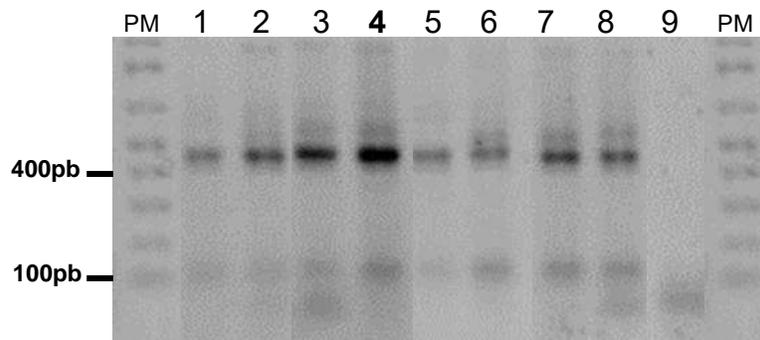
**Figura 4. Análisis de oligos.** Carril 1: oligo *MLL-A*, carril 2: oligo *AF4-B*, carril 3: oligo *TEL-A*, carril 4: oligo *AML1-B*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.



**Figura 5. Ajuste de oligos.** Carril 1: *MLL-A*, 2: *AF4-B*, 3: *MLL-C*, 4: *AF4-D*, 5: *MLL-C*, 6: *AF4-D*, 7: *TEL-A*, 8: *AML1-B*, 9: *TEL-C*, 10: *AML1-D*, 11: *E2A-A*, 12: *PBX1-B*, 13: *E2A-C*, 14: *PBX-D*, 15: *PBX-D*, 16: *E2A-C*, 17: *BCR-e1-A*, 18: *ABL-a3-B*, 19: *BCR-e1-C*, 20: *ABL-a3-D*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

### 3.1.3 CURVA DE MEZCLA DE OLIGOS PARA PCR MULTIPLEX Y *taq* POLIMERASA

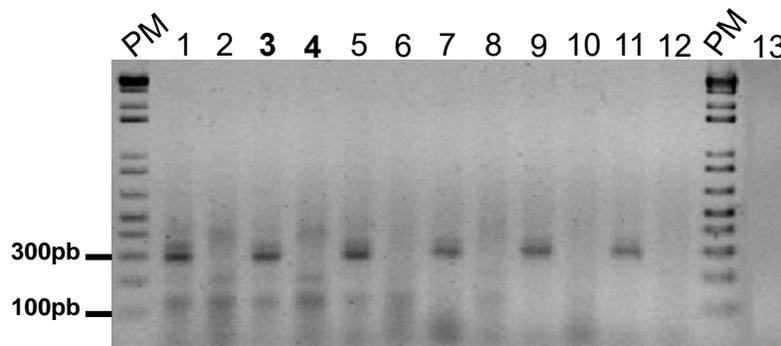
La concentración de mezcla de oligos para PCR multiplex y de *taq* polimerasa, se analizaron en la línea celular K562. Las bandas del gen de fusión *BCR/ABL* p210 b3a2 y el gen control *ABL* presentaron un mejor rendimiento con 160 nM de mezcla de oligos y 0.8 U de *taq* polimerasa (carril 4, figura 6).



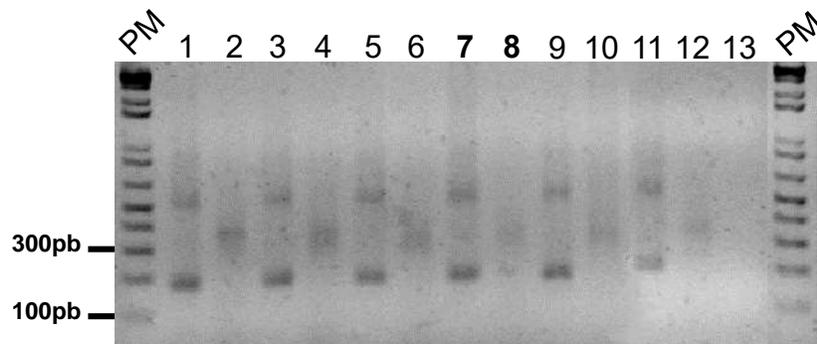
**Figura 6. Curva de mezcla de oligos para PCR multiplex y *taq* polimerasa en la línea celular K562.** PM. Marcador de peso molecular. Carril 1: 40 nM y 0.8 U, 2: 80 nM y 0.8U, 3: 120 nM y 0.8 U, 4: 160nM y 0.8U, 5: 40 nM y 1.0 U, 6: 80 nM y 1.0 U, 7: 120 nM y 1.0 U, 8: 160 nM y 1.0 U, 9: Blanco 120 nM y 0.8U de mezcla de oligos y *taq* polimerasa respectivamente. El tamaño de los productos de PCR esperados son: 417 pb del gen de fusión *BCR/ABL* p210 b3a2 y 123 pb del gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

### 3.1.4 CURVA DE TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (T<sub>m</sub>)

La T<sub>m</sub> se determinó utilizando la línea celular REH como control positivo al gen de fusión *ETV6/RUNX1* y el paciente SGEM22/18 como control negativo al gen de fusión *ETV6/RUNX1*. La T<sub>m</sub> determinada en PCR Multiplex fue 62.0°C (Fig. 7) y en PCR anidado Multiplex 64.5°C (Fig. 8). Se disminuyeron los ciclos de 35 a 30 en PCR y de 25 a 20 en PCR anidado. Se redujo el tiempo de elongación de 90 segundos a 60 segundos.



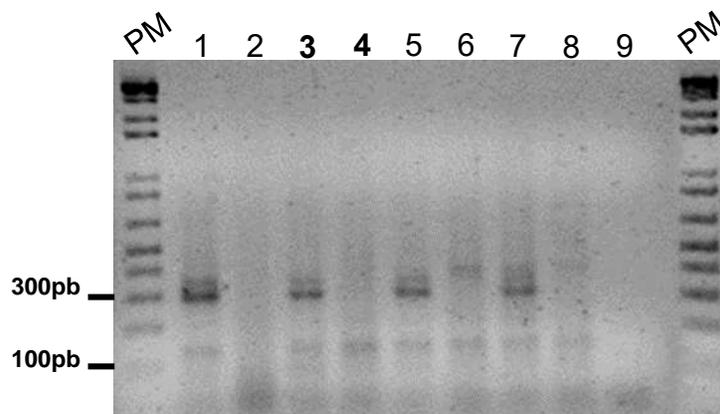
**Figura 7. Curva de temperatura de alineación en PCR multiplex.** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y SGEM22/18 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM: Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11: REH. Carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12: SGEM22/18. Carriles 1 y 2 61.0°C, carriles 3 y 4 61.9°C, carriles 5 y 6 63.1°C, carriles 7 y 8 64.4°C, carriles 9 y 10 65.2°C, carriles 11 y 12 66°C. Carril 13 blanco a 63.1°C. El tamaño de los productos de PCR son: 298 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1* y 123 pb gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.



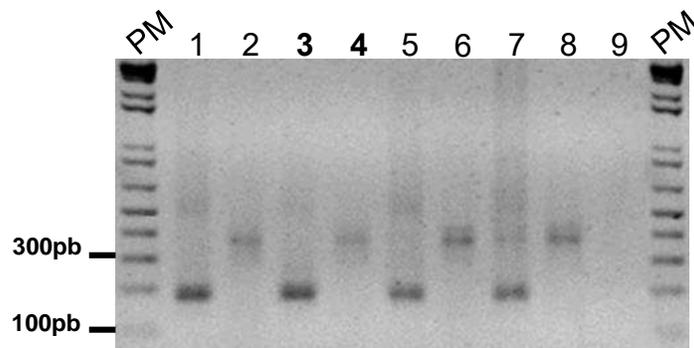
**Figura 8. Curva de temperatura de alineación en PCR anidado multiplex.** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y SGEM22/18 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM: Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11: Reh. Carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12: SGEM22/18. Carriles 1 y 2 61.0°C, carriles 3 y 4 61.9°C, carriles 5 y 6 63.1°C, carriles 7 y 8 64.4°C, carriles 9 y 10 65.2°C, carriles 11 y 12 66°C. Carril 13 blanco a 63.1°C. El tamaño de los productos de PCR son: 181 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

### 3.1.5 CURVA DE CLORURO DE MAGNESIO (MgCl<sub>2</sub>)

La concentración de MgCl<sub>2</sub> se determinó utilizando la línea celular REH como control positivo al gen de fusión *ETV6/RUNX1* y el paciente VVSS23/19 como control negativo al gen de fusión *ETV6/RUNX1*. La concentración de MgCl<sub>2</sub> determinada para PCR Multiplex y PCR anidado multiplex fue de 2.0 mM. (Figuras 9 y 10)



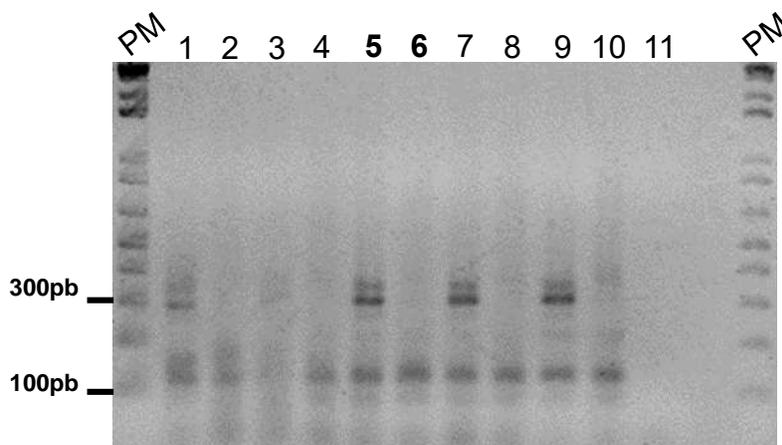
**Figura 9. Curva de MgCl<sub>2</sub> en PCR multiplex.** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y VVSS23/19 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5 y 7: REH. Carriles 2, 4, 6 y 8: VVSS23/19. Carriles 1 y 2 1.5 mM, carriles 3 y 4 2.0 mM, carriles 5 y 6 2.5 mM, carriles 7 y 8 3.0 mM. Carril 9 blanco a 1.5mM. El tamaño de los productos de PCR son: 298 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1* y 123 pb gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.



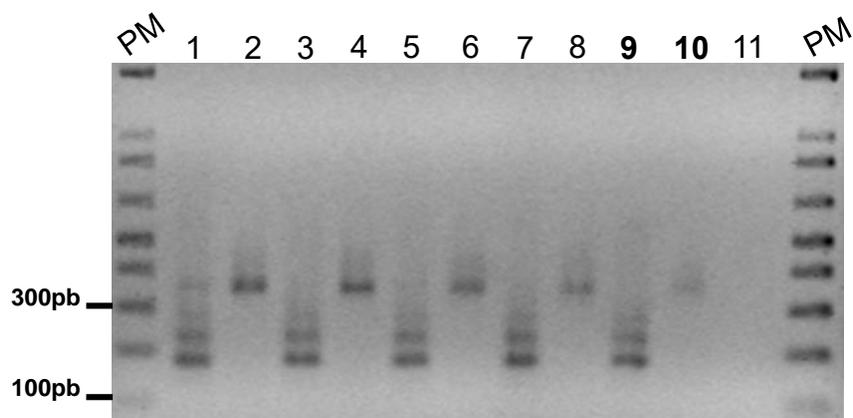
**Figura 10. Curva de  $MgCl_2$  en PCR anidado multiplex** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y VVSS23/19 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5 y 7: REH. Carriles 2, 4, 6 y 8: VVSS23/19. Carriles 1 y 2 1.5mM, carriles 3 y 4 2.0mM, carriles 5 y 6 2.5 mM, carriles 7 y 8 3.0mM. Carril 9 blanco a 1.5mM. El tamaño del producto de PCR es: 181 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

### 3.1.6 CURVA DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

La concentración de DMSO se determinó utilizando la línea celular REH como control positivo al gen de fusión *ETV6/RUNX1* y el paciente LTKE24/19 como control negativo al gen de fusión *ETV6/RUNX1*. La concentración de DMSO determinada para la PCR multiplex fue de 2.5 % (Fig. 11) y para PCR anidado multiplex 5% (Fig. 12).



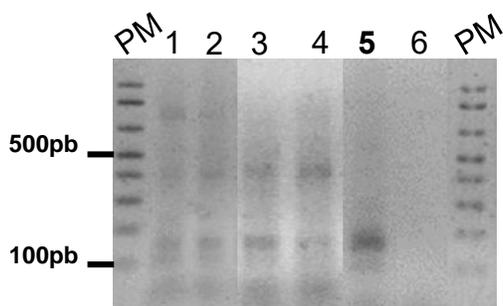
**Figura 11. Curva de DMSO en PCR Multiplex.** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y LTKE24/19 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: REH. Carriles 2, 4, 6, 8 y 10: LTKE24/19. Carriles 1 y 2 0%, carriles 3 y 4 1.25%, carriles 5 y 6 2.5%, carriles 7 y 8 3.75%, carriles 9 y 10 5%. Carril 11 blanco 0%. El tamaño de los productos de PCR son: 298 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1* y 123 pb gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.



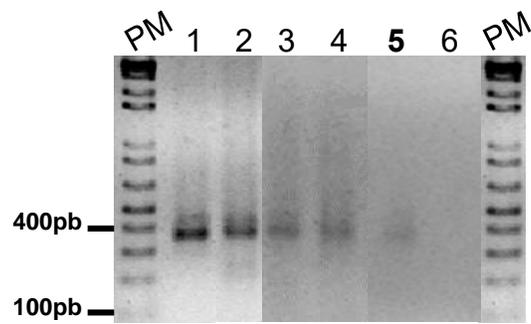
**Figura 12. Curva de DMSO en PCR anidado multiplex.** REH positivo a *ETV6/RUNX1* y LTKE24/19 negativo a *ETV6/RUNX1*. PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: REH. Carriles 2, 4, 6, 8 y 10: LTKE24/19. Carriles 1 y 2 0%, carriles 3 y 4 1.25%, carriles 5 y 6 2.5%, carriles 7 y 8 3.75%, carriles 9 y 10 5%. Carril 11 blanco 0%. El tamaño del producto de PCR es: 181 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

### 3.1.7 DISMINUCIÓN DE AMPLIFICADOS INESPECÍFICOS EN CASOS NEGATIVOS

Los casos negativos a los genes de fusión, presentaron amplificadores inespecíficos. En la PCR multiplex se observaron bandas inespecíficas entre los 400 y 800 pb, las cuales, fueron eliminadas al finalizar la estandarización (Fig. 13). En la PCR anidado multiplex se observó una banda inespecífica entre 300 y 400 pb, la cual, aunque no pudo ser eliminada por completo, se logró reducir su rendimiento (Fig. 14).



**Figura 13. Disminución de amplificadores inespecíficos en PCR multiplex.** PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 2, 3 y 4: controles negativos a los genes de fusión antes de optimizar. Carril 5: control negativo a los genes de fusión después de optimizar. Carril 6: blanco. Se observan bandas inespecíficas entre los 400 y 800 pb. Tamaño del producto de PCR esperado: 123 pb gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.



**Figura 14. Disminución de amplificadores inespecíficos en PCR anidado multiplex.**

PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1, 2, 3 y 4: controles negativos a los genes de fusión antes de optimizar. Carril 5: control negativo a los genes de fusión después de optimizar. Carril 6: blanco. Se observan bandas inespecíficas entre 300 y 400 pb. Electroforesis en gel de agarosa realizada como se describe en la figura 3.

## **ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES**

---

### **3.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES**

En el estudio se incluyeron doce pacientes con leucemia linfoblástica aguda y seis con leucemia mieloblástica aguda. Los datos clínicos generales de los pacientes se muestran en la tabla 5, destacando seis casos por debajo de los de referencia: hemoglobina, plaquetas, monocitos, neutrófilos, creatinina y cloro. Cinco casos se presentaron por arriba de los de referencia: leucocitos, blastos, glucosa, deshidrogenasa láctica y fósforo. Siete casos fueron normales.

### **3.2.2 DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL**

La información nutricional estuvo disponible sólo en 17 pacientes, 10 de ellos (58.8%) presentaron un estado eutrófico (buen estado de nutrición), 5 pacientes (29.4%) presentaron desnutrición, 1 paciente (5.8%) presentó sobrepeso y 1 paciente (5.8%) presentó obesidad.

### **3.2.3 ASIGNACIÓN DE RIESGO**

La información de asignación de riesgo al diagnóstico, estuvo disponible sólo en 13 pacientes. Un paciente (7.6%) se asignó con bajo riesgo, 11 pacientes (84.6%) se asignaron con alto riesgo y 1 paciente (7.6%) con muy alto riesgo.

**Tabla 5.** Datos clínicos de los pacientes con leucemia aguda.

DATO CLÍNICO	VALORES DE REFERENCIA	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Edad (Años)	0 – 16	8.6944	5.0033
Hemoglobina (g/dL)	13 – 16.5	8.3222	3.0622
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	150 – 450	54	41.63
Leucocitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	3.90 – 11	66.2161	114.5877
Linfocitos (%)	20 – 45	29.3125	28.9498
Monocitos (%)	4 – 10	1.4375	1.8246
Neutrófilos (%)	40 – 75	5.9375	6.4855
Blastos (%)	0 – 0	63	32.6087
Glucosa (mg/dL)	70 – 100	121.1765	40.9607
Urea (mg/dL)	15 – 44	28.2353	16.9540
Creatinina (mg/dL)	0.60 – 1.30	0.5059	0.1599
Ácido úrico (mg/dL)	2 – 7	4.7733	2.6053
DHL <sup>a</sup> (U/L)	0 – 248	2121.75	3645.82
Fósforo (mg/dL)	3 – 4.5	4.8	1.8309
Magnesio (mg/dL)	1.8 – 2.5	2.0529	0.3356
Calcio (mg/dL)	8.9 – 10.3	9.1813	0.725
Sodio (mmol/L)	135 – 144	138.5294	3.2426
Potasio (mmol/L)	3.6 – 5.1	4.0012	0.4583
Cloro (mmol/L)	101 – 111	98.7765	4.4712

a: DHL, deshidrogenasa láctica

### 3.2.4 INMUNOFENOTIPO

El diagnóstico inmunofenotípico celular, de 16 pacientes, se obtuvo del expediente clínico, encontrando 12 casos linfoides y 4 casos mieloides. Nueve casos de estirpe linfoide, presentaron fenotipos aberrantes y ningún caso de mieloides presentó aberraciones fenotípicas. Además, del análisis de DNA, 6 casos fueron hipodiploides, 5 casos diploides y 2 casos hiperdiploides (ver tabla 6).

### 3.2.5 DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES

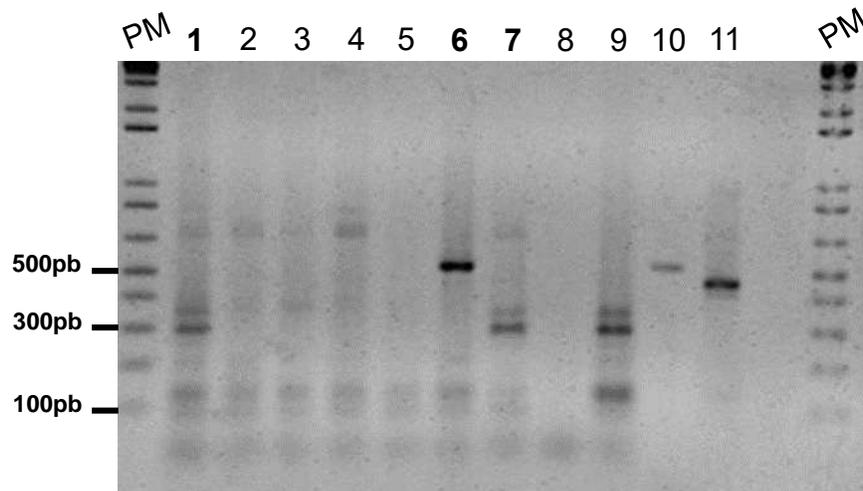
Se examinaron doce pacientes con inmunofenotipo linfoide (ver tabla 6), encontrando cuatro casos positivos a reordenamientos genéticos, dos con *ETV6/RUNX1*, uno con *AF4/MLL* e10e5 y uno con *BCR/ABL* p210 b2a2. Tres de estos casos se detectaron con la PCR multiplex (Fig. 15) y el último caso se detectó hasta realizar la PCR anidada multiplex (Fig. 16). Asimismo, se analizaron 8 pacientes con inmunofenotipo linfoide, resultando negativos a los genes de fusión examinados en el presente estudio (ver tabla 7). Las muestras positivas fueron confirmadas por PCR y PCR anidado convencional, utilizando oligos individuales.

**NOTA:** Las figuras 15 y 16 presentan bandas inespecíficas en los casos negativos a los genes de fusión, tanto en la PCR multiplex como en la PCR anidado multiplex. Esto se debe, a que estas imágenes fueron capturadas antes de optimizar al máximo la técnica.

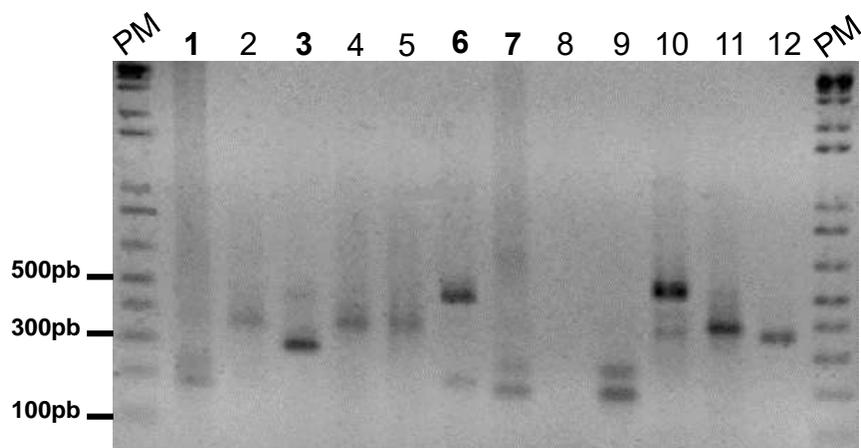
**Tabla 6.** Inmunofenotipo.

N°	CLAVE	INMUNOFENOTIPO		ÍNDICE DE DNA
		DIAGNÓSTICO	COEXPRESIÓN	
1	NAJA5/18	LLA B COMÚN	CD13, CD15, CD123, MPO	ND
2	CSN6/18	ND		1
3	SMA7/18	LLA B COMÚN	CD123, CD15, CD66c	1
4	GHLG8/18	LLA B COMÚN	CD123	ND
5	PGVM10/18	LLA B COMÚN	CD123, CD66c, CD9	1.19
6	MVJ11/18	LLA Pre-B.		ND
7	GBE12/18	LMA-M4 EO		1
8	VCA13/18	LLA Pro-B	CD13, CD33, CD117	1.19
9	SPN14/18	LMA-M3		0.92
10	GPLM15/18	LLA Pro-B	CD123, CD13, CD33	0.91
11	MMAR16/18	LMA-M3		0.93
12	MRA17/18	LLA Pro-B	CD123	1.02
13	MTIG18/18	LLA Pre-B		ND
14	NRMA19/18	LMA-M3		0.91
15	UBAI20/18	LLA Pre-B		1.01
16	SGEM22/19	LLA B COMÚN	CD123, CD15	0.93
17	VVSS23/19	LLA B COMÚN	CD123, CD66	0.86
18	LTKE24/19	ND		ND

N.D. No determinado



**Figura 15. Detección de genes de fusión en muestras de pacientes por PCR Multiplex.** PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1 y 7: positivos a *ETV6/RUNX1*. Carril 6: positivo a *AF4/MLL* e10e5. Carriles 9, 10 y 11: controles positivos a *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL* p190 e1a2 y *BCR/ABL* p210 b3a2 respectivamente. Carriles 2, 3, 4, y 5: no se detectaron genes de fusión. Carril 8: blanco. El tamaño de los productos de PCR son: 298 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1*, 514 pb *AF4/MLL* e10e5, 521 pb *BCR/ABL* p190 e1a2, 417 pb *BCR/ABL* p210 b3a2 y 123 pb gen control *ABL*. Electroforesis en gel de agarosa realizado como se describe en la figura 3.



**Figura 16. Detección de genes de fusión en muestras de pacientes por PCR anidado multiplex.** PM. Marcador de peso molecular. Carriles 1 y 7: positivos a *ETV6/RUNX1*. Carril 3: positivo a *BCR/ABL* p210 b2a2. Carril 6: positivo a *AF4/MLL* e10e5. Carriles 9, 10, 11 y 12: controles positivos a *ETV6/RUNX1*, *AF4/MLL* e10e4, *BCR/ABL* p190 e1a2, *BCR/ABL* p210 b3a2 respectivamente. Carriles 2, 4 y 5: no se detectaron genes de fusión. Carril 8: blanco El tamaño de los productos de PCR son: 181 pb gen de fusión *ETV6/RUNX1*, 285 pb *BCR/ABL* p210 b2a2, 457 pb *AF4/MLL* e10e5, 502 pb *AF4/MLL* e10e4, 381 pb *BCR/ABL* p190 e1a2 y 360 pb *BCR/ABL* p210 b3a2. Electroforesis en gel de agarosa realizado como se describe en la figura 3.

**Tabla 7.** Translocaciones detectadas.

N°	CLAVE	ÍNDICE DE DNA	TRANSLOCACIONES LINFOIDES	
			PCR MULTIPLEX	LABORATORIO PRIVADO
1	NAJA5/18	ND	NO DETECTADO	NO DETECTADO
2	SMA7/18	1	NO DETECTADO	NO DETECTADO
3	GHLG8/18	ND	<i>ETV6/RUNX1</i> t(12;21)	<i>ETV6/RUNX1</i> t(12;21)
4	PGVM10/18	1.19	NO DETECTADO	NO DETECTADO
5	MVJ11/18	ND	<i>BCR/ABL1</i> p210 b2a2	ND
6	VCA13/18	1.19	NO DETECTADO	NO DETECTADO
7	GPLM15/18	0.91	NO DETECTADO	NO DETECTADO
8	MRA17/18	1.02	<i>AF4/MLL</i> t(4;11) e10e5	<i>AF4/MLL</i> t(4;11)
9	MTIG18/18	ND	<i>ETV6/RUNX1</i> t(12;21)	ND
10	UBAI20/18	1.01	NO DETECTADO	NO DETECTADO
11	SGEM22/19	0.93	NO DETECTADO	NO DETECTADO
12	VVSS23/19	0.86	NO DETECTADO	NO DETECTADO

N.D. No determinado

## CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN

---

La detección de reordenamientos genéticos, es una herramienta de gran importancia en el diagnóstico y clasificación de riesgo de la leucemia linfoblástica aguda infantil. En el presente estudio, se estandarizó una técnica PCR multiplex con el objetivo de detectar los marcadores moleculares más comunes en la LLA infantil. Además, se analizaron los datos clínicos de los casos incluidos en el estudio.

El RNA de los casos incluidos, presentó valores de pureza de entre 1.74 y 2.48, los cuales se ajustan a los límites descritos en la bibliografía. Los valores de entre 2.0 a 2.2 son considerados de pureza óptima y los valores  $> 1.7$  se consideran de pureza aceptable. Los casos con un valor de pureza  $>2.2$  no deben ser descartados, ya que, en procedimientos posteriores se puede valorar su funcionalidad (41, 62, 63). El análisis de integridad de RNA presentó en su mayoría casos con una relación 1:1 de las bandas 28S y 18S, lo cual, puede deberse a la escasa cantidad de RNA que utilizamos para el análisis electroforético, o incluso, a errores técnicos en la extracción de RNA. Para el análisis de integridad en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio, se necesita como mínimo 200 ng de RNA y para una visualización óptima, se requiere 1  $\mu$ g de RNA (64, 65).

El hecho de obtener un resultado regular en el análisis electroforético de integridad, no significa que las muestras ya no sean aptas para utilizarse en la síntesis de cDNA y su posterior análisis por PCR (66). Uno de los casos analizados obtuvo un rendimiento muy pobre de RNA, siendo imposible valorar su integridad y pureza correctamente. Sin embargo, se continuó con su análisis, resultando en la amplificación del gen control *ABL* y del gen de fusión *ETV6/RUNX1*. Esto fue confirmado al comparar nuestros resultados con los obtenidos en el laboratorio privado, demostrando así, la sensibilidad y confiabilidad del método establecido en la presente investigación.

La desigualdad equimolar entre los pares de oligos, se debe a un conjunto de variables presentes en el proceso de síntesis de oligonucleótidos. La longitud del oligo, secuencia, contenido de guanina-citocina, la eficiencia de acoplamiento y la purificación, son factores que pueden modificar el rendimiento final del oligo en su proceso de síntesis (67). Es por esto, que el ajuste equimolar de los oligonucleótidos, debe realizarse antes de comenzar la estandarización del método PCR multiplex y así, establecer la concentración necesaria de cada oligo, para generar una mezcla equimolar de oligonucleótidos (48). En el presente estudio, el 36.3% de los pares de oligos presentaron una desigualdad equimolar y fue necesario ajustar la concentración de cada uno de ellos. El análisis electroforético de oligonucleótidos por luz UV, es un método con interpretación subjetiva, sin embargo, al comparar los oligos entre carriles adyacentes y con marcadores de peso molecular, es posible determinar diferencias de concentración entre los oligonucleótidos analizados. (68)

Markoulatos y col, (2002), sugieren utilizar de 40 a 400 nM de oligonucleótidos en una PCR multiplex, donde los productos de PCR sean de baja complejidad, o se requiera un gran número de copias. La concentración de oligos determinada, se ajusta al rango descrito por Markoulatos y col, (2002), sin embargo, la concentración es mayor a los 120 nM propuestos por Pakakasama y col, (2008). En cuanto a la concentración de *taq* polimerasa, Pakakasama estandarizó su protocolo PCR multiplex, con 0.04 U/ $\mu$ L de enzima. En contraste, Scurto y col, (1998), utilizaron una mayor concentración de *taq* polimerasa (0.1 U/ $\mu$ L). La concentración de *taq* polimerasa establecida en el presente estudio, coincide con la sugerida por Pakakasama, dado que, en esta concentración fue posible obtener mayor sensibilidad y especificidad de la reacción. En cambio, la concentración determinada de oligonucleótidos, es superior a la descrita en protocolos previos de diagnóstico de LLA por PCR multiplex. Esta discrepancia, puede ser el resultado de haber añadido pares adicionales de oligos.

Dos estudios estandarizaron su protocolo PCR multiplex con *taq* Gold y *AmpliTaq* Gold (24, 50). Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran una gran diferencia en cuanto a la especificidad de la reacción, dado que, también se observan bandas inespecíficas en sus geles de agarosa. En cambio, Pakakasama y col, (2008), estandarizaron su técnica con *taq* polimerasa (Invitrogen®), obteniendo amplificadas con muy poca inespecificidad, no obstante, fue imposible para nosotros reproducir esos resultados utilizando las mismas condiciones que describen en su estudio. Por lo tanto, fue necesario evaluar otras variables.

Si se aumenta la temperatura de alineación, es posible mejorar la especificidad de la reacción. En ensayos multiplex, es necesario estandarizar una temperatura de alineación que nos asegure su reproducibilidad (42). Al estandarizar la temperatura de alineación, se obtuvo un valor de  $T_m$  más alto en la PCR anidada multiplex, que en la PCR multiplex de primera ronda. En la figura 8 se observa una curva creciente de  $T_m$ , conforme la temperatura aumenta, el rendimiento de amplificadas inespecíficas disminuye. Malhotra y col, (1998), concluyeron que conforme la temperatura de alineación aumenta, la exactitud del alineamiento de los oligos es beneficiada, llevando a una amplificación más específica y reproducible. Las temperaturas de alineación establecidas en el presente estudio, son distintas a las sugeridas en la bibliografía (59), probablemente, esto se debe a la adición de los pares de oligos del gen de fusión *BCR/ABL* b3a2 y b2a2, y del gen control *ABL*.

La cantidad de ciclos y el tiempo de duración de cada uno, pueden ser reducidos en la PCR con el objetivo de eliminar bandas inespecíficas, no obstante, el rendimiento puede verse afectado (42, 48). La cantidad de ciclos y el tiempo de duración, fueron reducidos en función a lo descrito por Henegariu y col, (1997) y Espinosa, (2007). La cantidad de ciclos en PCR multiplex, coincide con lo planteado por Marín y col, (2001). La cantidad de ciclos en PCR anidada multiplex, coincide con lo establecido por Pallisgaard, y col, (1998). Al reducir la cantidad de ciclos y el tiempo de duración, se observó que el rendimiento de las bandas inespecíficas había disminuido, sin haber alterado al rendimiento de los

amplificados de interés. De esta manera, fue posible mejorar la especificidad, sin perjudicar la sensibilidad de la reacción.

Es posible incrementar el rendimiento del producto de PCR si se añade una concentración superior de  $MgCl_2$ , sin embargo, el aumento de cationes  $Mg^{2+}$  en la reacción, afectará negativamente a la especificidad y la fidelidad de la DNA polimerasa (52). Markoulatos y col, (2002), recomiendan utilizar de 1.5 a 2.0 mM de  $MgCl_2$ , en ensayos PCR multiplex. Diversos estudios, utilizaron de 1.5 a 1.65 mM de  $MgCl_2$  (50, 59, 70). En cambio, Scurto y col, (1998), estandarizaron su técnica con 3.5 mM. La concentración de  $MgCl_2$  obtenida en la presente investigación, fue elegida por descarte, eliminando aquellas concentraciones donde el rendimiento fue pobre, o la especificidad inadecuada. La concentración establecida de 2.0 mM, no coincide con ensayos previos de diagnóstico de LLA por PCR multiplex, pero se encuentra dentro del límite planteado por Markoulatos, manteniendo un buen rendimiento y una especificidad aceptable.

Idealmente, la concentración de DMSO no debe exceder el 5% y es necesario valorar distintas concentraciones con el objetivo de mejorar el rendimiento de la reacción y su especificidad, sin inhibir la actividad enzimática (48). En la PCR multiplex, se observó un mayor rendimiento en el amplificado, en función del aumento de concentración de DMSO. Simonovic y col, (2012), demostraron que la inclusión de 5% de DMSO en protocolos de PCR, no solo mejora la especificidad, también, incrementa la sensibilidad de la reacción permitiendo la amplificación de genes de baja expresión. Sidhu, y col, (1996), proponen que este fenómeno es el resultado de un cambio en la actividad térmica de la DNA polimerasa y la desestabilización de estructuras secundarias dentro de la plantilla de DNA, permitiendo una eficiente alineación de los oligonucleótidos. Además, Sidhu sugiere que la concentración óptima de DMSO, está en función de la plantilla analizada y es posible utilizar de 2 a 10% de DMSO. La concentración de DMSO para PCR multiplex y PCR anidada multiplex, fueron valoradas en función del mejor rendimiento de amplificados de interés y el mínimo de amplificados inespecíficos. En la PCR multiplex de primera ronda, la concentración

de 2.5% fue óptima, en cambio, en la PCR anidada multiplex, siempre se observó mayor cantidad de bandas inespecíficas, a causa de ello, se optó por utilizar 5% de DMSO con la finalidad de reducir los productos inespecíficos.

El resultado obtenido en la disminución de amplificadores inespecíficos en PCR multiplex, coincide con lo presentado en protocolos previos (24, 59, 72). No fue posible comparar la presencia de amplificadores inespecíficos en PCR anidado multiplex con estudios anteriores, dado que, ellos realizaron una PCR con oligos individuales como prueba confirmatoria (50), o no utilizaron esta técnica (24, 59, 72). Aunque en la PCR anidado multiplex no se logró eliminar por completo los amplificadores inespecíficos, es posible diferenciar un amplificado inespecífico de un amplificado de gen de fusión, ya que, los amplificadores correspondientes a los genes de fusión mostraron mayor intensidad en el gel de agarosa.

Los datos clínicos de los pacientes con leucemia aguda, mostraron la presencia de anemia, trombocitopenia y una cuenta promedio de leucocitos mayor a  $50 \times 10^3/\text{mm}^3$ , destacando este último parámetro, como un factor de pronóstico adverso (2). La baja concentración de células sanguíneas de estirpe mieloide (neutrófilos y monocitos), se debe a que la mayoría de los casos analizados de leucemia aguda son de inmunofenotipo linfocítico y estos casos al poseer una proliferación descontrolada de células linfocíticas inmaduras, invaden la médula ósea y bloquean la hematopoyesis normal (18). La hiperglucemia puede presentarse como respuesta al estrés agudo, por ejemplo, infecciones (73). Los casos analizados mostraron valores disminuidos de creatinina, ya que, es muy raro que un paciente con LLA presente fallo renal como manifestación primaria de su patología (74).

Solamente el fósforo y el cloro mostraron alteraciones en su concentración. La hiperfosfatemia se debe a una rápida lisis de células leucémicas, comúnmente, su valor incrementa después de administrar quimioterapia (75). La hipocloremia, se incluye en cambios paralelos en los valores de sodio y bicarbonato, produciendo hiperexcitabilidad del SNC y músculos (73). La Deshidrogenasa Láctica suele encontrarse elevada en pacientes con leucemia, daño renal o

hepático (10, 73). En los casos analizados, el valor promedio de DHL fue de 2121.75 U/L. Se ha reportado un valor promedio de DHL de 2091.98 U/L y una desviación estándar de 1073.20 en pacientes pediátricos con LLA (76). En cambio, la desviación estándar de esta variable en el presente estudio fue de 3645.82. La dispersión de los datos fue originada por la inclusión de un caso con valor de DHL de 11070 U/L. Se decidió mantener los datos estadísticos de este caso dentro del análisis, puesto que, se le detectó el gen de fusión *BCR/ABL* p210 b2a2.

Un tercio de los casos incluidos en el estudio, presentaron desnutrición. Abdul y col, (2017), concluyeron que la malnutrición se presenta en gran proporción, hasta en un 50% de los pacientes pediátricos con leucemia linfocítica aguda. Herintya y col, (2008), sugirieron que la razón por la cual los niños desnutridos tienen un peor pronóstico, se debe a la disminución de reservas en la médula ósea, provocando que la dosis de quimioterapia administrada sea menos efectiva para el mantenimiento del paciente. Es por esto, que el diagnóstico y el seguimiento nutricional, son de gran importancia para asegurar un tratamiento óptimo y exitoso (77). Los casos analizados en el estudio actual, presentaron un 22.2% de mortalidad, este hecho podría estar relacionado con su desnutrición.

La prevalencia de alto riesgo en los casos estudiados fue de 84.6%, este valor difiere con lo descrito por Bekker-Méndez y col, (2014), los cuales asignaron en alto riesgo a un 44.2% de su población. En cambio, Verduzco-Rodriguez, (2018), clasificó al 78% de sus pacientes en alto riesgo. Este valor tan elevado, coincide con lo obtenido en el presente estudio. Se ha sugerido que la población mexicana posee una gran prevalencia de casos asignados al grupo de alto riesgo, lo cual, podría explicar parcialmente su peor pronóstico (79).

La LLA fue el tipo de leucemia más frecuente, representando un 75% de los casos y la LMA tuvo una frecuencia del 25%. La elevada prevalencia de LLA en pacientes pediátricos mexicanos, coincide con lo descrito por Rivera-Luna y col, (2015), los cuales encontraron una frecuencia del 83% de LLA en pacientes de 0 a 18 años. Pérez-Saldivar y col, (2011), determinaron una frecuencia de 85.1% de LLA en pacientes menores a 15 años. Estos datos indican, que la población

mexicana puede ser más susceptible a desarrollar neoplasias de estirpe linfoide, que de estirpe mieloide.

El 75% de los casos de LLA presentaron un fenotipo aberrante. Ibrahim y col, (2017), reportaron una frecuencia de 16.13% de fenotipos aberrantes en pacientes pediátricos. Zulfikar y col, (2013) , encontraron que el 22.58% de su población, tenían características bifenotípicas. La frecuencia que se encontró en el presente estudio fue muy alta si la comparamos con la bibliografía, sin embargo, el tamaño de muestra analizado es insuficiente para obtener un resultado estadístico de confianza. Se sugiere prestar atención a esta variable en futuras investigaciones.

El resultado del índice de DNA fue anormal en el 61.5% de los casos, donde el 46.1% se clasificó como hipodiploide y el 15.3% como hiperdiploide. Rachieru-Sourisseau y col, (2010), encontraron alteraciones en el índice de DNA en el 60% de sus casos, coincidiendo con la frecuencia obtenida en nuestro estudio. Cervantes y col, (2018), clasificaron el 62% de sus casos como diploides, 38% como hiperdiploide y no encontraron casos hipodiploides. Esto indica, una alta prevalencia de casos hipodiploides en nuestra población estudiada. Las categorías se establecieron por los siguientes puntos de corte: 0.95 – 1.05 (diploide), <0.95 (hipodiploide) y >1.05 (hiperdiploide) (17).

La prevalencia determinada de reordenamientos genéticos fue de 33.3%, la cual, es semejante al 30.1% detectado por Jiménez-Morales y col, (2008). En cambio, Bekker-Méndez y col, (2014), precisan una prevalencia menor, con 17.7% de reordenamientos detectados. El gen de fusión *ETV6/RUNX1* estuvo presente en un 16.6%, el gen *BCR/ABL* p210 b2a2 en un 8.3% y el gen *AF4/MLL* e10e5 en un 8.3%. Todos los valores de prevalencia se encuentran elevados, destacando al gen de fusión *BCR/ABL*, el cual, normalmente se ha reportado en un rango de 1.8 a 3.8% en otros estudios (25, 82). El gen de fusión *AF4/MLL*, se ajusta a los valores de prevalencia determinados en diversos estudios, con un rango de 1.4 a 8.7% (25, 83). El gen de fusión *ETV6/RUNX1* presentó una prevalencia mayor a la reportada, la cual es descrita en un rango de 7.4 a 13.5%, por múltiples autores

(25, 82, 83). La prevalencia elevada de los genes de fusión *BCR/ABL* y *ETV6/RUNX1*, se debe probablemente, a que el análisis de prevalencia de reordenamientos genéticos, estuvo conformado por 12 casos de LLA infantil. En cambio, estudios previos han incluido desde 26 hasta 287 casos de LLA infantil (25, 82-84). En consecuencia, es necesario incrementar la cantidad de casos incluidos en futuras investigaciones y observar si se mantiene la alta prevalencia.

Rivera-Luna y col, (2015), reportaron una tasa de incidencia de leucemia infantil de 78.1/millón/año en México. En cambio, en el presente estudio solamente se incorporaron 18 muestras de pacientes con leucemia aguda infantil en un periodo de 6 meses. Lo cual, fue equivalente a una incidencia de 7.8/millón/año en el estado de Michoacán, tomando como referencia la población total del estado de Michoacán determinada por el INEGI, (2015). La incidencia determinada en el presente estudio, fue menor a la planteada por Rivera-Luna, sin embargo, es importante tomar en cuenta para futuras investigaciones la cantidad de casos incluidos en el estudio, de modo que, sea posible corroborar la baja incidencia en la población.

Un caso positivo al gen de fusión *BCR/ABL* p210 b2a2, se detectó hasta realizar la PCR anidada multiplex, este caso tuvo un bajo rendimiento de RNA, sin embargo, amplificó el gen control. Se ha reportado que la PCR convencional no es lo suficientemente sensible para detectar algunos genes de fusión. Downing y col, (1994), reportaron la utilidad diagnóstica de la PCR nested, la cual, fue necesaria para detectar los transcritos de fusión *AF4/MLL* en el 26% de los casos. Uckun y col, (1998), encontraron que la PCR es capaz de detectar 1% de células positivas para *AF4/MLL* por cada  $10^7$  células, en cambio, la PCR nested fue 100 veces más sensible permitiendo la detección de 0.01% de células positivas por cada  $10^7$  células. Es decir, en PCR convencional, lograron detectar 1 célula positiva al gen de fusión por cada 100 células normales y en PCR anidada, se detectó 1 célula positiva por cada 10,000 células normales. La PCR anidada debería incluirse dentro de los protocolos de diagnóstico molecular, con el objetivo de eliminar falsos negativos y falsos positivos.

Diversos estudios han encontrado que la técnica PCR Multiplex es útil y conveniente, en la detección de marcadores moleculares de LLA, ya que, resulta más rentable en tiempo y dinero invertidos, además de conservar la confiabilidad del método (24, 59, 72, 87). En nuestro grupo de trabajo, era necesario realizar hasta 11 PCR individuales, para analizar los genes de fusión más frecuentes en la LLA. Actualmente, gracias al establecimiento de la PCR multiplex, solo son necesarias 2 PCR multiplex para cumplir el mismo objetivo, reduciendo hasta en un 81.8% la cantidad de reacciones necesarias. El resultado obtenido no solo disminuye el tiempo y esfuerzo necesarios para ejecutar el análisis, también optimiza la cantidad de muestra biológica requerida, utilizando únicamente 2  $\mu$ L de cDNA en todo el proceso diagnóstico.

Al comparar las translocaciones detectadas por la metodología PCR multiplex y las detectadas en el laboratorio privado de referencia, podemos sugerir, que la técnica PCR multiplex estandarizada cuenta con la suficiente confiabilidad para ser utilizada en la detección de marcadores moleculares de LLA infantil.

## CAPÍTULO V - CONCLUSIONES

---

- Las condiciones estandarizadas en la técnica PCR multiplex y PCR anidada multiplex fueron exitosas, permitiendo la detección de marcadores moleculares en muestras de pacientes pediátricos con LLA.
- El método fue optimizado para reducir la presencia de bandas inespecíficas, manteniendo la reproducibilidad de la técnica.
- El establecimiento de una técnica PCR multiplex no solo reduce el tiempo y esfuerzo necesarios para el análisis, también, el hecho de utilizar una cantidad mínima de cDNA abre las posibilidades de emplear esa muestra biológica en futuras investigaciones.
- Una limitante del estudio fue el tamaño de muestra, dado que, esto podría modificar la prevalencia de las variables. Se sugiere estudiar a fondo las características clínicas incluidas en este estudio y utilizar un tamaño de muestra adecuado.

## REFERENCIAS

---

1. Mayani H, Rosana P, Montesinos J, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007;2:95-107.
2. Moraleda Jiménez JM, García Insausti C. *Pregrado de hematología*. 4th ed. Madrid, España: Sociedad Española de Hematología y Hematoterapia; 2017. 740 p.
3. Longo D. *Harrison's Hematology and Oncology*. 1st ed: McGraw-Hill Medical; 2010. 789 p.
4. McKenzie S. *Hematología Clínica*. 2nd ed. DF, México: El Manual Moderno; 2000. 872 p.
5. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2002;15(4):597-621.
6. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treatment Reviews*. 2010;36:286–97.
7. Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. Barcelona, España: El Sevier; 2015. 1393 p.
8. Gallegos-Arreola M, Borjas-Gutierrez C, Zúñiga-González G, Figuera L, Puebla-Perez A, García-González J. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia, *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia - From the Molecules to the Clinic*. IntechOpen. 2013:43-73.
9. Rivera-Luna R, Cárdenas-Cardos R, Olaya-Vargas A, Shalkow-Klincovstein J, Perez-García M, Pérez-González O, et al. El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológicas. *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*. 2015;60(2):91-7.
10. Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons J. *Hematología Clínica*. 5th ed. Madrid, España: El Sevier; 2006. 807 p.
11. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*. 2012;16(6):453-62.

12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-8.
13. Arroyo G, Sáñez F, Valenciano E. INTERPRETACION MORFOLOGICA Y CITOLOGICA DE LA LEUCEMIA AGUDA. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. 1982:45.
14. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993;82(2):343-62.
15. Wang Y, McIntyre C, Mittar D. Cell Cycle and DNA Content Analysis Using the BD Cycletest Assay on the BD FACSVerse™ System. *BD Biosciences.* 2011:1-12.
16. Rachieru-Sourisseau P, Baranger L, Dastugue N, Robert A, Genevieve F, Kuhlein E, et al. DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *Int J Lab Hematol.* 2010;32(3):288-98.
17. Cervantes E, Enriquez DJ, Vidal J, Retamozo R. Prognostic Value of DNA Index By Flow Cytometry for Minimal Residual Disease in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 2018;132(1):5287-90.
18. CSG. Guía de Práctica Clínica de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda. México: Secretaria de Salud; 2009. 42 p.
19. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2013;381(9881):1943-55.
20. Marshall G, Haber M, Kwan E, Zhu L, Ferrara D, Xue C, et al. Importance of Minimal Residual Disease Testing During the Second Year of Therapy for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2003;21(4):704-9.
21. Greaves M. Science, medicine, and the future: Childhood leukaemia. *BMJ.* 2002;324(7332):283-7.

22. Rubin C, Le Beau M, Mick R, Bitter M, Nachman J, Rudinsky R, et al. Impact of Chromosomal Translocations on Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 1991;9(12):2183-2.
23. Jiménez Arce G, Carrillo J, Chávez M, Jiménez R, Vargas M, Campos L, et al. Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. *Rev Biol Trop*. 2007;56(4).
24. Liang DC, Shih LY, Yang CP, Hung IJ, Chen SH, Jaing TH, et al. Multiplex RT-PCR assay for the detection of major fusion transcripts in Taiwanese children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol*. 2002;39(1):12-7.
25. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, Olarte-Carrillo I, Guerra-Castillo FX, Pompa-Mera EN, et al. Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study— Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-8.
26. Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, Carroll AJ, Crist WM, Link M, et al. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood*. 1991;77(2):324-30.
27. iBMCC. TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS. Salamanca, España: Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca; 2017 [Disponible en: <http://www.cicancer.org/es/translocaciones-cromosomicas>].
28. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-28.
29. Lavaut Sánchez K, Hernández Aguilar N. Patrones de hibridación del gen ETV6/RUNX1 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter*. 2017;33(2):1-10.
30. Artigas A CG, Cabrera C ME, Melo A A, Páez F E, Arriagada M M, Astete A C, et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista médica de Chile*. 2006;134(11):1367-76.

31. Huret J, Bernheim A. t(12;21)(p13;q22) ETV6/RUNX1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1997;1(1):19-20.
32. Linka Y, Ginzler S, Krüger M, Novosel A, Gombert M, Kremmer E, et al. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. Blood Cancer Journal. 2013;3(10):1-9.
33. Núñez-Enríquez JC, Mejía-Arangur JM. Biología molecular y leucemia: E2A-PBX1 y recaída al sistema nervioso central. Revista Medica Inst Mex Seguro Soc. 2015;53(3):236-9.
34. Felice M, Gallego C, Alonso C, Alfaro E, Gutter M, Bernasconi A, et al. Prognostic impact of t(1;19)/TCF3–PBX1 in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of Berlin–Frankfurt–Münster-based protocols. Leukemia & Lymphoma. 2011;52(7):1215-21.
35. Uckun F, Sensel M, Sather H, Gaynon P, Arthur D, Lange B. Clinical Significance of Translocation t(1;19) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in the Context of Contemporary Therapies A Report From the Children's Cancer Group. Journal of Clinical Oncology. 1998;16(2):527-35.
36. Faramand R, Dalia S. t(4;11)(q21;q23) KMT2A/AFF1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2018;22(1):30-3.
37. Castaño J, Herrero AB, Bursen A, González F, Marschalek R, Gutiérrez NC, et al. Expression of MLL-AF4 or AF4-MLL fusions does not impact the efficiency of DNA damage repair. Oncotarget. 2016;7(21):30440-52.
38. Sanjuan-Pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R, et al. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;126(25):2676-85.
39. LHCNCBC. ABL1 gene USA: U.S. National Library of Medicine; 2019 [Disponibile en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1#>].
40. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase

polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-86.

41. Sambrook J, Russel D, Irwin N, Janssen K. *Molecular Cloning A laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 2231 p.

42. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: *Ecología molecular / compiladores: Luis E. Eguiarte, Valeria Souza, Xitlali Aguirre*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología : Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2007:517-26.

43. Joshi M, Deshpande JD. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *IJBR*. 2011;2(1):81-7.

44. Alonso C, Gallego M, Alfaro E, Rossi J, Felice M. Caracterización molecular en leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria. *HEMATOLOGIA*. 2006;10(1):8-12.

45. Haff L. Improved Quantitative PCR Using Nested Primers. *Genome Research*. 1994;3:332-7.

46. Uckun F, Herman-Hatten K, Crotty M, Sensel H, Sather H, Tuel-Ahlgren L, et al. Clinical Significance of MLL-AF4 Fusion Transcript Expression in the Absence of a Cytogenetically Detectable t(4;11)(q21;q23) Chromosomal Translocation. *Blood*. 1998;92(3):810-21.

47. Markoulatos P, Sifakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2002;16(1):47-51.

48. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. 1997;23(3):504-11.

49. Scurto P, Hsu Rocha M, Kane J, Williams W, Haney D, Conn W, et al. A multiplex RT-PCR assay for the detection of chimeric transcripts encoded by the risk-stratifying translocations of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1998;12:1994-2005.

50. Pallisgaard N, Hokland P, Dorthe C, Pedersen B, Jorgensen P. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of

- 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. *Blood*. 1998;92(2):574-88.
51. Simonovic A, Trifunovic M, Raspor M, Cingel A, Bogdanovic M, Dragicevic M, et al. DIMETHYL SULFOXIDE IMPROVES SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF RT-PCR AND QRT-PCR AMPLIFICATION OF LOW-EXPRESSED TRANSGENES. *Archives of Biological Sciences*. 2012;64(3):865-76.
52. Lorenz T. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012;63:1-15.
53. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1-5.
54. Goss V, Lee K, Moritz A, Nardone J, Spek E, MacNeill J, et al. A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood*. 2006;107(12):4888-97.
55. DSMZ. REH ACC 22. Braunschweig, Alemania: Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; 2019 [Disponible en: <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-22.html>].
56. ATCC. RS4;11 (ATCC® CRL-1873™) Manassas, VA, USA: American Type Culture Collection; 2019 [Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1873.aspx>].
57. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*. 2011;11(1):355.
58. Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME, Cancela MDC. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2011;29(2):96-102.
59. Pakakasama S, Kajana S, Kanjanapongkul S, Sirachainan N, Meekaewkunchorn A, Ningsanond V, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. Blackwell Publishing Ltd, *Int Jnl Lab Hem*. 2008;30:286-91.
60. ATCC. K-562 (ATCC® CCL-243™) Manassas, VA, USA: American Type Culture Collection; 2019 [Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-243.aspx>].

61. ATCC. SUP-B15 (ATCC® CRL-1929™) Manassas, VA, USA: American Type Culture Collection; 2019 [Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1929.aspx>].
62. BNADN. PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS: Universidad de Salamanca; 2016 [Disponible en: <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>].
63. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity. In: Scientific TF, editor. Wilmington, USA: Thermo scientific; 2015. p. 1-2.
64. LONZA. Separation of RNA in Agarose Gels: Lonza Research; 2009 [Disponible en: [https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/CH/en/document/download/29569](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/document/download/29569)].
65. Enke R. Agarose Gel & Spectrophotometer Analysis of Total RNA Extractions: RNA-Seq for the NextGeneration; 2016 [Disponible en: <http://www.rnaseqforthenextgeneration.org/files/resources/enke/Enke-RNA-gel-spectrophotometer-analysis-wet-lab.pdf>].
66. Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, et al. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(9):e63.
67. Prediger E. Scale and yield—are they the same? : Integrated DNA Technologies; 2013 [Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/scale-and-yield-are-they-the-same->].
68. Yale. Analysis and Purification of Oligonucleotides by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) New Haven, CT: Yale School of Medicine; 2018 [Disponible en: [https://medicine.yale.edu/keck/oligo/services/protocols/pagepdf\\_27840\\_284\\_4176\\_v1.pdf](https://medicine.yale.edu/keck/oligo/services/protocols/pagepdf_27840_284_4176_v1.pdf)].
69. Malhotra K. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1998;26(3):854-6.
70. Marín C, Martínez-Delgado B, Meléndez B, Larrayoz M, Martínez-Ramírez A, Robledo M, et al. Multiplex-polymerase chain reaction assay for the detection of

prognostically significant translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2001;86(12):1254-60.

71. Sidhu MK, Liao M-J, Rashidbaigi A. Dimethyl Sulfoxide Improves RNA Amplification. *BioTechniques*. 1996;21(1):44-7.

72. Cho Y-U, Chi H-S, Park C-J, Jang S, Seo E-J. Rapid Detection of Prognostically Significant Fusion Transcripts in Acute Leukemia Using Simplified Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Korean Medical Science*. 2012;27(10):1155-61.

73. Pagana K, Pagana T. *Laboratorio clínico: indicaciones e interpretación de resultados*. 1st ed. México, D.F.: El Manual Moderno; 2015.

74. Bhatia NG, Sneha LM, Selvan SM, Scott JJ. Acute renal failure as an initial manifestation of acute lymphoblastic leukemia. *Indian journal of nephrology*. 2013;23(4):292-3.

75. O'Regan S, Carson S, Chesney R, Drummond K. Electrolyte and acid-base disturbances in the management of leukemia. *Blood*. 1977;49(3):345-53.

76. Hafiz MG, Mannan MA. Serum lactate dehydrogenase level in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2007;33(3):88-91.

77. Abdul R, Hassan J, Aldorky M. Nutritional Assessment of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Archives in Cancer Research*. 2017;05(1):1-9.

78. Herintya F, Mulatsih S, Paryanto E. Association between nutritional status and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia treated with Wijaya Kusuma Protocol. *Paediatrica Indonesiana*. 2008;48(1):28-32.

79. Verduzco-Rodriguez L. Prevalence of high risk acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Mexico, a possible explanation for outcome disparities. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15).

80. Ibrahim A, Hameed B. Prognostic value of myeloid antigens expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Iraqi Journal of Hematology*. 2017;6(1):12-6.

81. Zulfikar OB, Cakir B, Koc B. The outcome of acute biphenotypic leukemias in childhood: A single center experience. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15):18006.

82. Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldana-Alvarez Y, Perez-Vera P, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res.* 2008;32(10):1518-22.
83. Pérez-Vera P, Salas C, Montero-Ruiz O, Frías S, Dehesa G, Jarquín B, et al. Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2008;184(2):94-8.
84. Daniel-Cravioto A, Gonzalez-Bonilla CR, Mejia-Arangure JM, Daniel-Cravioto A, Gonzalez-Bonilla CR, Mejia-Arangure JM, et al. Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leukemia & Lymphoma.* 2009;50(8):1352-60.
85. INEGI. Número de habitantes en el estado de Michoacán de Ocampo México: INEGI. Encuesta intercensal; 2015 [Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mich/poblacion/>].
86. Downing J, Head D, Raimondi S, Carroll AJ, Curcio-Brint A, Motroni T, et al. The der(11)-Encoded MLLIAF-4 Fusion Transcript Is Consistently Detected in t(4;11)(q21;q23)-Containing Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 1994;83(2):330-5.
87. Salto-Tellez M, Shelat SG, Benoit B, Rennert H, Carroll M, Leonard DGB, et al. Multiplex RT-PCR for the Detection of Leukemia-Associated Translocations. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2003;5(4):231-6.