



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”



División de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud
Área temática: Biomedicina Celular y Molecular

**“Desarrollo de un RT-PCR Multiplex para el Diagnóstico de
Leucemias Linfoblásticas Agudas de tipo B (LLA-B) basado en
Metodología Taguchi”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Q.F.B LLANELLY GALINDO JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

D. EN C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

Co-Directr

Agosto del 2013

*EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS A NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS DE LA DIVISIÓN DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ" DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO EN COLABORACIÓN CON LA UNIDAD ONCOLÓGICA DEL HOSPITAL INFANTIL
DE MORELIA "EVA SAMANO DE LÓPEZ MATEOS".*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer va más allá de solo pronunciar una palabra:

“Gracias”

Todos los días damos gracias a tantas personas por un sin fin de cosas y aunque es una sola palabra llega a poseer un significado diferente dependiendo del acto o de las circunstancias.

Por ello quiero dar gracias en primer lugar a “Dios” por todas las bendiciones que me ha brindado a lo largo de mi vida.

Una de las más importantes son los padres que me ha dado y por los cuales existo y soy lo que soy en todos los sentidos y aunque no lo exprese día a día todos mis esfuerzos y mis logros son dedicados a ellos; gracias por ser un gran ejemplo para mi y por brindarme todo el apoyo incondicional para cumplir mis sueños los AMO.

Mis hermanos Ale y Poncho son grandes regalos que han llenado mi vida de grandes alegrías, me han dado fortaleza, tristezas, enojos, preocupaciones pero todo es parte de la vida que hemos pasado juntos y por las cuales también los AMO.

A mis amigos y amigas que a lo largo de mi vida han estado presentes en diferentes etapas y que me han brindado una amistad sincera y cálida, gracias por formar parte de mi vida. Cada uno es tan diferente y especial, y puedo decir que me siento feliz de contar con todos ustedes.

Agradezco de manera muy especial a la persona que deposito su confianza en mi para la realización de este proyecto, la cual no solo compartió sus conocimientos sino también me brindo tiempo, apoyo, comprensión y fue sin duda un ejemplo de superación, “gracias” D.C Carlos Cortés Penagos.

También agradezco al M.C Luis José Flores Álvarez y al M.C Víctor Alfredo Pérez Contreras por todas sus enseñanzas y apoyo dentro del laboratorio, por haber confiado en mi y ser hoy en día parte de mis grandes amigos.

“Gracias” por todas las criticas constructivas, consejos y tiempo que me ha brindado mi comité tutorial:

D.C Martha Eva Viveros Sandoval

D.C Sergio Gutiérrez Castellanos

Q.F.B Carlos Alonso Muñoz

Por último “gracias” a CONACYT por la beca otorgada con el número 261908

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
I. RESUMEN	7
II. ABSTRAC	2
III. INTRODUCCIÓN	2
1.-Clasificación de neoplasias linfoides (leucemias linfoides)	3
1.1 Clasificación de leucemia linfoblástica aguda	3
1.2 Principios de la Organización Mundial de la Salud para la clasificación de las neoplasias linfoides.	4
1.3 Clasificación de la OMS-2008 para las neoplasias de precursores linfoides (leucemias linfoblásticas agudas)	6
2.- Leucemia/linfoma linfoblástica/o de tipo B con anormalidades genéticas recurrentes	7
2.1 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(9;22) (q34;q11.2) con el gen de fusión BCR-ABL1 como marcador molecular	9
2.3 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(12;21) (p13;q22) con el gen de fusión TEL-AML1 como marcador molecular	10
2.4 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(4;11)(p21;q23) con el gen de fusión MLL-AF4	11
2.5 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(1;19)(q23;p13.3) con el gen de fusión E2A-PBX1 como marcador molecular	12

3.- Metodologías moleculares _____	14
4.- Diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi _____	19
IV. ANTECEDENTES _____	26
V. JUSTIFICACIÓN _____	27
VI. HIPÓTESIS _____	28
VII. OBJETIVOS _____	28
VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____	29
IX. MATERIALES Y MÉTODOS _____	29
1. Manipulación de ácidos nucleicos _____	29
1.1 Extracción de ácidos nucleicos _____	30
1.2 Cuantificación y análisis de integridad de ácidos nucleicos _____	30
2. Transcripción Reversa (RT) _____	31
3. PCR Y PCR Multiplex acoplado a transcripción reversa para la detección de los diferentes genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B. _____	31
4. Variables analizadas en el (AO) L_{16} para la detección de los diferentes genes de fusión	32
5. Variables analizadas en el (AO) L_{12} para la detección de los diferentes genes de fusión	32
6. Análisis de resultados por metodología Taguchi _____	33
X. RESULTADOS _____	36
1. Identificación de muestras positivas para los diferentes genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B. _____	36
2. Aplicación de la metodología Taguchi para la optimización de técnicas de identificación de marcadores moleculares. _____	37
2.1 PCR multiplex acoplado a transcripción reversa para obtener la condición óptima para la detección en una sola reacción las 4 alteraciones cromosómicas con genes de fusión: t(9;22)(q34;q11) con BCR-ABL1 p190, t(12;21) con TEL-AML1, t(4;11) con MLL-AF4 y t(1;19) con E2A-PBX1 mediante el AO L_{12} . _____	41

XI. DISCUSIÓN	44
XII. CONCLUSIONES	50
XIII. REFERENCIAS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación y maduración de las células sanguíneas	4
Figura 2. Clasificación de neoplasias de precursores linfoides según la OMS (2008)	9
Figura 3a. Diagrama esquemático de la estructura exón/ intrón de los genes BCR y ABL, involucrados en la t(9;22) (q34;q11.2)	12
Figura 3b. Diagrama esquemático de los transcritos de BCR-ABL p190	12
Figura 4a. Diagrama esquemático de la estructura del exón/ intrón de los genes TEL y AML1, involucrados en la t(12;21) (p13;q22)	14
Figura 4b. Diagrama esquemático de los transcritos de fusión TEL-AML1	14
Figura 5a. Diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes MLL y AF4, los cuales están involucrados en la t(4;11) (q21;q23)	16
Figura 5b. Diagrama esquemático de los diferentes tipos de transcritos de fusión de MLL-AF4	16
Figura 6a. Diagrama esquemático de la estructura del exón/ intrón de los genes E2A-PBX1 involucrados en la t(1;19)(q23;p13.3)	17
Figura 6b. Diagrama esquemático de los transcritos de fusión E2A-PBX1	17
Figura 7. Síntesis de la primera cadena de cDNA mediante la Omniscript Transcriptasa Reversa	20
Figura 8. Programa aplicado a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23

Figura 9. Comparación de un arreglo ortogonal L_8 contra un factorial 2^7	29
Figura 10. Esquema de la técnica del método Taguchi	31
Figura 11. Análisis electroforético de muestras positivas para cada uno de los genes de fusión	44
Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación para los ensayos de detección de los genes de fusión <i>BCR-ABL1</i> , <i>TEL-AML1</i> , <i>MLL-AF4</i> y <i>E2A-PBX1</i>	47
Figura 13. Análisis electroforético comparativo de la detección de los diferentes genes de fusión	48
Figura 14. Análisis electroforético de los productos de amplificación para los ensayos de detección del gen de fusión <i>MLL-AF4</i>	51
Figura 15. Análisis electroforético de la detección de los diferentes genes de fusión <i>BCR-ABL1</i> , <i>TEL-AML1</i> , <i>MLL-AF4</i> y <i>E2A-PBX1</i> mediante un RT-PCR multiplex utilizando una misma condición óptima	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación morfológica e inmunofenotípica de Leucemias Linfocíticas Aguda	6
Tabla 2. Anormalidades genéticas en leucemia linfoblástica aguda de precursores B.	11
Tabla 3. Variables que influyen en la técnica de PCR	24
Tabla 4. Oligonucleótidos para la identificación de los genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B y oligonucleótidos para identificar el gen control (<i>JAK2</i>)	40
Tabla 5. Variables analizadas en el (AO) L_{16} para la detección de los genes de fusión	40
Tabla 6. Variables analizadas en el (AO) L_{12} para la detección de los genes de fusión	41
Tabla 7. Matriz del arreglo ortogonal L_{16}	42
Tabla 8. Matriz del arreglo ortogonal L_{12}	42
Tabla 9. Formulas utilizadas en los cálculos para el análisis de datos	43
Tabla 10. Cantidad de DNA amplificado de controles positivos para cada uno de los genes de fusión <i>BCR-ABL1</i> , <i>TEL-AML1</i> , <i>MLL-AF4</i> , <i>E2A-PBX1</i> obtenido mediante PCR multiplex	46
Tabla 11. Contribución de las variables para los genes de fusión <i>BCR-ABL</i> , <i>TEL-AML1</i> , <i>MLL-AF4</i> y <i>E2A-PBX1</i>	46
Tabla 12. Variables que contribuyeron principalmente en los AOs L_{16}	50

Tabla 13. Cantidad de DNA amplificado del control positivo ($MLL-AF4$ e10-e6)	50
Tabla 14. Contribución de las variables finales analizadas en el AO L_{12} mediante el empleo de un control positivo para ($MLL-AF4$ e10-e6)	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AO	Arreglo ortogonal
AO's	Arreglos ortogonales
CAC	Comité Asesor Clínico
COG	Children's Oncology Group
CPH	Células Progenitoras Hematopoyéticas
CTH	Células Tronco Hematopoyéticas
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfato
EPOR	Receptor de eritropoyetina
FAB	Grupo Cooperativo Francés-Americano-Británico
FISH	Hibridación fluorescente in situ
kDa	Kilodaltones
LLA	Leucemia Linfocítica o Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
M-bcr	Major break cluster región
m-bcr	Minor break cluster región
MO	Médula ósea
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ph	Cromosoma filadelfia
REAL	Clasificación Revisada Europea-Americana de neoplasias linfoides
RT	Transcripción Reversa
Tm	Temperatura de alineamiento
U	Unidades
ΔG	Energía libre de Gibbs

I.RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda de tipo B es una neoplasia caracterizada por alteraciones cromosómicas recurrentes que incluyen aneuploidías y translocaciones, las cuales son utilizadas como marcadores moleculares para su clasificación (Organización Mundial de la Salud). Las translocaciones relacionadas a esta neoplasia incluyen a la t(1;19) *E2A-PBX1*, t(4;11) *MLL-AF4*, t(9;22) *BCR-ABL1* y t(12;21) *TEL-AML1*, cada una de las cuales tiene un valor en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. La identificación de los transcritos de fusión generados por dichas translocaciones se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a una transcripción reversa (RT). Las variables que afectan una reacción de PCR son diversas, por lo que la estandarización de una prueba diagnóstica requiere el empleo de metodologías aplicadas al diseño de experimentos. La metodología Taguchi es una alternativa que se basa en el empleo de arreglos ortogonales los cuales permiten valorar la influencia de cada una de las variables con la finalidad de obtener las condiciones óptimas del ensayo.

La estandarización de un RT-PCR multiplex para la identificación de 4 marcadores, se realizó utilizando 5 arreglos ortogonales considerando las variables y los niveles de las mismas que influyen principalmente en la PCR (Taq polimerasa, temperatura y tiempo de alineamiento, ciclos de amplificación, cantidad de cDNA y concentraciones de los oligos). A través de 86 ensayos independientes se logró obtener exitosamente las condiciones óptimas para identificar a los genes de fusión de manera independiente y simultáneamente en un ensayo único. Los resultados demuestran que la utilización de arreglos ortogonales es una herramienta útil para la optimización de técnicas moleculares. La metodología Taguchi permitió estandarizar mediante un método rápido y robusto la detección de los transcritos fusión *E2A PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1* y *TEL-AML1* con características favorables para ser utilizado en el diagnóstico clínico.

II. ABSTRAC

B acute lymphoblastic leukemia is a neoplasm characterized by recurrent chromosomal abnormalities including aneuploidy and translocations, which are used as molecular markers for classification (World Health Organization). Translocations related to this neoplasm include the t (1, 19) E2A-PBX1, t (4, 11) MLL-AF4, t (9; 22) BCR-ABL 1 and t (12; 21) TEL-AML 1, each of which has a value in the diagnosis, prognosis and treatment of disease. Identifying fusion transcripts generated by these translocations is performed by chain reaction (PCR) coupled with a reverse transcription (RT). Variables affecting a PCR reaction are different, so that the standardization of diagnostic testing requires the use of methods applied to experimental design. Taguchi's methodology is an alternative that is based on the use of orthogonal arrangements which allow to evaluate the influence of each of the variables in order to obtain optimum conditions of the test.

Standardizing a multiplex RT-PCR for the identification of four markers, was performed using five orthogonal arrangement considering the variables and levels thereof which primarily influence the PCR (Taq polymerase, temperature and time alignment, number of cycles, amount of cDNA and concentrations of primers). Through 86 independent tests was successfully managed to obtain optimal conditions to identify fusion genes independently and simultaneously in a single assay. The results demonstrate that using orthogonal arrays is a useful tool for the optimization of molecular techniques. The Taguchi methodology allowed to standardize through a fast and robust method the detection of fusion transcripts E2A PBX1, MLL-AF4, BCR-ABL1 and TEL-AML1 with favorable characteristics for use in clinical diagnosis.

III. INTRODUCCIÓN

La producción de células sanguíneas –hematopoyesis- es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea (MO), tejido esponjoso donde el desarrollo de las células sanguíneas toma lugar. Esta ocupa la cavidad central de los huesos. En recién nacidos, todos los huesos tienen médula activa. Cuando una persona llega a la edad adulta, los huesos de las manos, pies, brazos y piernas ya no tienen médula ósea. La columna vertebral (vértebras), los huesos de la cadera y el hombro, las costillas, el esternón y el cráneo contienen la médula ósea que produce las células sanguíneas en los adultos.¹

El proceso hematopoyético inicia con la activación de un programa de diferenciación de las llamadas células tronco hematopoyéticas (CTH). Estas células tienen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse y son multipotenciales es decir pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos. Las CTH dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales, o bien pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). Las CPH dan lugar a las células precursoras reconocibles por su morfología a pesar de ser inmaduras. Y finalmente los precursores hematopoyéticos al madurar, generan las células sanguíneas circulantes (Figura 1).

Es evidente que la hematopoyesis es un proceso muy complejo, en el que participan diversos tipos celulares y sus productos; todos éstos interactúan estrechamente para permitir que la producción de células sanguíneas ocurra de manera controlada. Alteraciones en la hematopoyesis, puede conducir a situaciones de sobreproducción de células hematopoyéticas o a una producción deficiente de las mismas, cualquiera de estas condiciones puede conducir a estados fisiológicos muy delicados, e incluso, a la muerte del individuo. Las leucemias son un ejemplo de enfermedades asociadas a un aumento en la producción de las células hematopoyéticas debido a que se originan a partir de alteraciones

presentes en las CTH y CPH. ² Los cuatro tipos de leucemia son la leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y leucemia linfocítica crónica. La leucemia aguda es una enfermedad de progresión rápida que produce células que no están completamente desarrolladas es decir son inmaduras y por ende no pueden llevar a cabo sus funciones normales. La leucemia crónica es usualmente de progresión lenta y los pacientes tienen un gran número de células maduras. En general, estas células maduras pueden llevar a cabo solo algunas de sus funciones normales. Los cuatro tipos principales de leucemia están clasificados en subtipos de acuerdo a características específicas de las células afectadas. De hecho conocer el subtipo de la enfermedad es muy importante para establecer el tratamiento más adecuado para el paciente.

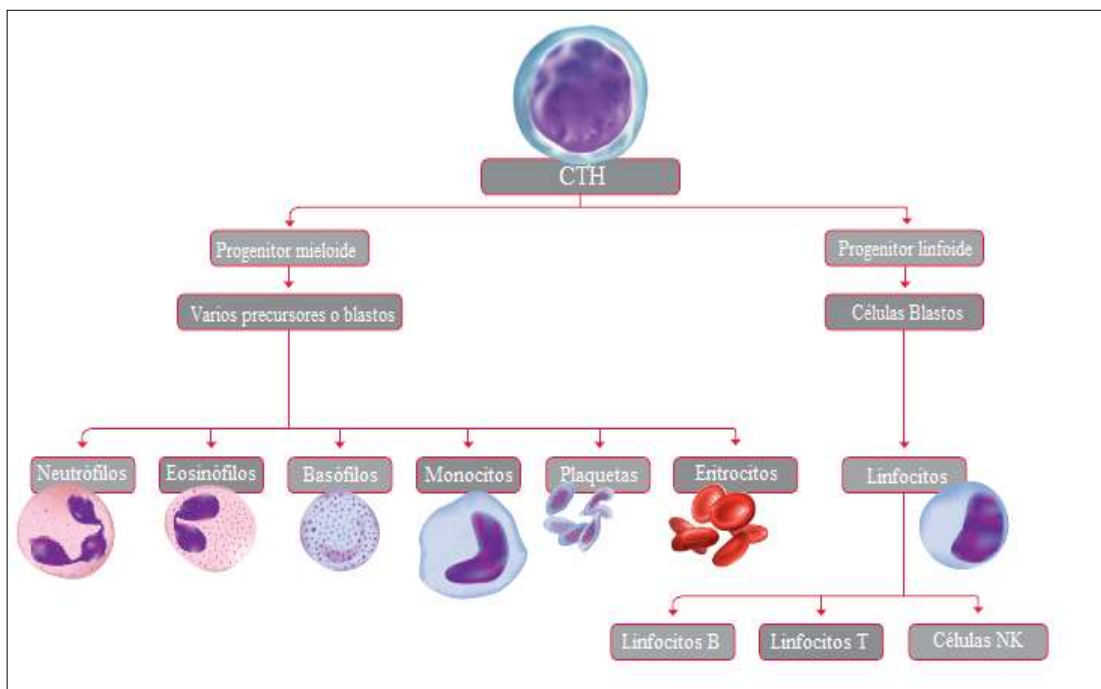


Figura 1. Diferenciación y maduración de las células sanguíneas. CTH: Células tronco hematopoyéticas

1.-Clasificación de neoplasias linfoides (leucemias linfoides)

Las neoplasias/leucemias linfoides o linfocíticas, son neoplasias de las células hematológicas de la estirpe linfoide que esta conformada por células B, T y natural killer (NK), en las cuales los procesos de diferenciación, proliferación o apoptosis están alterados. Estas leucemias linfoides pueden ser agudas o crónicas dependiendo de la progresión de la enfermedad, si es de progresión lenta y se tienen principalmente células maduras hablaríamos de leucemia linfocítica crónica (LLC), mientras que si la progresión de la enfermedad es rápida y se observan primordialmente células inmaduras como los blastos, hablaríamos de leucemia linfocítica o linfoblástica aguda (LLA).³

1.1 Clasificación de leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una proliferación maligna de células linfoides bloqueadas en una etapa temprana de diferenciación (precursores/linfoblastos). LLA es una enfermedad biológicamente y clínicamente heterogénea, por lo que caracterizaciones morfológicas, inmunológicas, citogenéticas, bioquímicas y genético- moleculares de los linfoblastos leucémicos son necesarios para establecer el diagnóstico o para excluir otras posibles causas del fallo de la médula ósea y finalmente para clasificar los subtipos de LLA.⁴ El esquema de clasificación original propuesto por el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico (FAB) desde los años 70's divide a la LLA en 3 subtipos (L1-L3), que se diferencian en base a la tinción citoquímica y a la morfología, incluyendo el tamaño celular, la prominencia de nucléolos, la cantidad y aspecto del citoplasma (Tabla 1). Después con la identificación de la expresión de los antígenos de superficie de membrana o de los componentes citoplasmáticos mediante anticuerpos monoclonales y el desarrollo de la citometría de flujo, fue posible clasificar a las leucemias linfoblásticas agudas según su origen celular (B ó T) y su grado de diferenciación o maduración, y es lo que se conoce como clasificación inmunofenotípica (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación morfológica e inmunofenotípica de Leucemias Linfocíticas Agudas

Clasificación Morfológica		Clasificación Inmunofenotípica*
Tipo FAB	Características sobresalientes de blastos	Linaje celular B
L1	Células pequeñas con escaso citoplasma, nucléolos indistintos y no visibles.	-LLA de precursores tempranos de células B
L2	Células heterogéneas y grandes con citoplasma moderadamente abundante, núcleo irregular con hendiduras, nucléolo grande y prominente.	-LLA común -LLA de precursores de células B -LLA de células B
L3	Células grandes con citoplasma moderadamente abundante, núcleo regular de oval a redondo, nucléolo prominente, basofilia citoplasmática destacada y vacuolas citoplasmáticas.	Linaje celular T -LLA de precursores de células T LLA de células T

LLA: Leucemia linfocítica aguda; FAB: Grupo cooperativo Francés-Americano-Británico

* Basada en marcadores de superficie ⁵

Sin embargo actualmente es utilizada la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de neoplasias de tejidos hematopoyéticos y linfoides publicada en el 2001 y actualizada en el 2008. Donde la leucemia linfoblástica aguda cae en una categoría general llamada neoplasia de precursores linfoides. ^{5,6,7,8,9}

1.2 Principios de la Organización Mundial de la Salud para la clasificación de las neoplasias linfoides.

Los principios de la clasificación del 2001 de la OMS estuvieron basados en la Clasificación Revisada Europea-Americana de neoplasias linfoides (REAL), publicada por el Grupo de Estudio Internacional del Linfoma en 1994. El proceso de elaboración de la clasificación de la OMS 2008 involucró grupos de trabajo de patólogos, así como a un comité asesor clínico (CAC) de médicos expertos de todo el mundo, entonces es un consenso mundial sobre el diagnóstico de estos padecimientos, y ha sido aprobada para su uso por patólogos, médicos y científicos.¹⁰ La clasificación de neoplasias linfoides se basa en un principio muy importante que consiste en la utilización de toda la información disponible para definir o reconocer la entidad de la enfermedad, tales como la morfología,

inmunofenotipo, genética, características moleculares y clínicas. Hoy en día las características genéticas están jugando un papel muy importante en la clasificación de enfermedades linfoides, ya que para muchos de los linfomas de células B pequeñas y otras leucemias han sido identificadas alteraciones genéticas recurrentes. Por lo tanto la importancia relativa de cada una de estas características es diferente entre enfermedades, dependiendo del estado de los conocimientos actuales y por ende no existe ningún “estándar de oro” por el que se definan todas las enfermedades. En esta clasificación las entidades de la enfermedad se estratifican de acuerdo a su linaje celular y a su grado de diferenciación ya sea de células linfoides precursoras o maduras. Una característica de suma importancia dentro de la morfología es conocer el porcentaje de blastos en médula ósea, sangre periférica y otros tejidos involucrados ya que permitirá categorizar a las neoplasias hematológicas y evaluar su progresión. Los estudios citogenéticos y de biología molecular son hoy en día una parte esencial para el diagnóstico, no solo para identificar anomalías genéticas específicas, sino para establecer una base de datos contra la cual estudios de progresión posteriores puedan ser comparados. Entonces vemos que para realizar el diagnóstico de neoplasia linfóide, se requiere de un enfoque multidisciplinario, donde varios estudios diagnósticos en correlación con la clínica se asocien en reporte único e integral.^{11,12}

La clasificación de la OMS, incluye muchas entidades neoplásicas definidas por anomalías genéticas específicas, incluyendo rearrreglos cromosómicos debido a translocaciones, deleciones, inserciones y mutaciones específicas, por tanto es esencial determinar las características genéticas de las células neoplásicas. Es recomendable que la evaluación inicial incluya un análisis citogenético completo de médula ósea con el fin de confirmar el diagnóstico presuntivo basado en estudios clínicos, morfológicos, de inmunofenotipo y técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcripción reversa (RT-PCR) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que se utilizan para detectar rearrreglos de genes como las translocaciones que estén presentes pero que muchas veces no logran ser identificadas por el análisis citogenético. De hecho un gran número de mutaciones han sido detectadas por secuenciación y otras técnicas moleculares han surgido y están siendo empleadas para detectar marcadores moleculares importantes que vemos que son utilizados actualmente por la OMS para

clasificar a las neoplasias hematológicas, así como para el diagnóstico, pronóstico y plus es que han permitido individualizar tratamientos y que se ven reflejados en el aumento de sobrevida, como en el caso de la leucemia linfoblástica aguda de tipo B con anormalidades genéticas. Por todo lo anterior vemos que es de suma importancia clasificar de manera correcta cualquier enfermedad para así contribuir de manera exitosa en el proceso de recuperación de los pacientes.¹²

1.3 Clasificación de la OMS-2008 para las neoplasias de precursores linfoides (leucemias linfoblásticas agudas).

Dentro de la clasificación de la OMS las leucemias linfoblásticas agudas caen dentro de la categoría llamada neoplasias de precursores linfoides donde se encuentran clasificadas de acuerdo al tipo celular afectado en dos grandes grupos (1 y 2) (Figura 2)¹² :

- 1) Leucemia /Linfoma Linfoblástica/o de tipo B
- 2) Leucemia/ Linfoma Linfoblástica/o de tipo T.

La Leucemia /Linfoma Linfoblástico de tipo B a su vez se divide en 2 categorías:

- a) Leucemia/ Linfoma Linfoblástica/o de tipo B de otro modo no especificado
- b)Leucemia/Linfoma Linfoblástica/o de tipo B con anormalidades genéticas recurrentes.

La incidencia mundial leucemias en niños es de 15-50 casos por cada 100,000 personas por año. Según reportes de la OMS, las neoplasias de precursores linfoides que incluyen a la leucemia/linfoma linfoblástica/o de tipo B y T son consideradas ante todo enfermedades de los niños. Y aproximadamente un 85% de los casos que se presentan como LLA son del tipo celular de precursores B (LLA-B).^{13,14,15,16,17} Aproximadamente el 75% de los casos de LLA-B exhiben aneuploidía o rearrreglos cromosómicos gruesos o sub-microscópicos recurrentes, los cuales permiten que puedan ser sub-clasificadas, tal y como se muestra en la clasificación propuesta por la OMS-2008.^{18,19,20,21} Donde la leucemia/ linfoma

Linfoblástica/o de tipo B con anomalías genéticas recurrentes se divide en 7 subtipos (Figura 2) que incluye translocaciones balanceadas y otras anomalías que tienen que ver con el número de cromosomas, entonces para cada subtipo se tiene un marcador molecular específico, y si se realiza la identificación correcta permitirán el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento adecuado para pacientes con LLA-B.¹²

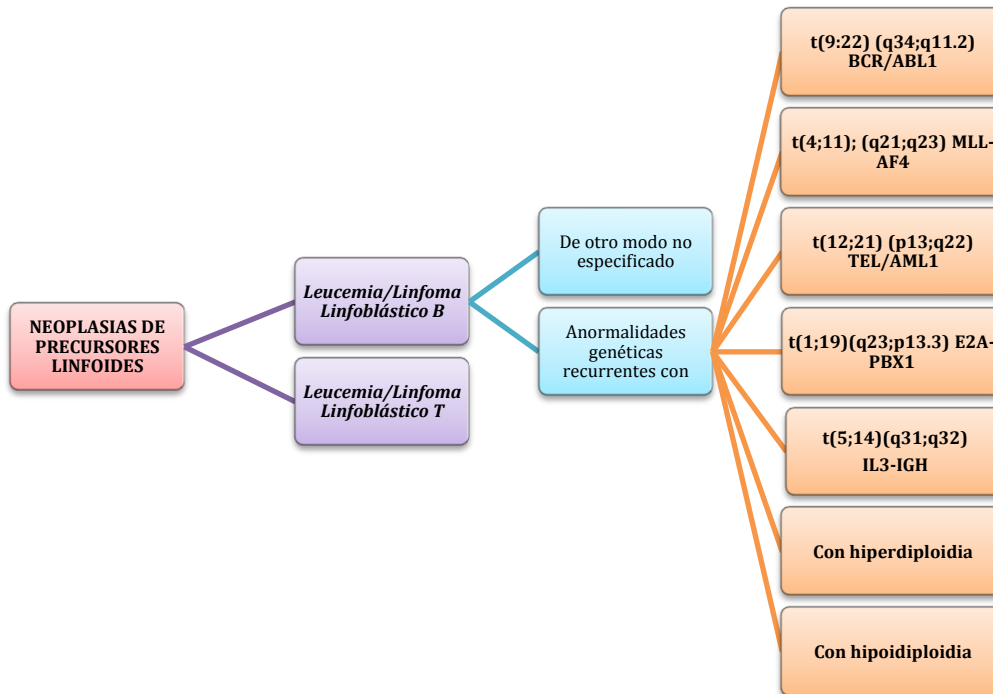


Figura 2. Clasificación de neoplasias de precursores linfoides según la OMS (2008).¹²

2.- Leucemia/linfoma linfoblástica/o de tipo B con anomalías genéticas recurrentes.

Es la neoplasia infantil más común y la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en niños y adultos jóvenes.¹³ Este grupo de enfermedades esta caracterizado por alteraciones citogenéticas recurrentes que incluyen aneuploidías y translocaciones cromosómicas. Hiperdiploidía, con el aumento de al menos 5 cromosomas, es una de las alteraciones más frecuentes en la infancia en la LLA infantil y se asocia con resultados favorables. Por el contrario, la hipodiploidía, con menos de 44 cromosomas, se asocia con pésimo pronóstico. Los reordenamientos cromosómicos recurrentes (translocaciones) son comunes en LLA-B y son eventos críticos en el proceso de leucemogénesis. Estos incluyen la t(1;19) con el gen de fusión E2A-PBX1, t(4;11) con el gen de fusión MLL-AF4, t(9;22) con el gen de fusión BCR-ABL1, t(12;21) con el gen de fusión TEL-AML1 y t(5;14)(q31;q32) con el gen de fusión IL3-IGH (Figura 2). Estos rearrreglos comúnmente perturban genes que codifican reguladores de la hematopoyesis, supresores tumorales, oncogenes, o tirosina-quinasas, pero comúnmente requieren cambios genéticos adicionales para establecer el fenotipo leucémico completo.^{18,19,20}

La identificación de estos rearrreglos es vital en los esquemas de clasificación de riesgo que actualmente existen, donde se incluye la presencia o ausencia de estas anomalías citogenéticas junto con las características clínicas (cuenta de leucocitos, edad, presencia de enfermedad extramedular) y la medición de la enfermedad mínima residual al final de la terapia de inducción para clasificar a los niños con LLA-B dentro de categorías de bajo, estándar/intermedio, alto o muy alto riesgo.^{22,19}

En la Tabla 2 se muestra como de acuerdo a la translocación presente y las otras características mencionadas se clasifica al paciente en un grupo de riesgo. Esta clasificación fue propuesta por Children's Oncology Group (COG) con la finalidad de individualizar el tratamiento. Es decir en estos niños, se utiliza como base el grado de riesgo para asignar el tratamiento para que los pacientes con características clínicas y biológicas favorables con probabilidades de tener un desenlace muy bueno con un tratamiento modesto, se puedan librar de un tratamiento más intensivo y tóxico; al mismo tiempo, se puede proporcionar un tratamiento más radical y potencialmente más tóxico a los pacientes que tienen probabilidades más bajas de supervivencia a largo plazo.²³

Estos genes de fusión se transcriben a un mRNA de fusión, después se realiza una transcripción reversa (RT) a través de la cual se obtiene el cDNA, que puede servir como objetivo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar cada uno de los genes de fusión.²⁴

De los marcadores mencionados asociados a LLA-B se han seleccionado cuatro de ellos, t(1;19) con el gen de fusión E2A-PBX1, t(4;11) con el gen de fusión MLL-AF4, t(9;22) con el gen de fusión BCR-ABL1 y t(12;21) con el gen de fusión TEL-AML1 que se consideran importantes porque poseen una frecuencia relativamente alta en pacientes pediátricos con LLA-B.

Tabla 2. Anormalidades genéticas en leucemia linfoblástica aguda de precursores B.^{12, 21}

NEOPLASIAS DE PRECURSORES LINFOIDES B CON ANORMALIDADES GENÉTICAS RECURRENTE			
<i>Translocación</i>	<i>Marcador molecular</i>	<i>Frecuencia en niños</i>	<i>Riesgo</i>
t(9;22) (q34;q11.2)	BCR/ABL1	5%	Alto riesgo
t(4;11)(p21;q23)	MLL-AF4	5%	Muy alto riesgo
t(12;21) (p13;q22)	TEL/AML1 / ETV6-RUNX1	25%	Bajo riesgo
t(1;19)(q23;p13.3)	E2A-PBX1/ TCF3-PBX1	5-6 %	Riesgo habitual

2.1 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(9;22) (q34;q11.2) con el gen de fusión BCR-ABL1 como marcador molecular.

En la mayoría de las leucemias, las translocaciones generan un gen de fusión que produce un mRNA que codifica una proteína quimérica con propiedades estructurales y funcionales distintas de las proteínas constitucionales normales. Se han identificado muchos genes de fusión. El mejor caso conocido es el gen quimérico BCR-ABL1, que es el resultado de la translocación t(9;22) (q34;q11.2) que da lugar al cromosoma Philadelphia (Ph). Los genes

involucrados en esta translocación son el gen ABL presente el cromosoma 9 y el gen BCR en el cromosoma 22. La t(9;22) fusiona las secuencias 5' de la región llamada break cluster región (BCR) a las secuencias 3' de ABL, la cual codifica a una tirosina-cinasa. Los puntos de ruptura del cromosoma 9 están dispersos en una región de casi 200 kb dentro del primer intrón, entre el exón 1b y el exón 2(también llamado a2) de ABL (Figura 3a), mientras que los puntos de ruptura de BCR se encuentran en dos áreas: 1) a 5.8 kb en la denominada M-bcr (major break cluster región) que ocurre en los pacientes con leucemia mieloide crónica y la otra en área denominada m-bcr (minor break cluster región) que ocurre en la mayoría de los casos de LLA con Ph positivo (Figura 3a). La fusión de genes creados por las rupturas en M-bcr (ruptura tipo de LMC) codifica a una proteína de fusión de 210 kDa (p210), mientras que las fusiones que ocurren en m-bcr (ruptura tipo de LLA) codifica p190 (Figura 3b).

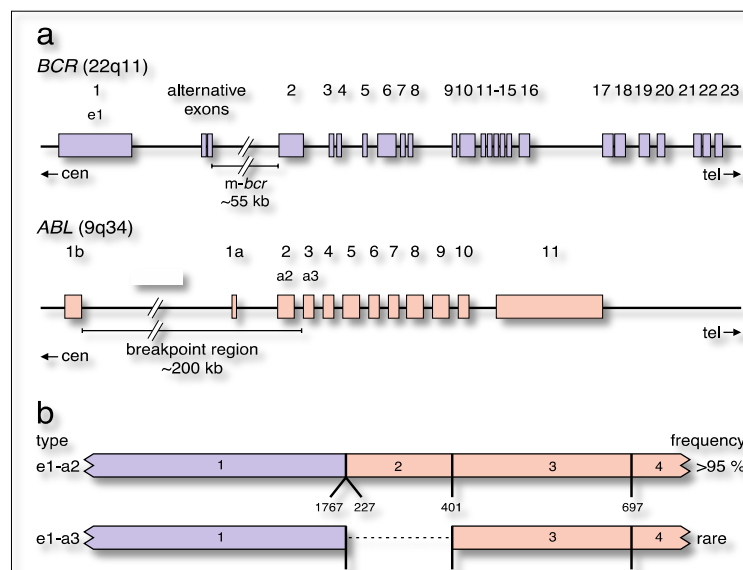


Figura 3. a) Diagrama esquemático de la estructura exón/ intrón de los genes BCR y ABL, involucrados en la t(9;22) (q34;q11.2) con enfoque en el punto de ruptura minor breakpoint cluster región (m-bcr). b) Diagrama esquemático de los transcritos de BCR-ABL p190.²⁴

BCR-ABL1 activa múltiples vías de señalización, incrementa la proliferación celular y desregula la diferenciación y adhesión. El tratamiento de las células leucémicas con BCR-

ABL1-positivo son inhibidores de tirosina-cinasas.

Alteraciones genéticas adicionales son determinantes críticos de el linaje t la progresión de leucemia BCR-ABL1. La delección temprana de el gen que codifica para el factor de transcripción IKZF1 (IKAROS) es común en leucemia linfoide BCR-ABL1 pero es raro en LMC. IKAROS es un factor de transcripción de dedo de zinc requerido para el desarrollo de todas las líneas linfoides. Esta alteración coopera con BCR-ABL1 en la inducción de leucemia linfoblástica. Históricamente, la LLA con BCR-ABL1 se ha asociado con muy mal pronóstico. Inhibidores de la tirosina-cinasa tales como el mesilato de imatinib (Gleevec) han transformado el tratamiento y el pronóstico de los pacientes con leucemia BCR-ABL1-positivo. La adición de imatinib con quimioterapia intensiva en niños con LLA BCR-ABL1-positivos resulta en una tasa de supervivencia del 84% con 4 años libres del evento. Una proporción de los pacientes se vuelven resistentes a estos agentes, típicamente a través de mutaciones adquiridas en el dominio quinasa de ABL1. ^{24,18,25}

2.3 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(12;21) (p13;q22) con el gen de fusión TEL-AML1 como marcador molecular.

El rearreglo más común en LLA-B es la t(12;21) (p13;q22) rearreglo que da lugar al gen de fusión TEL-AML1. Este ocurre en aproximadamente el 25% de los niños con LLA. Esta translocación no es detectable por citogenética convencional pero es rápidamente detectado por técnicas moleculares como RT-PCR y FISH. La mayoría de los pacientes positivos oscilan entre 1-12 años de edad en el diagnóstico, con un pico entre los 2-5 años. Los pacientes con este gen de fusión tienen un pronóstico muy favorable.

La t(12;21) involucra el gen TEL/ETV6 localizado en el cromosoma 12 y el gen AML1/RUNX1 localizado en el cromosoma 21. El gen TEL es muy grande y consiste de 8 exones, pero los puntos de ruptura se encuentran en una región de 15 kb entre los exones 5-6 (Figura 4a). Los puntos de ruptura del gen AML1 pueden ocurrir tanto en el intrón 1 que es muy grande (más frecuentemente) o en el intrón 2. En la mayoría de los casos, los transcritos de fusión TEL-AML1 muestran una unión del exón 5 (nucleótido 1033) de TEL a el segundo exón (nucleótido 503) de AML1 (Figura 4b).

TEL es un miembro de la familia ETS de factores de transcripción que son blancos frecuentemente de los reordenamientos y mutaciones en la leucemia o en otras malignidades. Tanto TEL como AML1 son requeridos para la hematopoyesis normal y la proteína TEL-AML1 puede perturbar la expresión de los genes regulados por AML1, que lo convierten en un represor transcripcional, también causa sobreexpresión del receptor de la eritropoyetina (EPOR) y la activación de la señalización río debajo de JAK/STAT. La expresión de ETV6-RUNX1 promueve la autorenovación de las células B progenitoras pero solo no induce leucemia.^{24,18,25,26,27}

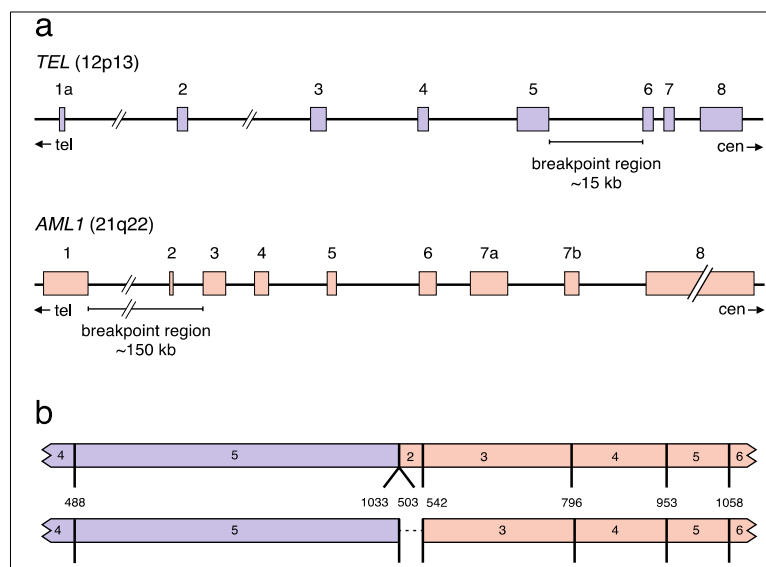


Figura 4. a) Diagrama esquemático de la estructura del exón/ intrón de los genes TEL y AML1, involucrados en la t(12;21) (p13;q22). b) Diagrama esquemático de los transcritos de fusión TEL-AML1.²⁴

2.4 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con t(4;11)(p21;q23) con el gen de fusión MLL-AF4

Mixed-lineage leukemia–rearranged (*MLL-rearranged*) leukemia es una entidad única por su iniciación en el útero y por su respuesta pobre al tratamiento. El gen MLL localizado en el cromosoma 11 en la región q23 forma un transcrito de fusión con el gen AF4 localizado

en el cromosoma 4 en la región q21, mediante la translocación t(4;11)(p21;q23) que por citogenética convencional no es detectada. La leucemias positivas con *MLL-AF4* ocurren en un 50-70% de los infantes con LLA y en de aproximadamente en un 5% de los casos pediátricos.

El gen *MLL* esta compuesto de 37 exones y regula la hematopoyesis a través del mantenimiento de la expresión de genes homeóticos. La proteína *MLL* contiene una región de 3 hooks AT (AT-HOOKS), los cuales tienen la capacidad de unirse al surco menor del DNA. Un dominio con capacidad de unión al DNA hemimetilado esta localizado en la porción 5' de la proteína codificada por el exón 8. Un dominio de dedo de zinc es codificado por los exones 11-16 y un dominio homologo al la *Drosophila trithorax* esta localizado en la parte 3' del gen. Cerca de 80 parejas del reordenamiento *MLL* han sido identificadas. El gen *AF4* esta compuesto de 20 exones y codifican una proteína rica en serina- prolina.

La principal región de ruptura del gen *MLL* a sido bien caracterizada y esta localizada en un fragmento denominado BamHI de 8.3 kb.

Los grupos de los puntos de ruptura en la región de 6.5 kb entre los exones 8-12 (Figura 5a); la ruptura ocurre mas frecuentemente en los intrones 9 y 10 en pacientes pediátricos y adultos con LLA, y en el intrón 11 en infantes con LLA, conllevan a la fusión de genes que involucran los exones 9 y 10 en pacientes pediátricos y adultos, y en el exón 11 en infantes (Figura 5b). La región del punto de ruptura del gen *AF4* es mas grande, abarca una región de 40 kb (Figura 5a). El punto de fusión mas frecuente en los genes de fusión *MLL-AF4* es el exón 4; en raros casos los exones 5,6,7 están fusionados al gen *MLL* (Figura 5b).^{24,18,25,28}

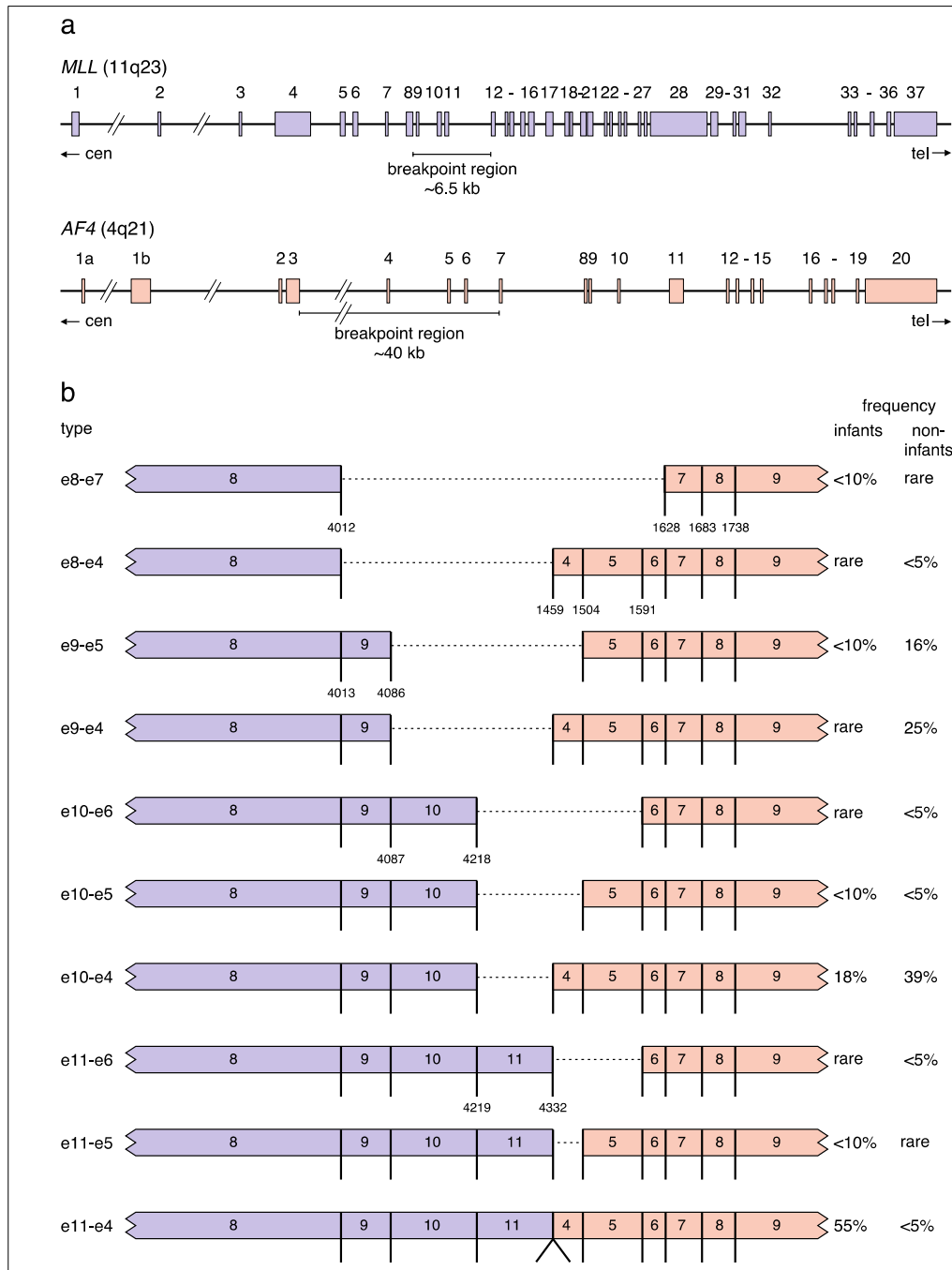


Figura 5. a) Diagrama esquemático de la estructura exón/intrón de los genes *MLL* y *AF4*, los cuales están involucrados en la *t(4;11) (q21;q23)*. b) Diagrama esquemático de los diferentes tipos de transcritos de fusión de *MLL-AF4*.²⁴

2.5 - Leucemia/ linfoma linfoblástica/o B con $t(1;19)(q23;p13.3)$ con el gen de fusión E2A-PBX1 como marcador molecular.

La $t(1;19)(q23;p13.3)$ involucra al gen E2A que se encuentra en el cromosoma 19 (banda p13.2-p13.3) y el gen PBX1 ubicado en el cromosoma 1 (q23). Es detectada en aproximadamente del 5-6 % de los niños con LLA. Y la organización genómica de E2A esta bien definida y los puntos de ruptura ocurren casi exclusivamente en una región intrón de 3.5 kb entre el exón 13 y 14. La organización genómica del gen PBX1 aún no esta completamente conocida y los puntos de ruptura están dispersos en una región intrón de aproximadamente 50 kb entre el exón 1 y 2. En la mayoría de los casos el transcrito de fusión E2A-PBX1 muestra un constante sitio de unión del exón 13 (nucleótido 1518) de E2A a el segundo exón (nucleótido 388) de PBX1 (Figura 6a). Una variante del transcrito de fusión esta descrita cerca del 5-10% de los casos positivos de LLA con $t(1;19)$, la cual esta caracterizada por una adición de 27 nucleótidos (Figura 6b).

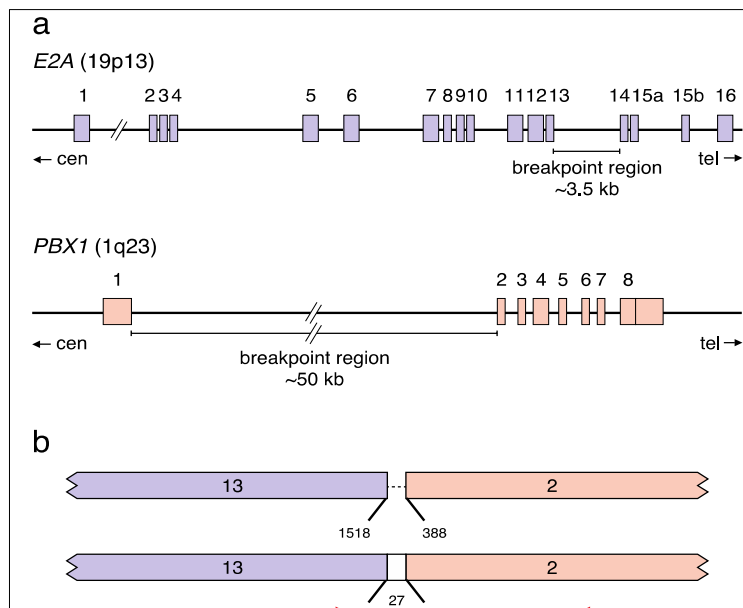


Figura 6. a) Diagrama esquemático de la estructura del exón/ intrón de los genes E2A-PBX1 involucrados en la $t(1;19)(q23;p13.3)$ b) Diagrama esquemático de los transcritos de fusión E2A-PBX1. ²⁴

El gen E2A codifica los factores de transcripción E12 y E47 que pertenecen a la familia basic hélix-loop-helix (bHLH) y son requeridos para el desarrollo temprano linfoide y la perdida de E12-E47 promueve el desarrollo de el linfoma de células T. El gen PBX1 es requerido para el desarrollo de precursores linfoides. E2A-PBX1 se une a proteínas HOX y probablemente interfiere con la diferenciación hematopoyética por la disrupción de la expresión de genes regulados por HOX. ^{24,18,25,29,30}

3.- Metodologías moleculares

La citogenética es empleada en la detección de diversos marcadores moleculares como las anomalías numéricas, estructurales, translocaciones e inversiones en los cromosomas, por ejemplo es usada para la identificación del cromosoma filadelfia. Muchas neoplasias hematopoyéticas (leucemias y linfomas) se asocian a translocaciones específicas que activan a los oncogenes. La detección de estas translocaciones, generalmente mediante el análisis citogenético o con la técnica de FISH, suelen ayudar mucho al diagnóstico pero en algunos casos, las técnicas moleculares revelan translocaciones u otros reordenamientos que no llegan a ser detectables por citogenética por lo que se recurre al uso de metodologías moleculares más específicas como el PCR, reconocimiento específico de secuencias de DNA por enzimas de restricción, en hibridaciones de regiones de DNA y su detección por marcaje radioactivo o sondas fluorescentes. Por ejemplo los marcadores moleculares de leucemia linfoblástica aguda de tipo B como la t(12;21) con el gen de fusión TEL-AML1 o la translocación t(4;11) con el gen de fusión MLL-AF4 son identificados con la técnica RT-PCR, incluso en casos en los que los resultados de la citogenética resultaron negativos. Por lo que el uso de esta metodología permite hacer el diagnóstico y la clasificación de la leucemia para que el paciente reciba un tratamiento individualizado, ya que existen protocolos establecidos de tratamiento en los cuales la presencia de estos genes de fusión son un factor de riesgo y dependiendo de cual este presente, el paciente lo recibirá con la finalidad de que se cure y los efectos secundarios a causa de la quimioterapia sean menos agresivos.

Transcripción Reversa (RT)

La capacidad para estudiar comparativamente la expresión de poblaciones de RNA mensajero (mRNA) de diferentes muestras ha sido posible gracias a la aplicación de la transcripción reversa (RT) que junto con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten aislar secuencias de genes, las cuales pueden ser visualizadas en geles de agarosa o poliacrilamida. La utilización de una varias combinaciones de oligonucleótidos facilita el aislamiento de miles de especies de mRNA; por lo que la combinación de ambas técnicas

ha sido aplicada exitosamente en varias situaciones, como por ejemplo; para diagnosticar diversos procesos de enfermedad, modelos de diferenciación y desarrollo. La transcripción reversa también llamada transcripción inversa tiene como finalidad obtener DNA complementario (cDNA) a partir del RNA utilizando una enzima llamada Transcriptasa Reversa que tiene 3 distintas actividades enzimáticas: una de DNA polimerasa dependiente de RNA, una de exoribonucleasa híbrido-dependiente (RNasa H) y una de DNA polimerasa dependiente de DNA. En vivo la combinación de estas 3 actividades permite la transcripción de un genoma de RNA de cadena simple en un DNA de doble cadena por infección retroviral. Pero para la transcripción in vitro solo las 2 primeras actividades son utilizadas para producir cDNA de cadena sencilla (Figura 7). Además de la enzima se emplean oligo-dT primers, random primers o random nonámeros que se alinean al RNA molde para iniciar la síntesis mediante la incorporación de los nucleótidos complementarios para obtener finalmente el cDNA que podrá ser usado para amplificación por PCR. ^{31,32,33}

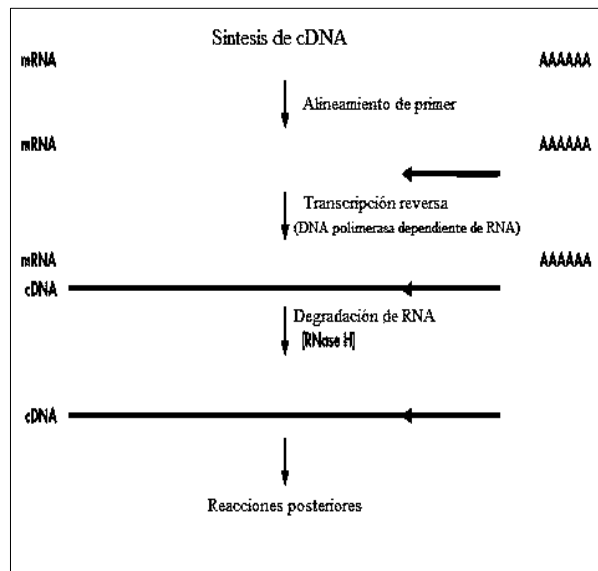


Figura 7. Síntesis de la primera cadena de cDNA mediante la Omniscript Transcriptasa Reversa. ³¹

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction) es considerada hoy en día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de Biología Molecular e Ingeniería Genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o de un fragmento de DNA, o indirecta de un RNA (en este caso, a través del cDNA), presentes en mezclas de diversas fuentes como extractos crudos de tejidos, sangre completa, mezclas de fragmentos de DNA obtenidos con enzimas de restricción y muestras resultantes de la extracción o aislamiento de DNA o RNA, etc. Sin embargo, es importante resaltar que es necesario conocer la secuencia de una parte de la región de DNA o RNA que se desea amplificar para sintetizar los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, oligos, etc.) que serán las secuencias que flanquearan la región de interés a amplificar, por lo que se consideran parte determinante del éxito de la PCR. Estos oligonucleótidos deben ser específicos para una única región del genoma, por lo que se deben tomar en cuenta varios criterios para el diseño de estos, tales como; el tamaño se dice que el ideal es de 20-25 nucleótidos de longitud y generalmente son 18-30 nucleótidos de longitud, la temperatura de alineamiento, contenido de GC, repetidos de G o C, la base del extremo 3' debe ser una G o C y la auto-complementariedad debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y dímeros de primer. La DNA polimerasa es la enzima que lleva a cabo la replicación del fragmento diana a partir del oligonucleótido y tiene la característica de ser termoestable ya que es enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (75-95 °C), esto permite su actuación en sucesivos ciclos sin inactivarse; además la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento de la reacción. Además de que se tomaran en cuenta ciertas condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente como el pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de $MgCl_2$, KCl, y quizá puedan necesitarse otras sales o reactivos dependiendo de cada polimerasa. Finalmente otros componentes importantes en la reacción de PCR son los dinucleótidos (dNTPs) que deberán usarse en concentraciones equivalentes para minimizar errores de incorporación de bases.³⁴⁻³⁶

El proceso de la PCR consiste en 3 etapas bien definidas: La primera etapa es conocida como desnaturalización, donde se realiza un calentamiento breve que va de 90-95°C para que ocurra la separación de las 2 hebras del DNA. La segunda etapa se conoce como hibridación o de alineamiento, en la cual ocurre la unión de los cebadores con el DNA molde por efecto de un enfriamiento rápido utilizando temperaturas que oscilan de los 37-65°C. Finalmente esta la etapa conocida como elongación, extensión o replicación, en la cual la DNA polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5'→3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, esta se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 72°C hasta terminar la lectura de la hebra molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización. Este ciclo de 3 pasos se repite de entre 25 y 40 veces usando termocicladores programados con el propósito de que haya una acumulación de la secuencia blanco, llegándose a sintetizar millones de copias. Además de las tres etapas de cada ciclo, comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, a temperatura elevada sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del DNA de partida, especialmente si este es de gran tamaño o posee regiones muy compactadas. La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos (Figura 8). Existen variantes de la PCR por ejemplo la RT-PCR tiene características muy importantes, ya que detecta transcritos y es un método semicuantitativo de expresión génica. Esta técnica esta acoplada a una transcripción reversa mencionada anteriormente, en la cual se genera una molécula de cDNA, el cual es utilizado como molde para la amplificación, ya que es una molécula mucho más estable que el RNA.^{37,38,39}

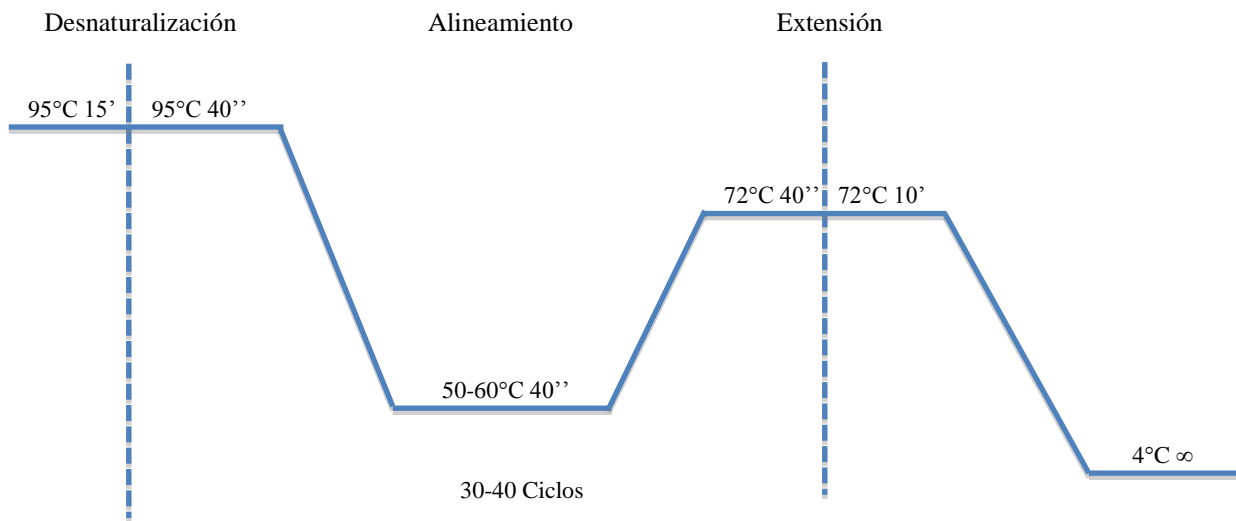


Figura 8. Programa aplicado a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La desnaturalización del DNA es el paso inicial en el cual se requiere de una temperatura de 90-95°C, en el paso del alineamiento la temperatura y tiempo dependen de la cantidad de oligonucleótidos en la reacción y de su T_m (Melting Temperature), la extensión debe realizarse a la temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa de 70-75°C y el tiempo depende de la longitud del fragmento amplificado (1min=1000 pb). Estos pasos se repiten en ciclo precedidos de una desnaturalización y una extensión final al concluir el número de ciclos.

Para lograr que la reacción de PCR sea un éxito se deben determinar los niveles adecuados de los reactivos con los que se trabajara como lo son; la cantidad de la polimerasa, la concentración de magnesio, la concentración de los primers y la cantidad de DNA o cDNA a utilizar; así como también las condiciones de temperatura de alineamiento, tiempo de alineamiento y número de ciclos, la determinación de los niveles de todas estas variables que influyen en el PCR (Tabla 3) se realiza monitoreando las; para lo que se realiza un diseño para el análisis del experimento, este diseño tradicionalmente se realiza analizando experimentalmente los niveles teóricos y variándolos de acuerdo a los resultados obtenidos, el análisis generalmente se realiza utilizando el diseño factorial, el cual analiza todas las combinaciones posibles de las variables involucradas a sus diferentes niveles de interés. Recientemente se ha empezado a utilizar en diferentes ámbitos una herramienta de diseño experimental basada en la Metodología Taguchi, esta surgió como una alternativa económica y rápida para el análisis simultaneo de las variables que influyen en un proceso o desarrollo de un producto.⁴⁰

Tabla 3. Variables que influyen en la técnica de PCR

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

4.- Diseño de experimentos basado en la metodología Taguchi

La humanidad siempre ha tenido una fascinación por la calidad. Hoy en día la tecnología da testimonio del deseo incesante del hombre para proporcionar un alto nivel de calidad en productos y servicios. Conducidos por la necesidad de competir en precio, rendimiento y rentabilidad, los fabricantes están cada vez más conscientes de la necesidad de optimizar productos y procesos. La calidad lograda mediante el diseño de experimentos es para muchos costo-efectivo, ya que les permite ganar y mantener una posición competitiva en el mercado mundial. Los modelos de diseño de experimentos son modelos estadísticos basados en la experimentación, cuyo objetivo es identificar y cuantificar los efectos de múltiples variables simultáneamente. Se sabe que si se repite un experimento en condiciones indistinguibles, los resultados presenta una variabilidad que puede ser grande o pequeña. Si la experimentación se realiza en un laboratorio donde las causas de variabilidad están muy controladas, el error experimental será pequeño y la variación en los resultados por lo tanto también será pequeña. Pero si se experimenta en procesos industriales, administrativos, etc; la variabilidad es grande en la mayoría de los casos. El objetivo del diseño de experimentos es estudiar si utilizar determinadas condiciones produce una mejora en el proceso y para ello se debe experimentar utilizándolas o no. Si la variabilidad experimental es grande, sólo se detectará la influencia las condiciones utilizadas cuando se produzcan grandes cambios en relación con el error observado. La metodología del diseño de experimentos estudia como variar las condiciones habituales en que se realiza un proceso empírico para aumentar la probabilidad de detectar cambios significativos en la respuesta, y así se obtiene mayor conocimiento del comportamiento del proceso de interés. Desde la época de los 40's el Dr. Genichi Taguchi introdujo varios conceptos estadísticos nuevos los cuales han probado ser herramientas valiosas en el tema del mejoramiento de la calidad. Muchos fabricantes japoneses han utilizado sus propuestas para mejorar la calidad de procesos y productos con un éxito sin precedentes. La calidad de los automóviles japoneses es atribuida en gran medida a la aplicación de la metodología Taguchi.

Esta metodología se basa en un enfoque el cual es completamente diferente de las practicas convencionales de ingeniería de calidad. Su metodología enfatiza el diseño de la calidad en los productos y procesos, mientras que la practica más usual se basa en la inspección.

En sus practicas de mejoramiento de la calidad, Taguchi esencialmente utiliza las herramientas estadísticas convencionales, pero las simplifica mediante la identificación de un set de lineamientos estrictos para el diseño de experimentos y el análisis de resultados. La propuesta de Taguchi ha sido extremadamente efectiva en mejorar la calidad de productos japoneses. Recientemente las industrias occidentales han empezado a reconocer al Método Taguchi como un herramienta sencilla pero altamente efectiva para mejorar la calidad de procesos y productos. Taguchi adoptó una excelente filosofía para el control de calidad en las industrias de manufactura. Su doctrina fue creada en un entorno totalmente diferente donde los ingenieros piensan, respiran y viven calidad. De hecho el dio inicio a nueva cultura de calidad en E.U.A por ejemplo, Ford Motor Company, ha decretado que todos los ingenieros de Ford Motor son entrenados en la metodología Taguchi y que sus principios son usados para resolver sus problemas de calidad. Su filosofía tiene consecuencias muy grandes, a pesar de que esta fundada en 3 conceptos o principios muy simples y fundamentales. Todas las técnicas y tecnología surgen enteramente de estas 3 ideas; las cuales son las siguientes:

- 1.- La calidad debe ser diseñada sobre del producto y no revisada sobre el.
- 2.- La calidad se mejora minimizando la desviación de un objetivo. El producto debe diseñarse como inmune a los factores ambientales incontrolables.
- 3.- El costo de la calidad debe ser medida en función de la desviación del estándar y las perdidas deben ser medidas a lo largo de todo el sistema.

Taguchi construyó sobre la observación de W.E Deming que el 85% de la falta de calidad es atribuible al proceso de manufactura y solo el 15% se atribuye al trabajador. Por lo tanto el desarrolló sistemas de manufactura que fueran robustos o insensibles a las variaciones ambientales diarias o de temporada, marca de equipo y otros factores externos. Los 3

principios fueron sus guías en el desarrollo de estos sistemas, examinando los factores que afectan la calidad de producción y los parámetros específicos del producto.

Para lograr la calidad de un producto deseable mediante el diseño de experimentos, el Dr. Taguchi recomienda un proceso de 3 etapas.

- 1.- Diseño de sistemas
- 2.- Diseño de parámetros
- 3.- Diseño de tolerancia

La fase de diseño de sistema es determinar los niveles adecuados de trabajo de los factores del diseño. Esto incluye diseñar y probar un sistema basado en el juicio del ingeniero (experto) de los parámetros del proceso o producto, partes y materiales seleccionados basados en la tecnología actual. A menudo esto involucra conocimiento e innovación de los campos aplicables de la ciencia y tecnología. Mientras el diseño del sistema ayuda a identificar los niveles de trabajo de los factores del diseño; el diseño de parámetros busca determinar los niveles del factor que produce el mejor rendimiento del proceso o producto bajo estudio. La condición óptima es seleccionada de modo que la influencia de los factores incontrolables causa una variación mínima del rendimiento del sistema. El diseño de tolerancia es un paso usado para afinar los resultados del diseño de parámetros por endurecimiento de la tolerancia de los factores con influencia significativa sobre el producto.

Taguchi construyó un set especial de arreglos ortogonales (AO's) para diseñar sus experimentos. El uso de cuadros latinos de arreglos ortogonales para el diseño de experimentos data de antes de la segunda guerra mundial. Por la combinación de cuadros latinos ortogonales en una única manera, Taguchi preparó un nuevo set de arreglos ortogonales estándar para ser usado por numerosas situaciones experimentales. Un AO común para el análisis de factores a dos niveles y se muestra en la Figura 8. Este arreglo, designado por el símbolo L_8 , es usado para el diseño de experimentos donde se deba analizar hasta 7 factores a dos niveles cada uno. El arreglo tiene 8 filas y 7 columnas. Cada fila representa una condición a ensayar con los niveles de los factores indicados por los

números en la fila. Las columnas verticales corresponden a los factores específicos en el estudio.

Cada columna tiene 4 condiciones al nivel 1 y 4 condiciones al nivel 2 para el factor asignado a la columna. Dos factores en 2 niveles se combinan en 4 posibles formas, como lo son (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Cuando 2 columnas de un arreglo forman estas combinaciones el mismo número de veces, se dice que las columnas están balanceadas o que son ortogonales. De modo que cualquiera par de columnas de un arreglo ortogonal L_8 (2^7) tiene el mismo número de combinaciones (1,1), (1,2), (2,1) y (2,2). Por lo tanto, las 7 columnas son de un arreglo (L) son ortogonales una de otra.

Los AO facilitan el proceso de diseño de experimentos. Para diseñar un experimento se debe seleccionar el arreglo ortogonal más adecuado, asignar los factores a las columnas apropiadas, y finalmente, describir las combinaciones de los experimentos individuales llamadas condiciones de ensayo. Así que en un AO L_8 , cada fila representa cada uno de los ensayos necesarios que se tienen que llevar a cabo para completar el experimento. Las descripciones de cada experimento están determinadas por los números 1 y 2 que aparecen en las filas de las corridas de prueba. Un experimento factorial requeriría de 2^7 o 128 corridas, pero no proporcionaría información más relevante a la obtenida por el AO L_8 . El arreglo obliga a todos los experimentadores a diseñar experimentos idénticos. Los experimentadores pueden seleccionar designaciones diferentes para las columnas pero para las 8 corridas de prueba incluirán todas las combinaciones independientes de cada columna definida. Así los arreglos ortogonales aseguran consistencia en el diseño por diferentes experimentadores (Figura 9).

B. Factorial $2^7 = 128$ ensayos

A. Arreglo Ortogonal L_8

Variable	1	2	3	4	5	6	7
Ensayo	A	B	C	D	E	F	G
T1	1	1	1	1	1	1	1
T2	1	1	1	2	2	2	2
T3	1	2	2	1	1	2	2
T4	1	2	2	2	2	1	1
T5	2	1	2	1	2	1	2
T6	2	1	2	2	1	2	1
T7	2	2	1	1	2	2	1
T8	2	2	1	2	1	1	2

EXPERIMENTO FACTORIAL COMPLETO				A1				A2			
				B1		B2		B3		B4	
				C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
D1	E1	F1	G1	T1							
			G2								
		F2	G1								
			G2			T3					
	E2	F1	G1								
			G2					T5			
		F2	G1						T7		
			G2								
D2	E1	F1	G1								
			G2						T8		
		F2	G1					T6			
			G2								
	E2	F1	G1			T4					
			G2								
		F2	G1								
			G2	T2							

Figura 9. Comparación de un arreglo ortogonal L_8 contra un factorial 2^7 . (A). AO L_8 corridas necesarias para el análisis de un experimento que involucre 7 variables a 2 niveles cada una. (B). Ensayos necesarios en un diseño factorial completo 2^7 , se muestra la distribución que corresponde a los ensayos del arreglo ortogonal L_8 .

En la metodología Taguchi los resultados de los experimentos son analizados para lograr uno o más de los siguientes objetivo:

- 1.- Establecer la mejor condición óptima para un producto o proceso.
- 2.- Estimar la contribución de los factores individuales.
- 3.- Estimar la respuesta bajo las condiciones óptimas.

La condición óptima es identificada por el estudio de los efectos principales de cada uno de los factores. El proceso involucra manipulación aritmética menor de los resultados numéricos y usualmente pueden realizarse con la ayuda de una simple calculadora. Los

efectos principales indican la tendencia general de la influencia de los factores. Conociendo la característica, por ejemplo; se puede saber si un valor más bajo o más alto producen el resultado preferido; los niveles de los factores los cuales son esperados para producir el mejor resultado pueden ser predichos.

El conocimiento de la contribución de cada factor individual es una clave para decidir la naturaleza de el control que se tiene que establecer en una producción o proceso. El análisis de varianza (ANOVA) es la herramienta estadística comúnmente más aplicada a los resultados del experimento para determinar el porcentaje de contribución de cada factor. El estudio de la tabla ANOVA para un análisis dado ayuda a determinar cuales de los factores necesitan control y cuales no.

Para determinar la condición óptima mediante el análisis de los resultados de los experimentos, es necesario establecer cual será la característica a optimizar . Cada producto esta diseñado para realizar alguna función destinada. Alguna característica medible, generalmente referida como una característica de calidad es usada para expresar que también un producto esta llevando a cabo su función. En una mayoría de casos, la característica de calidad puede ser una sola cantidad medible tal como el peso, la longitud, las horas, etc. Para algunos productos medidas subjetivas como bueno, malo, bajo y alto pueden ser usadas. No importa como la calidad del producto sea medida, ya sea por un solo criterio o por combinación de múltiples criterios, la medida tendrá una de las siguientes 3 características:

- 1.- El mayor es mejor
- 2.- El pequeño es mejor
- 3.- El nominal es el mejor

Ya elegida uno o varias de las características mencionadas, se tomarán en cuenta para determinar el mejor diseño de parámetros y cumplir con el objetivo de optimizar el proceso o producto.

Una vez determinada la condición óptima, es usualmente una buena práctica realizar un experimento de confirmación. Sin embargo, es posible estimar un ensayo con la condición óptima de los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo en la condición no óptima. Cabe señalar que la condición óptima puede no necesariamente estar entre los muchos experimentos llevados a cabo ya, debido a que el AO representa solo una pequeña fracción de todas las posibilidades.

Entonces la técnica para aplicar la metodología Taguchi consta de los siguientes 4 pasos sencillos (Figura 10) que se seguirán para cumplir con los objetivos de este método:

- 1.- Lluvia de ideas de las características de calidad y diseño de los parámetros importantes para el producto o proceso.
- 2.- Diseñar y conducir los experimentos
- 3.- Analizar los resultados para determinar las condiciones óptimas
- 4.- Correr una prueba o varias pruebas confirmatorias usando las condiciones óptimas.

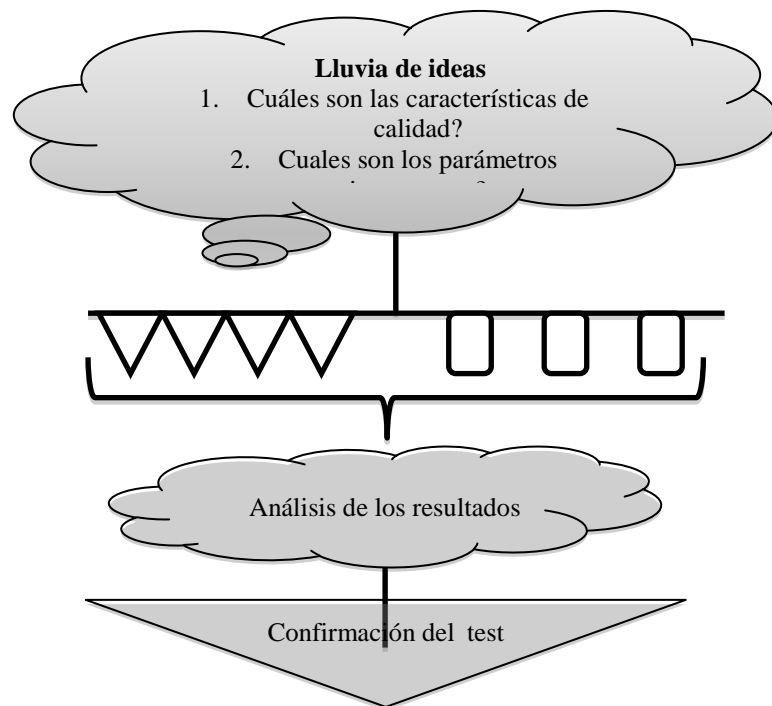


Figura 10. Esquema de la técnica del método Taguchi.

Dado que la técnica de la metodología Taguchi resulta fácil y sencilla, su utilización ha resultado atractiva para ser aplicada en diversas áreas biológicas o biotecnológicas como lo son: en el procesamiento de alimentos, fermentaciones microbiológicas, medicina, biología molecular, tratamiento de aguas residuales y bioremediación, su empleo en la estandarización de técnicas diagnosticas para la identificación de marcadores moleculares no ha sido utilizada por lo que resulta una metodología muy atractiva para comprobarse si es efectiva en este campo del análisis.⁴⁰⁻⁴³

IV. ANTECEDENTES

La leucemia es una enfermedad neoplásica hematológica que se caracteriza por una proliferación no regulada de las células progenitoras. Este síndrome hematológico se da por la expansión clonal de las células hematopoyéticas como resultado de una alteración en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, en cualquiera de las etapas de maduración de las células sanguíneas. Las leucemias agudas se dividen en 2 categorías dependiendo del progenitor hematológico afectado: mieloides y linfoides. Y estas a su vez dependiendo de progresión de la enfermedad (lenta o rápida) y del grado de diferenciación de las células sanguíneas presentes en el paciente (maduras o inmaduras) se clasifican en crónicas y agudas. Las leucemias agudas son el cáncer más frecuente en niños mexicanos menores de 15 años y de estas las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) representan cerca del 77 % de todas las leucemias diagnosticadas en niños y además representan la segunda causa de muerte en niños mexicanos de 1 a 14 años. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia de progenitores linfoides inmaduros siendo la del linaje de tipo B la más común. La leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) es la neoplasia más común en los niños. La mayoría de los casos de LLA-B presentan alteraciones citogenéticas recurrentes que incluyen aneuploidías y translocaciones cromosómicas que generan genes de fusión interrumpiendo la actividad de factores transcripcionales o activando oncogenes, eventos clave en la leucemogénesis.^{5,13-17}

De hecho gracias a la identificación de las alteraciones genéticas cromosómicas en neoplasias hematológicas como las leucemias linfoblásticas agudas B/T la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008 redefinió los criterios principales de diagnóstico y clasificación de los tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides.¹² La identificación de los transcritos de fusión asociados a LLA-B (t(1;19) con el gen de fusión E2A-PBX1, t(4;11) con el gen de fusión MLL-AF4, t(9;22) con el gen de fusión BCR-ABL1 y la t(12;21) con el gen de fusión TEL-AML1) son de suma importancia para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. La técnica molecular empleada para la detección de estos transcritos de fusión es la transcripción reversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Estas técnicas han tenido que estandarizarse para poder ser empleadas como una herramienta diagnóstica.⁴⁴ De hecho un claro ejemplo de esta

necesidad, es el trabajo realizado por el BIOMED Europeo donde el objetivo es identificar estos genes de fusión de manera individual mediante RT-PCR. Existen metodologías que se aplican para lograr la estandarización con la finalidad de obtener el mejor ensayo o producto, el método comúnmente usado es el factorial, que consiste en llevar a cabo todas las combinaciones posibles de las variables a analizar, lo que lo hace un método costoso y tardado. Por otro lado la metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales permite estandarizar procesos o ensayos, este método solo analiza algunas combinaciones, pero se realiza un análisis de varianza (ANOVA) para predecir el mejor ensayo, por lo que le confiere las características de ser rápido y económico.²⁴

La utilización de la metodología Taguchi en el campo de la biología ha generado resultados muy favorables. De hecho un trabajo de investigación realizado por Pérez-Contreras en el 2012 consistió en el desarrollo y validación de un panel de pruebas moleculares para el diagnóstico por laboratorio de neoplasias mieloproliferativas clásicas utilizando esta metodología. Por lo que resulta atractivo implementar el diseño de experimentos basados en la metodología Taguchi usando arreglos ortogonales para llegar a obtener las condiciones óptimas para la lograr la identificación de los diferentes genes de fusión por un la técnica de RT-PCR multiplex.

V. JUSTIFICACIÓN

Existen genes de fusión asociados a estas leucemias que son conocidos como marcadores moleculares y son identificados través del empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a una transcriptasa reversa (RT-PCR) ya que por citogenética muchas veces logran escapar. Los transcritos de fusión de valor pronóstico asociados a LLA son: la t(1;19) con el gen de fusión E2A-PBX1, t(4;11) con el gen de fusión MLL-AF4, t(9;22) con el gen de fusión BCR-ABL1 y la t(12;21) con el gen de fusión TEL-AML1. Esto hace necesario el diseño de nuevas pruebas genético moleculares estandarizadas y optimizadas mediante diseño de experimentos.^{12,24,44}

La metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales abre una alternativa en la búsqueda de parámetros adecuados para cada variable con el fin de lograr la optimización de la prueba que además también tiene como objetivo reducir costos y tiempo de investigación. Por lo tanto la aplicación de esta metodología permitirá obtener el mejor ensayo para identificar de manera rápida y confiable los diferentes genes de fusión asociados a LLA.

40,42

VI. HIPÓTESIS

El empleo de arreglos ortogonales permite optimizar una prueba de RT-PCR Multiplex para la identificación de marcadores moleculares asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B.

VII. OBJETIVOS

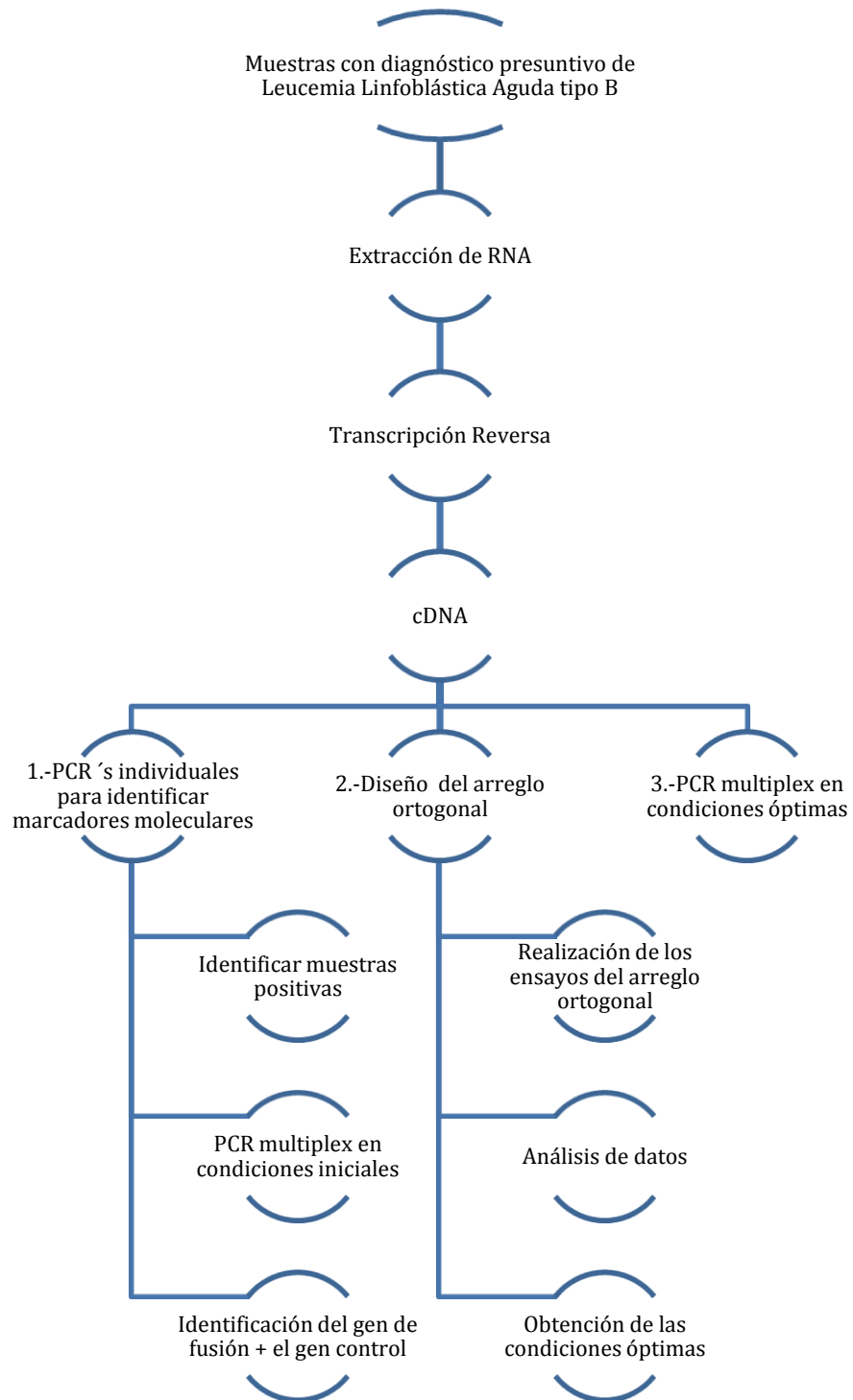
- *Objetivo general*

Aplicar la metodología Taguchi para la optimización de una prueba RT-PCR Multiplex aplicada en el diagnóstico por el laboratorio de leucemia linfoblástica aguda de tipo B.

- *Objetivos específicos*

- Establecer mediante arreglos ortogonales las condiciones óptimas para la identificación independiente de los marcadores moleculares E2A-PBX1, MLL-AF4, BCR-ABL1, TEL-AML1 mediante RT-PCR Multiplex.
- Optimizar y estandarizar mediante un diseño de experimentos basados en arreglos ortogonales una prueba RT-PCR Multiplex para identificar 4 marcadores moleculares de leucemia linfoblástica aguda de tipo B de valor predictivo mediante un solo programa de amplificación.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IX. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Manipulación de ácidos nucleicos

1.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de RNA total de las células sanguíneas se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAamp® RNA Blood Mini Kit de QUIAGEN® de acuerdo a las especificaciones del proveedor. De manera breve este protocolo consiste en adicionar 5 mL de buffer EL a la muestra (sangre o medula ósea) para hacer una lisis selectiva de los eritrocitos. Los leucocitos se recuperan por centrifugación para después agregar el buffer de lisis RLT, y el lisado se coloca en una columna QIAshredder y se centrifuga para eliminar los restos celulares. Al filtrado se le agrega etanol al 70% libre de RNAsas y la mezcla se coloca en una columna QIAamp, se centrifuga y el filtrado se elimina. Después la columna se lava con el buffer RW1 y se le añade DNAsa y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la digestión de DNA, la DNAsa es removida por un segundo lavado con el buffer RW1; en seguida se lava el RNA con el buffer RPE y se elimina este buffer por centrifugación para finalmente eluir el RNA de la columna adicionando 30µL de agua libre de RNAsas. Una vez concluida la extracción de RNA este se almacenó a -70°C para su posterior uso.

1.2 Cuantificación y análisis de integridad de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó mediante una dilución 1:50 con agua libre de nucleasas y se utilizó un espectrofotómetro BioPhotomer Eppendorf® para realizar la lectura a diferentes absorbancias del espectro del UV (230, 260, 280 y 320 nm) debido a que los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA o RNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Y dado que los ácidos nucleicos tienen un máximo de

absorción a una longitud de onda de 260nm. A esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración. Por lo que para la obtención de la cuantificación total de los ácidos nucleicos se utilizaron las siguientes fórmulas:

- **Concentración de DNA**= (50 ng/μL) (A₂₆₀) (Factor de dilución)= ng/μL
- **Concentración de RNA**= (40 μg/mL) (A₂₆₀) (Factor de dilución)/ 1000= μg/μL

La integridad de los ácidos nucleicos fue analizada mediante electroforesis en geles de 1.2% a 1.6% de agarosa invitrogen®, con buffer TBE 1x (Tris - Acido Bórico - EDTA) invitrogen®. Los geles se visualizaron tiñéndolos con una solución de bromuro de etidio al 0.01%, las imágenes fueron tomadas mediante un foto-documentador Applied Biosystem®.

2. Transcripción Reversa (RT)

La transcripción reversa se realizó utilizando de 0.5 a 1 μg de RNA, random nonámeros, y el Omniscript RT kit de QUIAGEN® que contiene la Transcriptasa Reversa Omniscript, los dNTP's, el buffer y agua libre de RNAsas. Por lo que se siguió el protocolo establecido por el proveedor obteniendo así cDNA para su uso.

3. PCR Y PCR Multiplex acoplado a transcripción reversa para la detección de los diferentes genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B.

Los genes de fusión de *E2A-PBX1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1* (p190) y el gen *JAK2* que se usó como control interno de la reacción, se detectaron utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos para la identificación de los genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B y oligonucleótidos para identificar el gen control (*JAK2*).

NOMBRE	TAMAÑO (pb)	SECUENCIA 5'--3'	Tm (°C)
E2A-A	19	CACCAGCCTCATGCACAAC	62.3
PBX-B	19	TCGCAGGAGATTCATCACG	60.2
MLL-A	17	CCGCCTCAGCCACCTAC	64.4
AF4-B	20	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	62.4
BCR-e1-A	21	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	60.0
ABL-a3-B	21	GTTTGGGCTTCACACCATTC	64.0
TEL-A	20	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	62.4
AML1-B	19	AACGCCTCGCTCATCTTGC	62.3
JAK2 F/IC e11	30	GTTACCAGATGGAAACTGTTCGCTCAGAC A	61.5
JAK2 R e16	30	TGTCTTCTGTCTTCTTCTGATAAGCAG	59.2

Oligonucleótidos analizados con el software OligoAnalyzer 3.1

4. Variables analizadas en el (AO) L_{16} para la detección de los diferentes genes de fusión

Las variables que se muestran en la Tabla 5 fueron las analizadas por la Metodología Taguchi utilizando una matriz establecida (AO) L_{16} para la optimización de la prueba independiente de cada uno de los genes de fusión.

Tabla 5. Variables analizadas en el (AO) L_{16} para la detección de los genes de fusión

Variable	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ
	M Mix (μL)	T° A (°C)	T' A (s)	N. Ciclos	cDNA μL	Oligonucleótidos									
						E2A-A μM	PBX-B μM	MLL-A μM	AF4-B μM	BCR-e1-A μM	ABL-a3-B μM	TEL-A μM	AML1-B μM	JAK2 F μM	JAK2 R μM
Nivel 1 (bajo)	10	60	45	30	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Nivel 2 (alto)	12.5	62	90	35	1.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

M Mix: Multiplex PCR Master Mix de QUIAGEN®, T° A : Temperatura de Alineamiento, T' A: Tiempo de Alineamiento

5. Variables analizadas en el (AO) L_{12} para la detección de los diferentes genes de fusión

Las variables que se muestran en la Tabla 6 fueron las analizadas por la metodología Taguchi utilizando una matriz establecida (AO) L_{12} para lograr la optimización del PCR multiplex y así en una sola condición poder identificar cualquiera de los genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B.

Tabla 6. Variables analizadas en el (AO) L_{12} para la detección de los genes de fusión

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Variable	M Mix (μ L)	cDNA (μ L)	AML1-B (μ M)	ABL-a3-B (μ M)	TEL-A (μ M)	MLL-A (μ M)	T ^(s)	BCR-e1-A (μ M)	PBX-B (μ M)	AML1-B (μ M)	ERROR	ERROR
Nivel 1 (bajo)	10	0.5	45	30	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Nivel 2 (alto)	12.5	1.0	90	35	1.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

M Mix: Multiplex PCR Master Mix de QUIAGEN®, T^A: Tiempo de Alineamiento

6. Análisis de resultados por metodología Taguchi

Los resultados obtenidos de cada diseño experimental se analizaron mediante una herramienta estadística llamada Análisis de Varianza (ANOVA) que fue resuelto por mínimos cuadrados. Las matrices de los experimentos realizados se obtuvieron colocando las variables y los niveles de estudio en las matrices de los arreglos ortogonales L_{12} y L_{16} (Tabla 7 y 8). Las formulas empleadas para realizar los cálculos necesarios para el análisis por metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales y resuelto por ANOVA se muestran en la Tabla 9.

Tabla 7. Matriz del arreglo ortogonal L_{16}

Variable	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ
Ensayo															
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1

Tabla 8. Matriz del arreglo ortogonal L_{12}

Variable	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Ensayo											
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
4	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	2
5	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1
6	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1
7	2	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1
8	2	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2
9	2	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1
10	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2
11	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	2
12	2	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1

Tabla 9. Formulas utilizadas en los cálculos para el análisis de datos.

Fórmula	Descripción
$F_{i_1} = \sum Y_{i_1} \quad F_{i_2} = \sum Y_{i_2}$	Sumatoria de la “característica de calidad” (Y) de cada factor (Fi) en sus diferentes niveles (1 y 2)
$\overline{F_{i_1}} = \frac{(\sum Y_{i_1})}{N_1} \quad \overline{F_{i_2}} = \frac{(\sum Y_{i_2})}{N_2}$	Promedio de los factores, se usa para obtener el promedio de cada factor (Fi) mediante la sumatoria de su “característica de calidad” (Y) en sus diferentes niveles (1 y 2).
$SSFi = \frac{(F_{i_1} - F_{i_2})^2}{(N_1 + N_2)}$	Suma de cuadrados
$gl_{Fi} = \text{Numero de niveles de } Fi - 1$	Grados de libertad
$MS = \frac{SSFi}{gl}$	Cuadrados medios (Varianza)
$FO = \frac{MSi}{MS_{error}}$	F calculada (Ratio de la varianza), se utiliza para obtener la significancia de cada factor y representa el índice de variación respecto al error.
$S'_{Fi} = SS_{Fi} - gl_{Fi} \times V_e$	Suma Pura de cuadrados
$P_{Fi} = S'_{Fi} \times \frac{100}{S_T}$	Porcentaje de contribución de cada factor
$Y_{opt} = \bar{Y} + \sum EfFi$	Y optima (Yopt), indica la predicción de Y con los valores considerados como óptimos para cada variable.

X. RESULTADOS

1. Identificación de muestras positivas para los diferentes genes de fusión asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B.

Para identificar muestras positivas para cada uno de los genes de fusión, se reclutaron primeramente muestras con diagnóstico presuntivo de leucemia linfoblástica de tipo B, a las cuales se les realizó la extracción de RNA y transcripción reversa respectiva para obtener el cDNA y así mediante un tamizaje identificar los genes de fusión (*E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*) mediante la técnica de PCR. Se llevaron a cabo PCR's individuales para identificar muestras positivas para cada uno de los genes de fusión de interés, y así poder emplear la metodología Taguchi para la optimización de un PCR multiplex. El análisis electroforético de los productos obtenidos en los ensayos realizados para la detección de los transcritos *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1*, *TEL-AML1* se muestra en la Figura 11 donde el amplificado de 373pb corresponde al gen de fusión *E2A-PBX1*, el de 521pb corresponde a la variante (e1-a2) del gen de fusión *BCR-ABL* p190, la banda de 298pb corresponde al gen de fusión *TEL-AML1* y el amplificado de 427pb corresponde a la variante (e9-e4) del gen de fusión *MLL-AF4*.

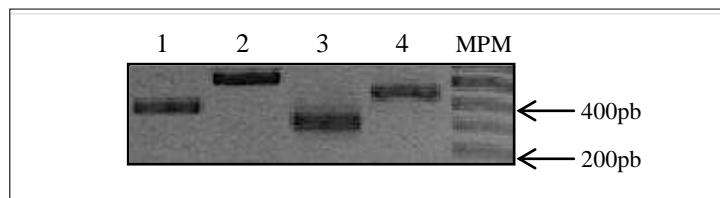


Figura 11. Análisis electroforético de muestras positivas para cada uno de los genes de fusión. Los amplicones obtenidos a través de los PCR's individuales fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%. Los amplificados corresponden a los genes de fusión: 1) *E2A-PBX1* (373pb); 2) *BCR-ABL1* (521pb); 3) *TEL-AML1* (298pb) y 4) *MLL-AF4* (427pb). (MPM) Marcador de peso molecular de 100pb.

2. Aplicación de la metodología Taguchi para la optimización de técnicas de identificación de marcadores moleculares.

El gen de fusión *BCR-ABL1* p190 que se genera a través de la t(9;22) (q34;q11), *TEL-AML1* se genera con la t(12;21) (p13;q22), *MLL-AF4* se da a través de t(4;11)(q21;q23) y *E2A-PBX1* que se genera a través de la translocación t(1;19) (q23;p13), son cuatro de las cinco anormalidades genéticas recurrentes que involucran alguna translocación y que se asocian a una leucemia linfoblástica aguda, por lo que son considerados como marcadores moleculares de suma importancia para su diagnóstico y el establecimiento del tratamiento. Por lo que se analizó cuales serían las variables o factores que podrían influir de manera importante en la detección de estos marcadores por la técnica de RT-PCR multiplex. Las variables a considerar después del análisis fueron la cantidad de master mix, temperatura de alineamiento, tiempo de alineamiento, número de ciclos, cantidad de cDNA y la concentración de cada uno de los oligonucleótidos. Una vez que se determinaron las variables, se decidió que arreglo ortogonal utilizar para poder llevar a cabo los ensayos. De modo que se cuantificó el DNA amplificado como variable respuesta para realizar los cálculos necesarios y el análisis de los índices de variación de cada factor que interviene en la identificación de cada uno de los genes de fusión. Las variables analizadas fueron 15 a 2 niveles (Tabla 5) para cada uno de los marcadores moleculares. La matriz de ensayos se obtuvo al sustituir las variables y sus correspondientes niveles de estudio en AO L_{16} . La cuantificación del DNA amplificado final para cada uno de los transcritos de fusión se muestra en la Tabla 10. Los porcentajes de contribución, el ratio de la varianza o F estadístico de cada variable y el error de la prueba se obtuvieron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y se enlistan en la Tabla 11 para cada uno de los genes de fusión.

Tabla 10. Cantidad de DNA amplificado de controles positivos para cada uno de los genes de fusión *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX1* obtenido mediante PCR multiplex.

Ensayo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
<i>BCR-ABL1</i> DNA ng/μL	10.8	14	16.8	14.3	14.1	14.3	12.4	15.3	23	19.3	18.4	15.4	18	16.1	16.4	16.5
<i>TEL-AML1</i> DNA ng/μL	9.9	17	19.8	17.7	16	17.9	16.3	18.6	20.6	22.8	19.5	19.6	17.3	22.3	17.4	18.1
<i>MLL-AF4</i> DNA ng/μL	15.1	14.6	13.4	14.5	13.2	14.9	12.9	15.8	16.6	17.7	18.5	17.4	18.8	21	16.4	19
<i>E2A-PBX1</i> DNA ng/μL	11.8	11.9	16.9	15.7	12.8	13.5	13.8	20.4	8.9	22.5	18.4	16.4	20.4	21.9	18.4	14.9

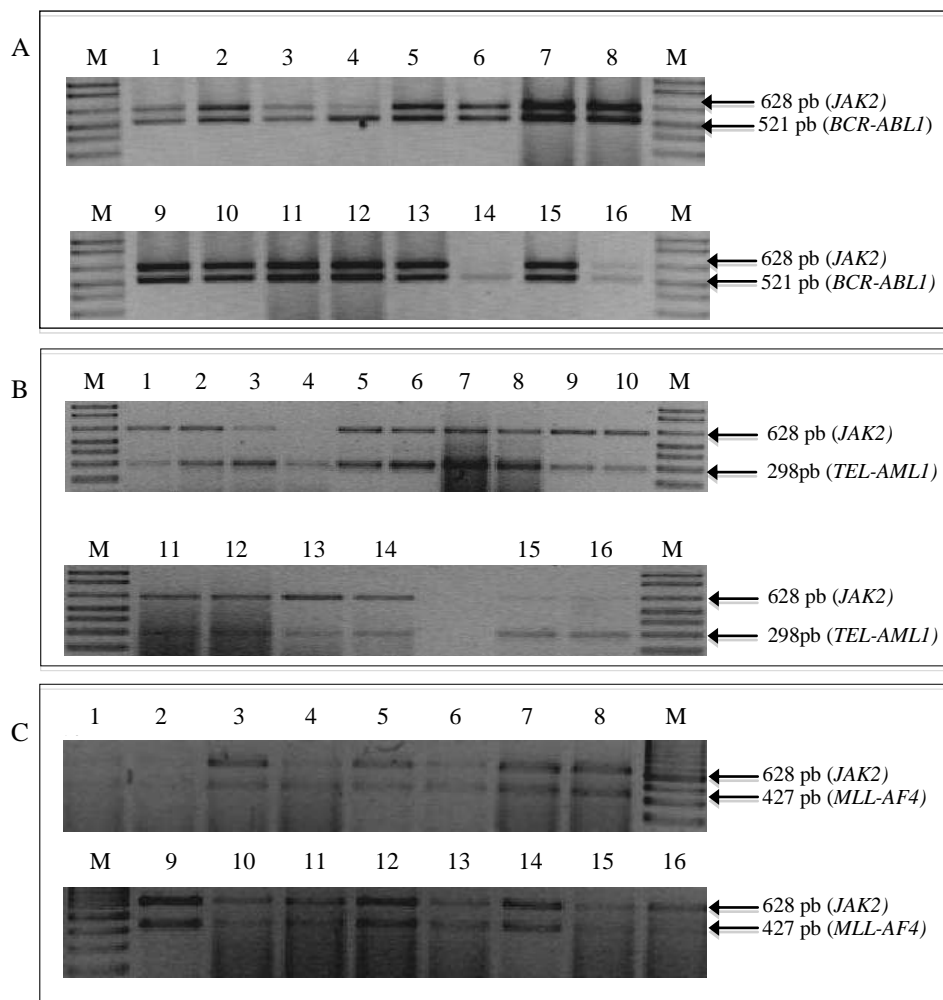
T: Ensayo (trial)

Tabla 11. Contribución de las variables para los genes de fusión *BCR-ABL*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX1*

Clave	Variable	BCR-ABL1		TEL-AML1		MLL-AF4		E2A-PBX1	
		F ^b	% C	F ^b	% C	F ^b	% C	F ^b	% C
A	Master M.	74.6	47.8	70.3	28.1	522.3	72.2	32.4	16.1
B	T° A	6.1	3.3	1.1	Pooled	9.6	1.2	9.6	4.4
C	T' A	6.7	3.7	16.5	6.3	18.3	2.4	1.4	Pooled
D	N. Ciclos	1.3	Pooled	1.2	Pooled	8.7	1.1	6.5	2.8
E	cDNA	18.1	11.1	47.3	18.7	1.4	Pooled	26.0	12.8
F	E2A-A	0.0	Pooled	10.4	3.8	7.0	0.8	9.3	4.3
G	PBX-B	15.8	9.6	11.3	4.2	38.3	5.2	6.7	2.9
H	MLL-A	1.7	Pooled	35.0	13.7	54.3	7.4	12.9	6.1
I	AF4-B	11.7	6.9	0.2	Pooled	0.1	Pooled	0.6	Pooled
J	BCR-e1-A	4.1	2.0	0.8	Pooled	42.1	5.7	1.4	Pooled
K	ABL-a3-B	0.5	Pooled	2.1	Pooled	0.3	Pooled	25.1	12.3
L	TEL-A	0.0	Pooled	27.3	10.6	0.5	Pooled	13.3	6.3
M	AML1-B	2.5	Pooled	0.7	Pooled	11.5	1.5	32.9	16.4
N	JAK2F	7.3	4.1	6.5	2.2	2.6	0.2	16.4	7.9
Ñ	JAK2R	3.9	1.9	16.5	6.3	4.9	0.5	0.6	Pooled
e	ERROR	1.0	9.7	1.0	6.1	1.0	2.1	1.0	7.7

a) Grado de confianza de la prueba, b) Índice de variación, %C: Porcentaje de contribución, Pooled(Combinado) : Variable asignada al error por no ser significativa.

El análisis electroforético de los productos obtenidos en los ensayos realizados para la optimización de la detección de cada uno de los genes de fusión mediante el AO *L16* presentaron los siguientes tamaños: Los amplificadores de 521 pb corresponden a la variante (p190 e1-a2) del gen de fusión *BCR-ABL1*, los de 298 pb corresponden al transcrito de *TEL-AML1*, los de 427 pb (e10-e6) corresponden a uno de los 10 transcritos de fusión que se pueden generar entre *MLL-AF4*, los de 373 pb corresponden al gen de fusión *E2A-PBX1* y finalmente los amplificadores de 628 pb corresponden a una región del gen *JAK2* que abarca del e11-e16 que fue usada como control interno de la reacción y que por ende nos habla de la calidad del cDNA; es mostrado en la Figura 12. En la figura 13 se ilustra la comparación de los ensayos realizados bajo las condiciones iniciales contra las que resultaron las óptimas mediante el empleo de la metodología Taguchi.



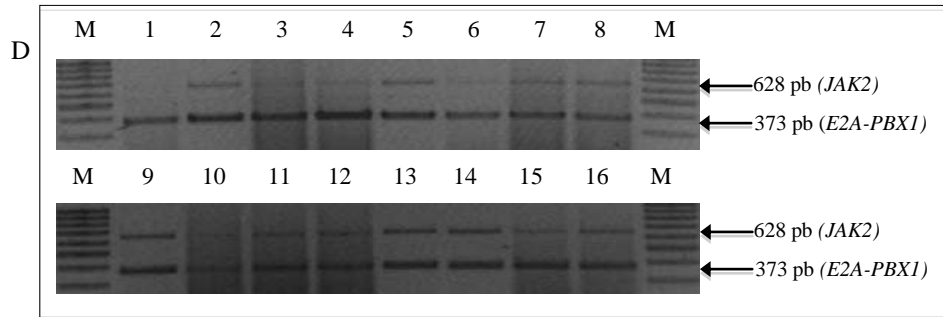


Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación para los ensayos de detección de los genes de fusión *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX1*. Los amplificadores obtenidos de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal L_{16} (1-16) diseñado para los genes de fusión fueron separados en geles de agarosa al 2.0 % y teñidos con bromuro de etidio. A) Los transcritos a 521 pb corresponden al gen de fusión *BCR-ABL1* p190 e1-a2. B) Los amplificadores de *TEL-AML1* presentan un tamaño de 298 pb. C) El gen de fusión *MLL-AF4* con la variante (e10-e6) genera un transcrito de 427 pb. D) El transcrito de 373 pb corresponde al gen de fusión *E2A-PBX1*. La región que abarca del exón 11-16 de *JAK2* (628 pb) es común para cada uno de los ensayos, ya que se utilizó como control interno de la reacción. M: Marcador de peso molecular.

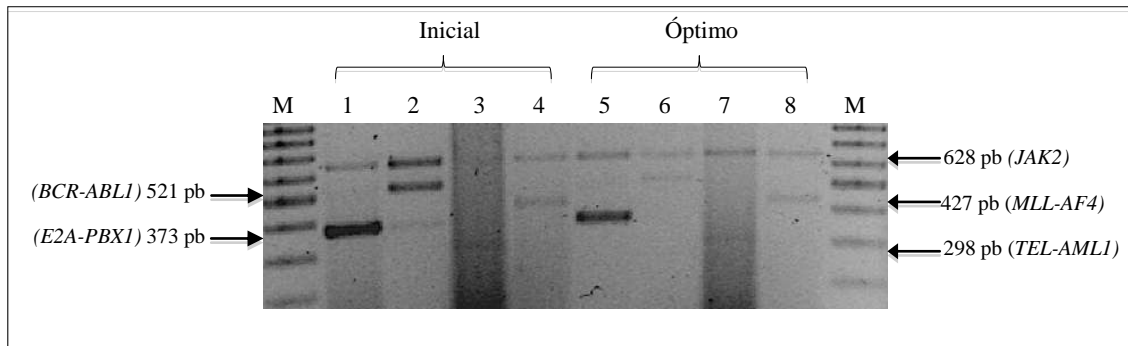


Figura 13. Análisis electroforético comparativo de la detección de los diferentes genes de fusión. Se realizaron los ensayos bajo las condiciones óptimas obtenidas del AO L_{16} mediante el análisis de las variables que influyen en la técnica de RT-PCR multiplex y se compararon contra los ensayos realizados bajo las condiciones iniciales. 1) Control positivo para *E2A-PBX1* (373 pb) (Condición inicial), 2) Control positivo para *BCR-ABL1* p190 e1-a2 (521 pb) (Condición inicial), 3) Control positivo de *TEL-AML1* (298 pb) (Condición inicial), 4) Control positivo de *MLL-AF4* (e10-e6) 427 pb (Condición inicial), 5) Control positivo para *E2A-PBX1* (373 pb) (Condición óptima), 6) Control positivo para *BCR-ABL1* p190 e1-a2 (521 pb) (Condición óptima), 7) Control positivo de *TEL-AML1* (298 pb) (Condición óptima), 8) Control positivo de *MLL-AF4* (e10-e6) 427 pb (Condición óptima). M) Marcador de peso molecular de 100 pb

2.1 PCR multiplex acoplado a transcripción reversa para obtener la condición óptima para la detección en una sola reacción las 4 alteraciones cromosómicas con genes de fusión: $t(9;22)(q34;q11)$ con BCR-ABL1 p190, $t(12;21)$ con TEL-AML1, $t(4;11)$ con MLL-AF4 y $t(1;19)$ con E2A-PBX1 mediante el AO L_{12} .

Para obtener la condición óptima con la que se podrá identificar cualquiera de las 4 alteraciones cromosómicas con sus respectivos genes de fusión, se tomaron en cuenta las variables que contribuyeron de manera significativa en cada uno de los arreglos ortogonales L_{16} establecidos para la obtención de la condición óptima individual de cada uno de los genes de fusión. De todas las variables analizadas la cantidad de master mix, cantidad de cDNA, ciertos oligonucleótidos (AML1-B, ABL-a3-B, TEL-A, MLL-A, BCR-e1-A y PBX-B) y el tiempo de alineamiento resultaron ser las más significativas y se muestran en la Tabla 12. De acuerdo con el número de estas variables, se decidió utilizar un arreglo ortogonal L_{12} para poder llevar a cabo los ensayos. Se trabajó solo un control positivo (MLL-AF4 e10-e6). De tal manera que se cuantificó el DNA amplificado como variable respuesta para realizar los cálculos necesarios y el análisis de los índices de variación de cada factor que interviene en la identificación de los genes de fusión, para finalmente obtener la condición óptima.

Las variables analizadas fueron 11 a 2 niveles (Tabla 6); donde 9 columnas corresponden a las variables que contribuyeron principalmente y 2 corresponden al error. La matriz de ensayos se obtuvo al sustituir las variables y sus correspondientes niveles de estudio en AO L_{12} . La cuantificación del DNA amplificado final para el transcrito de fusión se muestra en la Tabla 13. Los porcentajes de contribución, el ratio de la varianza o F estadístico de cada variable y el error de la prueba se obtuvieron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y se enlistan en la Tabla 14 para el gen de fusión seleccionado.

Tabla 12. Variables que contribuyeron principalmente en los AOs L_{16}

VARIABLE	% DE CONTRIBUCIÓN
Master M.	41.02
cDNA	14.2
AML1-B	16.35257874
ABL-a3-B	12.34131832
TEL-A	10.64590189
MLL-A	10.56
T' A	6.255070024
BCR-e1-A	5.690200211
PBX-B	5.172361885

Tabla 13. Cantidad de DNA amplificado del control positivo ($MLL-AF4$ e10-e6)

Ensayo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
DNA ng/ μ L	18.9	14.3	16.2	16.7	15	15.1	18.2	17.9	18.2	19.8	18.0	16.3

Tabla 14. Contribución de las variables finales analizadas en el AO L_{12} mediante el empleo de un control positivo para ($MLL-AF4$ e10-e6)

Clave	Variable	F ^b	% Contribución
A	Master M.	3.948	38.48
B	cDNA	0.208	2.03
C	AML1-B	0.001	0.01
D	ABL-a3-B	0.001	0.01
E	TEL-A	0.424	4.14
F	MLL-A	1.532	14.93
G	T' A	1.532	14.93
H	BCR-e1-A	0.001	0.01
I	PBX-B	0.611	5.96
J	ERROR	1.962 ^a	19.12
K	ERROR	0.038 ^a	0.37

a) Grado de confianza de la prueba, b) Índice de variación

Como se describe en materiales y métodos se realizó el análisis electroforético de los ensayos descritos en la matriz del arreglo ortogonal L_{12} , los amplificadores de 427 pb indican la presencia del transcrito de fusión $MLL-AF4$ (e10-e6) y los amplificadores de 628 pb corresponden a la región del gen $JAK2$ que abarca del exón 11 al exón 16, que como ya se mencionó se utiliza como control interno de la reacción (Figura 14). Una vez que se

obtuvo la condición óptima mediante el ANOVA del AO L_{12} , se llevaron a cabo los ensayos para definir si era posible identificar cualquiera de los 4 genes de fusión bajo la misma condición que resultó como óptima; los resultados se muestran en la Figura 15, donde se observa que amplificó el transcrito correspondiente a cada uno de los genes de fusión *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX1* y el control interno de la reacción (*JAK2*) para cada uno de los ensayos; por lo tanto podemos decir que se cumplió con el objetivo de identificar cualquiera de los 4 genes de fusión en una sola reacción de RT-PCR multiplex.

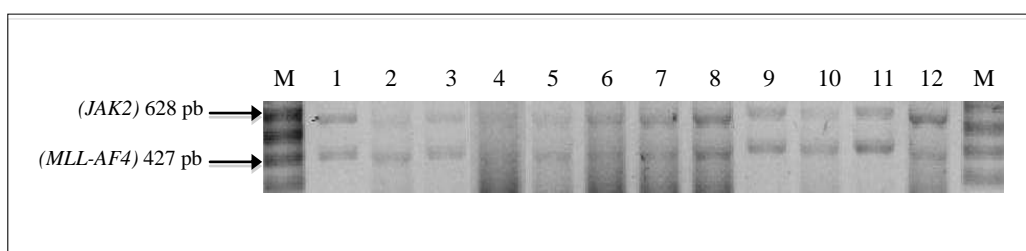


Figura 14. Análisis electroforético de los productos de amplificación para los ensayos de detección del gen de fusión *MLL-AF4*. Los amplificadores obtenidos de cada uno de los ensayos del arreglo ortogonal L_{12} (1-12) diseñado para el gen de fusión fueron separados en geles de agarosa al 2.0 % y teñidos con bromuro de etidio. El gen de fusión *MLL-AF4* con la variante (e10-e6) genera un transcrito de 427 pb. La región que abarca del exón 11-16 de *JAK2* (628 pb) es común para cada uno de los ensayos, ya que se utilizó como control interno de la reacción. M: Marcador de peso molecular.

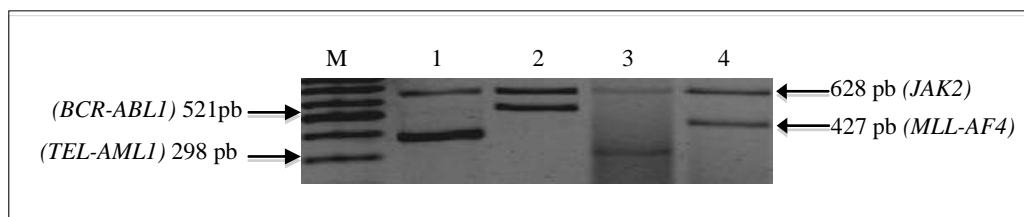


Figura 15. Análisis electroforético de la detección de los diferentes genes de fusión *BCR-ABL1*, *TEL-AML1*, *MLL-AF4* y *E2A-PBX1* mediante un RT-PCR multiplex utilizando una misma condición óptima. 1) Control positivo para *E2A-PBX1*(373 pb), 2) Control positivo para *BCR-ABL1* p190 e1-a2 (521 pb), 3) Control positivo de *TEL-AML1* (298 pb), 4) Control positivo de *MLL-AF4* (e10-e6) 427 pb. La región que abarca del exón 11-16 de *JAK2* (628 pb) es común para cada uno de los ensayos, ya que se utilizó como control interno de la reacción. M) Marcador de peso molecular de 100 pb.

XI. DISCUSIÓN

La detección de los marcadores moleculares asociados a leucemia linfoblástica aguda de tipo B (LLA-B) forma parte de los criterios principales en los algoritmos de diagnóstico de la OMS, la detección de estos contribuye a establecer el diagnóstico correcto, a clasificar la enfermedad de manera exacta y una vez identificada la presencia de alguno de los genes de fusión, se tomarán en cuenta para la clasificación de riesgo establecida por el (COG) con la finalidad de establecer el tratamiento adecuado y personalizado.²³ Los marcadores moleculares se consideran importantes porque poseen una frecuencia relativamente alta en pacientes pediátricos con LLA-B. La identificación de estos marcadores se hace principalmente por técnicas moleculares basadas en la técnica de PCR. La primera fase de experimentación consistió en la utilización de la metodología Taguchi para la estandarización de las variables que afectan la técnica de identificación independiente de los marcadores esto en base en el estudio de Thanakiatkrai y Welch (2011) quienes reportaron la optimización de una técnica molecular (qPCR) utilizando la metodología Taguchi y el análisis de experimentos por diseño factorial, donde se observó que sus resultados no tuvieron diferencias significativas.⁴² Lo que implicó llevar a cabo cuatro arreglos ortogonales, uno para cada uno de los genes de fusión. Este diseño permite una exploración de los experimentos de los cuales no se tiene información previa; dependiendo del número de variables involucradas y que se consideraron que afectan el ensayo de la PCR, se seleccionó el arreglo ortogonal adecuado. El AO que se utilizó en los primeros experimentos fue el L_{16} , ya que es ideal para experimentos de los que no se sabe el comportamiento de las variables. Este arreglo ortogonal permite analizar hasta 15 variables mediante 16 ensayos experimentales. Las variables se trabajaron a 2 niveles designados como 1 para el nivel bajo y 2 para el nivel alto, los niveles se decidieron a partir de valores de referencia que se establecieron como la condición inicial.

La identificación de los transcritos de fusión se realizó por RT-PCR. Se obtuvieron las concentraciones del DNA amplificado de cada uno de los ensayos realizados para utilizar la concentración como la variable respuesta y así poder determinar los porcentajes de contribución de cada una de las variables y el F estadístico (F de Taguchi, índice de variación), el cual si es mayor de 2 indica que el aporte de la variable al experimento es

significativo. Este análisis también determina el nivel óptimo a utilizar de cada variable y su efecto sobre la reacción. Los resultados del análisis de los cuatro arreglos ortogonales se muestran en la Tabla 11.

La variable que más influye en la reacción para la detección del gen de fusión *BCR-ABL1* con un porcentaje de contribución del 47.8% fue la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®. Esta variable está constituida por una mezcla de HotstarTaq® DNA polimerasa (2.5U por cada 12.5 µL), buffer Multiplex PCR con 6mM de MgCl₂ (pH=8 a 20°C) y una mezcla a 400 µM de cada dNTP. Esta variable puede ser la más influyente debido a que contiene 3 de los principales reactivos de la PCR, por ejemplo el MgCl₂ afecta el alineamiento de los primers así como la actividad y fidelidad de la enzima. La DNA polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. La polimerasa dado que es la que lleva a cabo la síntesis, la concentración también es importante para la especificidad, ya que si está en concentraciones altas se favorece la síntesis de productos inespecíficos. La concentración de cada uno de los nucleótidos debe ser igual porque una diferencia aumentará el grado de incorporación errónea.³⁸ Por lo tanto el Multiplex PCR Master Mix es el factor crucial que afecta primordialmente el desarrollo de la PCR. Y vemos que es el factor con el mayor porcentaje de contribución en la mayoría de los arreglos realizados. Por lo que sería de gran interés realizar un arreglo ortogonal que nos permita analizar de manera individual los componentes del master mix para conocer el porcentaje de su contribución. Otra variable que contribuye significativamente en un 11.1% es la cantidad de cDNA. Ya que cantidades grandes de DNA patrón elevan, generalmente, el rendimiento de productos de la PCR no específicos. Esta es la segunda variable que resultó importante en la mayoría de los arreglos llevados a cabo.

El cálculo de $Y_{est} = 16.56$ fue similar a los valores del DNA amplificado en los ensayos experimentales en el arreglo ortogonal L_{16} lo que refleja el comportamiento de la reacción en un 90.3% de acuerdo al grado de confianza de la prueba (aportación del error=9.7%). Con estos resultados se hizo la predicción del ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando las variables que tuvieron un porcentaje de contribución por debajo del error a nivel bajo, y aquellas que lo tuvieron por arriba del error se trabajaron siguiendo el criterio de el mayor

es el mejor lo que puede sugerir utilizar un nivel alto o bajo. Lo que resulta en un ensayo con el mínimo de recursos a excepción de la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® y la cantidad de cDNA que se trabajaron con el nivel alto. Así el ensayo óptimo se llevo a cabo con 12.5 µL Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, 1 µL de cDNA molde, E2A-A, PBX-B, MLL-A, AF4-B, BCR-e1-A, ABL-a3-B, TEL-A, AML1-B, JAK2F y JAK2R a una concentración de 0.2 µM en un volumen final de 25µL, con una temperatura de alineamiento de 60 °C, tiempo de alineamiento de 45s, con 30 ciclos de amplificación y tuvo una $Y = 17.2$ la cual es muy similar a la Y estimada y es equiparable al ensayo del carril número 3 en el AO L_{16} (Figura 12A) en cuanto a cantidad de DNA amplificado e intensidad de banda. Por tanto se ahorran recursos comparándolo con las condiciones iniciales y posee las características deseables para el análisis electroforético, ya que favorece la amplificación del transcrito *BCR-ABL1*, el gen control *JAK2* y no se observan inespecificidades. La corrida de comparación del ensayo óptimo contra el ensayo en condiciones iniciales se muestra en la Figura 13 para la detección de los transcritos *BCR-ABL1*.

Las variables que afectan la detección del gen de fusión *E2A-PBX1* resultaron ser la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® con una aportación del 16.1%, el oligo (AML1-B) con un 16.4%, oligo (ABL-A3-B) con 12.3%, oligo (JAK2F) con un 7.9% y la cantidad de cDNA con un 12.8%. El grado de confianza de la prueba refleja que tan certero es el análisis experimental en la técnica de identificación, mientras más pequeño sea el valor mayor será la descripción del experimento, para este caso el grado de confianza fue de 7.7% (variabilidad el error= 7.7%), esto nos indicó que el diseño describe el 92.3% del comportamiento del experimento. El cálculo de $Y_{est} = 19.52$ fue similar a valores de los ensayos experimentales del arreglo ortogonal L_{16} . Con estos resultados se predijo el ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando casi todas las variables a nivel bajo con excepción del Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, la cantidad de cDNA y el oligo (JAKF) que se utilizaron a un nivel alto, el resultado que arrojó este ensayo fue de una $Y = 20.1$ que es casi igual a la de la Y estimada y además es equiparable al mejor en ensayo obtenido en el AO L_{16} que se que puede visualizar en el carril 9 y 14 de la Figura 12D. El resultado nos lleva a utilizar el mínimo de recursos, siendo económico y más específico en la amplificación

comparado con las condiciones iniciales. El ensayo óptimo se realizó con 12.5 μ L Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, 1 μ L de cDNA, E2A-A, PBX-B, MLL-A, AF4-B, BCR-e1-A, ABL-a3-B, TEL-A, AML1-B y JAK2R se utilizaron a una concentración de 0.2 μ M y JAK2F a una concentración de 0.4 μ M en un volumen final de 25 μ L, con una temperatura de alineamiento de 60 °C, tiempo de alineamiento de 45s y con 30 ciclos de amplificación. La comprobación de los resultados del análisis de la prueba RT-PCR en la identificación del gen de fusión *E2A-PBX1* se realizó comparando un ensayo realizado en condiciones iniciales contra las condiciones óptimas después el análisis estadístico por la metodología Taguchi y se ilustró en la Figura 13.

Respecto al análisis de las variables que afectan la detección del gen de fusión *TEL-AML1*. Las variables que más influyen son la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® con un porcentaje de contribución del 28.1% , la cantidad de cDNA en un 18.7% , la concentración del oligo (TEL-A) con un porcentaje de contribución del 10.6% , oligo (MLL-A) con 13.7% y (JAK2R) con un 6.3% . La contribución importante que tiene oligonucleótido TEL-A podría estar relacionado con el hecho de que esta implicado en la identificación del gen de fusión de interés. cálculo de $Y_{est} = 21.31$ fue similar a algunos de los valores del DNA amplificado de los ensayos del AO L_{16} , lo que indica que los ensayos experimentales realizados en el arreglo ortogonal L_{16} reflejan el comportamiento de la reacción en un 93.9% de acuerdo al grado de confianza de la prueba (aportación del error=6.1%). Con estos resultados se hizo la predicción del ensayo óptimo, utilizando las variables que tuvieron un porcentaje de contribución por debajo del error a nivel bajo, y aquellas que lo tuvieron por arriba del error se trabajaron siguiendo el criterio de el mayor es el mejor, lo que resulta en un ensayo con el mínimo de recursos con excepción de la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, la cantidad de cDNA, y los oligos (TEL-A y MLL-A). El resultado que arroja este ensayo es equiparable al mejor en el AO L_{16} , visualizado en el carril 9 de la Figura 12B, por tanto se ahorran recursos comparándolo con las condiciones iniciales y posee las características deseables para el análisis electroforético, ya que favorece la amplificación del transcrito *TEL-AML1*. Por tanto el ensayo óptimo se llevo a cabo con 12.5 μ L Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, E2A-A, PBX-B, AF4-B, BCR-e1-A, ABL-a3-B, AML1-B y JAK2F y a una concentración de

0.2 μM , MLL-A, JAK2R y TEL-A a una concentración de 0.4 μM en un volumen final de 25 μL , con una temperatura de alineamiento de 60 $^{\circ}\text{C}$, tiempo de alineamiento de 45s, con 30 ciclos de amplificación y utilizando 1 μL de cDNA molde y tuvo una $Y= 20.5$ la cual es similar a la Y estimada. La corrida de comparación del ensayo óptimo contra el ensayo en condiciones iniciales se muestra en la Figura 13 para la detección de los transcritos *TEL-AML1*.

Para la detección del gen de fusión *MLL-AF4* se analizaron al igual que en los anteriores arreglos 15 variables de las cuales las que más influyeron en la detección de este gen de fusión son el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® con un 72.2%, los oligos PBX-B en un 5.2%, MLL-A 7.4% y BCR-e1-A 5.7% . El cálculo de la $Y_{est}= 21.3$ fue superior a cualquier valor de DNA amplificado e indica que las corridas experimentales realizadas en el AO *L16* reflejan el compartimiento de la reacción en un 97.9% de acuerdo al grado de confianza de la prueba (aportación del error=2.1%). Con estos resultados se hizo la predicción del ensayo óptimo, el cual se realizó utilizando la mayoría de las variables a nivel bajo, lo que resulta en un ensayo con menor cantidad de recursos empleados, con excepción de la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, cantidad de cDNA y la concentración del oligo (MLL-A) que se utilizaron a un nivel alto, el resultado que arroja este ensayo óptimo y el resultado de la Y_{est} son equiparables al mejor ensayo observado el carril 14 de la Figura 12C del AO *L16*, lo que permite el ahorro recursos comparándolo con las condiciones iniciales, y cuenta con características deseables para el análisis electroforético, ya que se favorece la amplificación del gen de fusión *MLL-AF4*. Así el ensayo óptimo se realizó con 12.5 μL Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, 1 μL de cDNA, E2A-A, PBX-B, AF4-B, BCR-e1-A, ABL-a3-B, TEL-A, AML1-B, JAK2F y JAK2R a una concentración de 0.2 μM y MLL-A a 0.4 μM en un volumen final de 25 μL , con una temperatura de alineamiento de 60 $^{\circ}\text{C}$, tiempo de alineamiento de 45s y con 30 ciclos de amplificación y se obtuvo una $Y= 20.5$ la cual es muy similar a la Y estimada. Las corridas de comparación del ensayo optimizado contra la condición inicial se muestra en la Figura 13 para la detección del transcrito de fusión *MLL-AF4*.

El hecho de que algunos oligonucleótidos sean factores que contribuyen de manera importante y de manera diferente en los distintos arreglos sugiere que tiene que ver con la formación de estructuras secundarias de los oligos producidas por las interacciones intermoleculares e intramoleculares, lo que puede conllevar a un rendimiento bajo de la reacción, a una amplificación inespecífica y que simplemente no haya amplificado porque se reduce en gran medida la disponibilidad de los primers. Se sabe que en una PCR las interacciones entre un par de oligos son difíciles de evitar y hay posibilidad de que exista formación de harpins, homodímeros y heterodímeros (dato no mostrado) ahora en una mezcla donde interactúan diez oligonucleótidos aumenta esta posibilidad.^{34,45,46} También la interacción es diferente respecto a la identificación de cada uno de los genes de fusión, además de que la matriz de DNA de cada muestra tiene secuencias distintas que podrían dar lugar a interacciones inespecíficas del primer con el DNA y se vea reflejado en la generación de amplificadores inespecíficos que es lo que se conoce como mispriming y lo podemos ver reflejado en el carril 2 de la Figura 13 que es un ensayo que se llevó a cabo en condiciones iniciales (no óptimas). Además las interacciones son diferentes y no proporcionadas ya que cada uno de los 16 ensayos del arreglo ortogonal es una condición diferente en la que varía la concentración de cada uno de los oligonucleótidos. Cabe mencionar que se realizó un análisis de los oligonucleótidos empleados mediante el software OligoAnalyzer 3.1 con la finalidad de calcular los ΔG para conocer la posibilidad de formación de las interacciones mencionadas, y se observaron valores por debajo de $\Delta G = -10$ kcal/mol que son tolerados generalmente en el diseño de oligonucleótidos.⁴⁵

La segunda y última parte del trabajo de tesis consistió en generar un RT-PCR multiplex para la detección simultánea de los cuatro genes de fusión *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1* y *TEL-AML1* en una sola condición de PCR. Para lograr este objetivo se diseñó un arreglo ortogonal L_{12} tomando en cuenta las variables que resultaron con los porcentajes de contribución significativos por arriba del error de los cuatro arreglos ortogonales L_{16} llevados a cabo en primera etapa. Las variables consideradas fueron el Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, cantidad de cDNA, ciertos oligonucleótidos (*AML1-B*, *ABL-a3-B*, *TEL-A*, *MLL-A*, *BCR-e1-A* y *PBX-B*) y el tiempo de alineamiento se muestran en la Tabla 6. Dado que el AO L_{12} permite analizar 11 variables se adicionaron 2 columnas al error ,

donde el porcentaje de contribución obtenido para esta variable representó el grado de confianza de la prueba. Se realizó el análisis de estas variables para determinar el índice de variación de cada una (estadístico F= F de Taguchi, índice de variación), el porcentaje de contribución y el nivel óptimo para su utilización en la detección de los cuatro marcadores moleculares, los ensayos experimentales se realizaron como lo describe el AO L_{12} , que se aplicó en una muestra positiva para el gen de fusión *MLL-AF4*.

Una vez llevados a cabo los ensayos descritos por el AO L_{12} y cuantificada la cantidad de DNA amplificado final como la característica de calidad, se analizaron los resultados mediante el análisis de varianza (ANOVA) obteniendo los datos mostrados en la tabla x. Donde se observó que la variable que influye de significativamente en la detección simultánea de los marcadores es la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® como se había observado en los arreglos ortogonales iniciales L_{16} , mientras que las variables adicionales que se tomaron en cuenta para el L_{12} no resultaron ya significativas y se trabajaron en un nivel bajo y solo la cantidad de Multiplex PCR Master Mix QIAGEN® se utilizó a un nivel alto. Pero se consideró utilizar el nivel alto en cuanto a la cantidad de cDNA ya que este nivel resultó ser significativo en los arreglos iniciales. De esta manera se logró obtener el óptimo para la detección simultánea de los marcadores. El cual se realizó utilizando 12.5 μ L Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®, 1 μ L de cDNA, E2A-A, PBX-B, MLL-A, AF4-B, BCR-e1-A, ABL-a3-B, TEL-A, AML1-B, JAK2F y JAK2R a una concentración de 0.2 μ M en un volumen final de 25 μ L, con una temperatura de alineamiento de 60 °C, tiempo de alineamiento de 45s y con 30 ciclos de amplificación. En la Figura 15 se muestra el análisis electroforético del ensayo óptimo aplicado para identificar los genes de fusión mediante una sola condición de PCR, donde se puede visualizar que se logró la amplificación de los cuatro genes de fusión.

XII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de el presente trabajo, se concluye que la utilización de la metodología Taguchi basada en arreglos ortogonales permitió llegar a las condiciones óptimas del RT-PCR multiplex para la detección independiente y simultanea de los transcritos de fusión *E2A-PBX1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL1* y *TEL-AML1* marcadores de leucemia linfoblástica aguda de tipo B con anormalidades genéticas recurrentes (Organización Mundial de la Salud). La utilización de esta metodología generó un resultado rápido, económico y confiable comparado con otras metodología aplicadas al diseño de experimentos. El arreglo ortogonal propuesto por la metodología Taguchi aplicado a la determinación de los marcadores se llevó a cabo a través de 16 ensayos analizando 15 variables a 2 niveles cada uno, este número de ensayos comparado con los 3,2768 necesarios para un análisis factorial representó un ahorro considerable de recursos. EL análisis de los datos reveló que la variable de mayor contribución en los arreglos diseñados para la detección de cada uno de los marcadores fue la mezcla para PCR (Multiplex PCR Master Mix QIAGEN®). Adicionalmente, se determinó el porcentaje de contribución de cada una de las variables (cantidad de cDNA, temperatura y tiempo de alineamiento, número de ciclos y concentración de cada uno de los oligonucleótidos) permitiendo establecer una mejora del proceso.

XIII. REFERENCIAS

1. Lichtman, M.A. & Kaushansky, K. *Williams Hematology*. Chapter 4 and 93 (Professional McGraw Hill, 2010).
2. Mayani, H., Flores, E. & Pelayo, R. Hematopoyesis. *Cancerología* **2**, 95–107 (2007).
3. Acute Lymphoblastic Leukemia. en http://www.lls.org/content/nationalcontent/resourcecenter/freeeducationmaterials/spanish/pdf/sp_all.pdf
4. Conter, V. & Rizzari, C. Acute lymphoblastic leukemia. *Orphanet* 1–13 (2004). en www.orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf
5. Mittal, P., Meehan, K.R. The Acute Leukemias. *The Leukocytoses* **15** 37–44 (2001).
6. Principles and Applications of Flow Cytometry. en http://flowlab-childrens-harvard.com/yahoo_site_admin/assets/docs/PRINCIPLESANDAPPLICATION.29464931.pdf
7. Ortuño, F.J. & Orfao, A. Aplicación de la citometría de flujo al diagnóstico y seguimiento inmunofenotípico de las leucemias agudas. *Medicina Clínica* **118**, 423–436 (2002).
8. McKenna, R. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clinical chemistry* **46**, 1252–1259 (2000).
9. Pintos, E. N. mielodisplásicos. *Servicio de Hematología del Sanatorio Julio Méndez*. **14**, 86–90 (2010).
10. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019–32 (2011).
11. Harris, N. L. *et al.* Commentary The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology* **10**, 1419–1432 (1999).
12. Swerdlow, S. H. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008).
13. Fajardo, A. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Rev Panam Salud* **2**, 75–88 (1999).
14. Cuevas, M.L., Villsís, M.A. & Fajardo, A. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pública de México* **45**, 115–123 (2003).
15. Mejía, J.M. Programa Educativo Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. *Revista de Hematología* **11**, 35–36 (2010).
16. Mejia, J.M. *et al.* Incidencia de las leucemias agudas en niños de la ciudad de México, de 1982 a 1991. *Salud Pública de México* **42**, 431–437 (2000).
17. Rizo, P. *et al.* Mortalidad por leucemias en menores de 20 años: México 1998-2002. *Bol Med Hosp Infant Mex* **62**, 8–12 (2005).

18. Mullighan, C. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation* **122**, (2012).
19. Mullighan, C. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **24**, 489–503 (2011).
20. Iacobucci, I. *et al.* Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia: recent developments. *Current hematologic malignancy reports* **7**, 133–43 (2012).
21. Carroll, W. & Bhojwani, D. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *American Society of Hematology* 102–131 (2003). en <<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2003/1/102.short>>
22. Harvey, R. C. *et al.* Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **116**, 4874–84 (2010).
23. Schultz, K. R. *et al.* Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children’s Cancer Group (CCG). *Blood* **109**, 926–35 (2007).
24. Dongen, J. Van & Macintyre, E. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease Report of. *Leukemia* **13**, 1901–1928 (1999).
25. Carranza, C. transcritos quiméricos BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, ETV6-AML1; y su utilidad como factor pronóstico en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica. *168.234.106.75* 1–206 (2011).
26. Zelent, A., Greaves, M. & Enver, T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* **23**, 4275–83 (2004).
27. Harbott, J., Viehmann, S., Borkhardt, a, Henze, G. & Lampert, F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* **90**, 4933–7 (1997).
28. Bizarro, S. *et al.* Molecular characterization of a rare MLL-AF4 (MLL-AFF1) fusion rearrangement in infant leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **178**, 61–64 (2007).
29. Hunger, S. P. *et al.* The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood* **77**, 687–93 (1991).
30. Aspland, S. E., Bendall, H. H. & Murre, C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* **20**, 5708–17 (2001).
31. QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit Handbook. en <<http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Assay-Technologies/End-Point-PCR-and-RT-PCR-Reagents/QIAGEN-OneStep-RT-PCR-Kit#resources>>
32. Gómez, L. La transcriptasa inversa: historia de un descubrimiento. *Virología* **14**, 18–23 (2011).
33. poster-rt-pcr. en <<http://www.gene-quantification.de/poster-rt-pcr.jpg>>

34. Arredondo, P. La reacción en cadena de la polimerasa. PCR: un impacto reciente en la biología molecular. *Balería de educación bioquímica* (1993). en <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:La+reacción+en+cadena+de+la+polimerasa.+PCR:+un+impacto+reciente+en+la+biología+molecular#1>>
35. Asuar, L. E. in *Herramientas Moleculares* 517–540 en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>>
36. Chuchana, P. Polymerase chain reaction: general methodology. *Annales de Biologie Clinique* **50**, 703–708 (1992).
37. Luque, J. & Herráez, Á. *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética Conceptos, Técnicas y Aplicaciones em Ciencias de la Salud*. 445 (Elsevier, 2008).
38. Cortazar, A. & Silva, E. P. Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR. (2004). en <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>>
39. Lo, Y. M. D. & Chan, K. C. A. Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology Clifton NJ* **336**, 1–10 (2006).
40. Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S. & Hobbs, P. J. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology Journal* **3**, 510–523 (2008).
41. Roy, R. K. *A Primer on the Taguchi Method*. 247 (Society of Manufacturing Engineers, 1990).
42. Thanakiatkrai, P. & Welch, L. Using the Taguchi method for rapid quantitative PCR optimization with SYBR Green I. *International Journal of Legal Medicine* **126**, 161–5 (2011).
43. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45 (2001).
44. Salto, M. *et al.* Multiplex RT-PCR for the detection of leukemia-associated translocations: validation and application to routine molecular diagnostic practice. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **5**, 231–6 (2003).
45. PCR Primer Design Guidelines. en http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html>
46. Primer-Dimer Formation: The Problem and the Solution. en http://www.corning.com/uploadedFiles/Lifesciences/PDFs/Axygen_PDFs/Primer-Dimer_Formation_Problem_and_Solution.pdf>