UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL

ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OPTIMIZACIÓN DE UNA PRUEBA PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DE LEUCEMIA AGUDA INFANTIL

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ARIADNA HERRERA FIGUEROA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. ANTONIO SANDOVAL CABRERA

DRA. EN C. CARLA GARCÍA MORALES

TOLUCA DE LERDO, ESTADO DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2023

Índice

Abreviaturas 4

Resumen 6

Marco teórico 7

- Leucemia aguda infantil 7
- Costos de tratamiento y diagnóstico de la LA 7
- Leucemogénesis 10
- Alteraciones cromosómicas en leucemia aguda infantil 13
- Leucemia linfoblástica aguda (LLA) 13
- Alteraciones cromosómicas en leucemia linfoblástica aguda 15
  - t(1;19)(q23;p13) 15
  - t(12;21)(q13;p22) 15
  - Del(1)(p32) 17
  - t(4;11)(q21;p23) 18
  - t(9;22)(q34;p11) 19
- Leucemia mieloide aguda (LMA) 21
- Alteraciones cromosómicas en leucemia mieloide aguda 23
  - t(15;17)(q24;p21) 23
  - inv(16)(p13;q22) 25
  - t(8;21)(q22;p22) 26
- Diagnóstico 27
  - Citogenética clásica o convencional 27
  - Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) 28
  - Citometría de Flujo 29
  - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 31
  - Uso de controles en la aplicación de diagnóstico por pruebas basadas en PCR 43

Justificación 47

Objetivos 48

Materiales y Métodos 49

- Plásmidos control de las alteraciones cromosómicas 49
- Células *E. coli Top 10* quimio competentes 50

Transformación de células competentes *E. coli* TOP10 51
Extracción de DNA plasmídico 52
Diseño y compatibilidad de oligonucleótidos para RT-PCR multiplex 53
PCR 55
Condiciones estándar iniciales de la RT-PCR multiplex 55
Estrategia general del trabajo 57
Resultados 58
Interacción de los oligonucleótidos en la RT-PCR multiplex 58
Prueba con condiciones estándar 62
Prueba de ajuste de concentración de plásmidos y número de ciclos 63
Prueba del cambio en la temperatura de alineamiento 64
Prueba de la concentración de $MgCl_2$ 65
Prueba adicionando del control B2M 67
Prueba con la mezcla de oligonucleótidos de LA y mezclas por subtipos de LLA y LMA 68
RT-PCR multiplex en muestras de pacientes con leucemia aguda infantil 71
Discusión 83
Conclusiones 90
Referencias 91

Abreviaturas

B2M: Beta-2-microglobulina

CD: Cluster of Differentiation

cDNA: DNA complementario

CMH: Células Madre Hematopoyéticas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNA pol: DNA polimerasa

dNTP: Desoxirribonucleótidos trisfosfato

E. Coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

FAB: French-American- British

FISH: *Flurorescence In Situ Hybridization*

FSC: Forward scatter (dispersión frontal)

Fw: Forward

LA: Leucemia Aguda

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LMC-N: Leucemia Mieloide Crónica Neutrofílica

LPA: Leucemia Promielocitica Aguda

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)

Ph: Cromosoma Filadelfia

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (por sus siglas en inglés)

Rv: Reverse

SSC: Side scatter (dispersión lateral)

MCS: Sitio de clonación múltiple

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

Tm: temperatura de alineación

ΔG°: Energía libre de Gibbs

Resumen

La leucemia aguda es el principal cáncer que afecta a la población infantil. Para establecer un diagnóstico más preciso de esta enfermedad y poder aplicar esquemas terapéuticos más certeros, es necesario la identificación de alteraciones cromosómicas, cuya determinación se hace mediante RT-PCR, pero para la mayoría de los pacientes de tratamiento es inaccesible por su alto costo.

En el Hospital para el niño IMIEM en el laboratorio de hemato-oncología, se desarrolló una prueba para la identificación de alteraciones cromosómicas comunes por RT-PCR monoplex punto final para pacientes con leucemia aguda infantil, con la finalidad de crear un método específico, robusto y económico que permita ampliar el acceso de este estudio para su diagnóstico.

Los ensayos de RT-PCR están diseñados para detectar fusiones específicas. Evaluar estas alteraciones a través de un panel de ensayos monoplex individuales tiende a ser laborioso, por esta razón es que se busca optimizar y estandarizar el proceso de diagnóstico de leucemias a través de una RT-PCR multiplex, buscando que sea más eficiente el resultado, minimizando aún más los costos de la prueba, maximizando el rendimiento, y se obtenga el diagnóstico en menor tiempo.

Para optimizar las condiciones de la RT-PCR multiplex se utilizó el vector pJET1.2, los cuales contienen las secuencias de los genes fusionados producto de las diversas alteraciones cromosómicas, que nos permitió tener este DNA molde disponible sin la necesidad de ocupar muestras de pacientes. Y una vez teniendo las condiciones óptimas, estas fueron corroboradas en pacientes portadores de las alteraciones cromosómicas previamente determinadas por el kit comercial Hemavision® 28N.

Se optimizo la prueba RT-PCR multiplex para la identificación de alteraciones cromosómicas más frecuentes en leucemia aguda infantil. La implementación de esta prueba permite en la disminución del 95.44% en el costo para la determinación de alteraciones cromosómicas en leucemia aguda infantil comunes por RT-PCR.

Marco teórico

Leucemia aguda infantil

La leucemia aguda (LA) es el cáncer más común que se presenta durante la infancia. A nivel mundial se estima que representa el 19% de incidencia total de cáncer infantil (World Health Organization, 2020).

En México, el cáncer es considerado como un problema prioritario de salud pública por su incidencia y alta tasa de mortalidad. Se estima que se presentan entre cinco y seis mil casos nuevos al año de cáncer en menores de 18 años, entre los que destacan las leucemias, que representan el 50% del total (Gobierno de México, 2019).

La LA es un trastorno hematológico maligno de progresión rápida, fenotípica y genéticamente heterogénea, en la cual los progenitores hematopoyéticos adquieren alteraciones cromosómicas que confieren una ventaja de proliferación clonal desregulada y/o supervivencia, provocando que pierdan su capacidad para diferenciarse (Wiernik et al., 2013). Existen dos subtipos de LA las cuales se clasifican según el linaje celular afectado, la más frecuente es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), seguida de la leucemia mieloide aguda (LMA).

La acumulación de células inmaduras llamadas blastos en la médula ósea y en la sangre periférica dificulta la producción de las células sanguíneas sanas. Además, las células malignas se difunden a través del torrente sanguíneo, con la posibilidad de que exista infiltración leucémica al sistema nervioso central (SNC) y órganos abdominales, lo cual si no se trata a tiempo puede llegar a causar una muerte prematura (Wiernik et al., 2013).

Costos de tratamiento y diagnóstico de la LA

Es importante detectar el cáncer en fases tempranas ya que puede depender la vida de las y los niños. De acuerdo con datos de la OMS, en México, aproximadamente el 75% de los casos de cáncer en niñas, niños y adolescentes se diagnostican en etapas avanzadas, lo cual no solo incrementa los costos y dificultades del tratamiento, sino que reduce las posibilidades de cura. Esta realidad se traduce en que la tasa de supervivencia nacional en niños, niñas y adolescentes con cáncer sea del 57%, en comparación con la de países desarrollados, donde la probabilidad de que una niña, niño o

adolescente con cáncer sobreviva es mayor al 80% (International Agency for Research on Cancer, 2018).

Es importante recalcar que un gran número de defunciones por cáncer infantil pueden ser evitables ya que se derivan de la falta de diagnóstico, diagnósticos incorrectos y principalmente, diagnósticos tardíos. He aquí la relevancia de obtener un diagnóstico a tiempo, de actuar de manera preventiva y de regular dicha actuación en los órganos correspondientes, así como de garantizar la calidad del tratamiento. No obstante, el diagnóstico como el tratamiento contra este padecimiento puede ser costoso, lo que termina por ser determinante y perjudicial sobre la salud de las niñas, niños y adolescentes con cáncer. En este sentido, de acuerdo con el Instituto Nacional de Pediatría, un niño con leucemia requiere para su diagnóstico y tratamientos alrededor de un millón de pesos por cada año de tratamiento. Otros, como La Asociación Mexicana de Ayuda a Niños con Cáncer estima que el tratamiento para el cáncer infantil cuesta alrededor de 9 mil pesos semanales en promedio, lo que resulta en 468 mil pesos anuales. Para un caso específico, los costos de atención promedio en el Hospital Infantil Teletón de Oncología varían desde los 300 mil pesos hasta los dos millones de pesos. Asimismo, la amplia necesidad de servicios de salud y procedimientos quirúrgicos puede elevar, en caso de requerir terapia intensiva, hasta 22 mil pesos diarios (Gaceta del Senado, 2023; González & Peralta, 2016).

Por otra parte, es preocupante que, de acuerdo con el Consejo Nacional de Población (CONAPO), hasta el 2018, la población de niños, niñas y adolescentes entre los 0 y los 19 años fue de 44 millones 700 mil, pero de ellos 26 millones 500 no cuentan con ningún tipo de seguridad social. En el mismo sentido, con datos del Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes, las tasas de incidencia (por millón) hasta el 2017 fueron: 89.6 nacional, 111.4 en niños y 68.1 en adolescentes (Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia, 2019).

Los esfuerzos deben ir orientados a facilitar las revisiones constantes, a brindar concientización y educación respecto al tema y con ello lograr diagnósticos tempranos que faciliten acceder a tratamientos exitosos, sin dejar de lado todo el andamiaje legal necesario para que una vez detectada la enfermedad en el menor, se le pueda brindar un tratamiento adecuado, amplio e integral que abone a una recuperación progresiva y de calidad (Gaceta del Senado, 2023).

El diagnóstico de la leucemia aguda infantil requiere de diferentes técnicas moleculares de forma rutinaria que son: citometría de flujo, cariotipo, FISH y RT-PCR. Cada una de ellas son fundamentales

para una evaluación diagnostica integral. Dentro de estas técnicas, la RT-PCR destaca por ser una técnica específica, sensible y rápida diseñada para detectar fusiones de genes específicas para la caracterización de la leucemia (Salto et al., 2003).

El diagnóstico mediante RT-PCR aunque es un método sensible, el costo de los kits comerciales es muy elevado como lo son QuanDX 30Q el cual puede detectar 30 alteraciones cromosómicas por tiempo real y su costo por prueba es de 6,301.12, el kit Hemavision 28N puede detectar 28 alteraciones con el costo por prueba de 5,373.87 y otro es el Hemavision 7N que detecta 7 alteraciones por punto final su costo por prueba es de 4,471.32.

Por esta razon en el Hospital para el niño IMIEM Cuero-Quezada realizo una RT-PCR monoplex para la identificación de las alteraciones cromosómicas para pacientes con leucemia aguda infantil que permite ampliar el acceso de este estudio. En el presente trabajo se optimizo esta prueba realizando una RT-PCR multiplex que permite ahorrar en reactivos, tiempo además de reducir el costo de la prueba.

Leucemogénesis

La hematopoyesis es el proceso en donde las células madre hematopoyéticas (CMH) proliferan y se diferencian dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes. Las CMH tienen dos propiedades esenciales que se requieren para el mantenimiento de la hematopoyesis: la pluripotencialidad en donde una CMH tiene la capacidad de generar las células hematopoyéticas maduras, y la capacidad de autorrenovación que es la característica de generar células hijas con las mismas propiedades que su progenitor. Cuando la CMH se divide, una de las células hijas se diferencia y la otra se autorrenueva para evitar la depleción de células madre (Mayani et al., 2007).

En un inicio las CMH asumen un compromiso fundamental con el destino linfoide o mieloide. Estos dos tipos de precursores posteriormente experimentan una mayor restricción en el potencial de diferenciación hasta que se generan células diferenciadas terminalmente. Los progenitores mieloides dan lugar a los monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos o megacariocitos, mientras que los linfoides dan lugar a los linfocitos B o T (Kumar et al., 2015).

Una variedad de factores contribuye al desarrollo de la leucemia aguda. Estos factores alteran el delicado equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación que es característico de la hematopoyesis normal y conduce a la expansión de las células precursoras de la leucemia. El cáncer es una enfermedad clonal que se inicia en una sola célula que ha acumulado suficiente daño genético para causar una proliferación descontrolada y, por lo tanto, la progenie de esta célula constituye el tumor. Experimental al trasplantar un subconjuntos de células tumorales de un organismo a otro, demuestra que los tumores son fundamentalmente heterogéneos, ya que solo una determinada subpoblación de células tiene la capacidad de mantener o reiniciar el tumor (Wiernik et al., 2018).

Existen dos modelos que explican el potencial proliferativo heterogéneo de las células leucémicas. El modelo estocástico, supone que cada célula de un tumor es potencialmente iniciadora de tumores. La progresión se rige por eventos aleatorios. Las células con mutaciones que adquieren una ventaja de crecimiento dominarán sobre todas las demás células del tumor y originarán un nuevo clon. Por el contrario, el modelo jerárquico, postula que la leucemia aguda consta de dos tipos de células funcionalmente distintas: las células madre leucémicas y las células progenie. Las células madre leucémicas (CML), son células que se autorrenuevan con la capacidad de iniciar, mantener y expandir la enfermedad. Por otro lado, las células progenie no se autorrenuevan y son derivadas de las células madre leucémicas a través de la diferenciación, que probablemente

constituyen la mayor parte del tumor y explican la sintomatología de la enfermedad (Wiernik et al., 2018).

La leucemogénesis es el proceso donde los precursores hematopoyéticos adquieren rearreglos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas en una célula madre hematopoyética, confiriéndoles una ventaja de proliferación y supervivencia. Kelly y Gilliland en 2001 propusieron un modelo sobre el desarrollo de la LMA, que también es aplicable al desarrollo de la LLA. Este modelo supone que para el desarrollo de la leucemia se asocian al menos 2 tipos de mutaciones: las mutaciones de clase I y las mutaciones de clase II (Lagunas, 2016).

Las mutaciones de clase I se refieren a la activación aberrante de las vías de traducción de señales, la cual proporciona una ventaja de proliferación y/o supervivencia a los progenitores hematopoyéticas.

Las mutaciones de clase II abarcan las alteraciones de factores de transcripción importantes en la regulación de la diferenciación hematopoyética normal. Además, incluyen proteínas de fusión (oncoproteinas quiméricas) resultantes de las translocaciones cromosómicas, las cuales poseen cualidades reguladoras de la transcripción, y estas pueden activar o silenciar genes interactuando con diversos promotores, potenciadores o silenciadores, o bien regulando la interacción entre las histonas y el DNA (Lagunas, 2016).

Esta propuesta de “dos hits” para la leucemogénesis postula que la leucemia aguda surgiría de la cooperación entre una clase de mutación que confiere una ventaja proliferativa a las células y una segunda clase de mutación que interfiere con la diferenciación (Kosmider & Moreau, 2006).

En los últimos años se han identificado que estas alteraciones en los genes están implicadas en la regulación epigenética, que se consideran una tercera clase de mutaciones que muestran efectos en la diferenciación celular y la proliferación. Estas modificaciones epigenéticas son la metilación del DNA, la modificación de histonas postraduccional, los miRNAs y la hipermetilación, las cuales influyen en el desarrollo de leucemia (Leyton, 2018).

En 1973 la genetista Janet Rowley descubrió en las células leucémicas anormalidades cromosómicas somáticas, lo cual permitió establecer que la LA es una enfermedad genética. Con ello se han realizado diversos estudios que han conducido a la identificación de los genes alterados causantes de leucemia, así como sus puntos de ruptura asociados a translocaciones, inversiones y deleciones, proporcionando un mejor entendimiento de la hematopoyesis normal, de igual manera se ha

logrado descubrir algunos de los mecanismos patogénicos de la LA. Se ha encontrado que los rearreglos cromosómicos dan lugar a la fusión de genes involucrados en la codificación de factores de transcripción hematopoyéticos, reguladores epigenéticos y componentes del complejo de poros nucleares. Esta fusión de genes ocasionada por alguna alteración cromosómica se considera como el paso iniciador crítico para la leucemogénesis (Druker, 2014; Grimwade et al., 2016).

La complejidad de la organización espacial del genoma no aleatoria y su papel emergente en la función del genoma apunta fuertemente a un papel crítico de la organización del genoma de orden superior en la formación de translocaciones cromosómicas. Los núcleos en interfase se compartimentan en regiones discretas tridimensionales, conocidas como territorios cromosómicos de acuerdo con la densidad de genes. Por lo que los cromosomas ricos en genes tienden a agruparse hacia el centro nuclear mientras que los cromosomas que son pobres en genes se ubican preferentemente hacia la periferia. La posición de los genes no es aleatoria entre sí, lo que es funcionalmente importante para comprender la transformación cancerosa (Meaburn et al., 2007).

Existe una fuerte correlación entre la proximidad espacial de los cromosomas/genes en los núcleos en interfase y las frecuencias de translocación, por lo que los cromosomas o genes más proximales experimentan eventos de translocación con mayor frecuencia que la región del genoma ubicada distante. Estudios realizados en la arquitectura nuclear de las células de la medula ósea han revelado que los cromosomas 8 y 21 tienden a colocarse juntos en el núcleo en lugar de separarse, promoviendo así la t(8;21) observada en la leucemia mieloide aguda del subtipo M2 (Weckerle et al., 2011).

Alteraciones cromosómicas en leucemia aguda infantil

La leucemia aguda infantil se caracteriza por presentar alteraciones cromosómicas de forma recurrente, estas incluyen alta hiperdiploidía (ganancia de por lo menos 5 cromosomas), hipodiploidia (<44 cromosomas) y amplificaciones intracromosomales que se encuentran relacionadas a la carga de oncogenes, o bien las estructurales como: inversiones, deleciones y translocaciones que generan genes de fusión. La identificación de estas alteraciones son primordiales ya que establecen el grupo genético de cada tipo de leucemia, el riesgo y potencialmente la elección terapéutica (Malard & Mohty, 2020).

Existen dos subtipos de LA cómo se mencionó anteriormente, las cuales se clasifican según el linaje celular afectado, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloide aguda (LMA) las cuales se describirán con mayor detalle a continuación.

Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La leucemia linfoblástica aguda representa un grupo de entidades oncológicas hematológicas de rápida evolución, clínica y biológicamente heterogéneas, caracterizadas por una proliferación descontrolada de células progenitoras hematopoyéticas de linajes de linfocitos B y T inmaduros en la medula ósea, en la sangre y en ocasiones existe infiltración a otros tejidos (S. Jiménez et al., 2017).

Existen diversos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la LLA, como lo son: el peso elevado al nacimiento, exposición a plaguicidas, productos químicos, radiación ionizante durante el embarazo, tabaquismo o alcoholismo de los padres, la dieta materna durante el embarazo, la exposición prenatal a solventes, infecciones víricas (Virus de la leucemia humana de células T- tipo I) y síndromes genéticos por ejemplo: el síndrome de Down, ataxia-telangiectasia, síndrome de Li-Fraumene, etc. (Valencia et al., 2021).

Otro factor que aumentan el riesgo de padecer LLA es la presencia de polimorfismos de genes específicos, entre los que destacan los genes ARDI5B, CEBPE, GATA3 y IKZF1. Asimismo la aparición de mutaciones en genes supresores de tumor como p53, PAX5 y ETV6 (Valencia et al., 2021).

Las manifestaciones clínicas más comunes que se presentan en los pacientes con LLA son fiebre, infecciones graves secundarias por la presencia de neutropenia, fatiga, anemia, hemorragias, dolor óseo o articular, petequias y equimosis. En etapas clínicas más graves se observa disnea,

hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatías, infiltración al mediastino y al testículo (Jiménez et al., 2017; Mancero et al., 2020).

De acuerdo al Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), la LLA se clasifica en L1, L2 y L3, con base en las características morfológicas de los linfoblastos como se observa en la **Tabla 1**. El subtipo L1, es el subtipo más común presente del 80 al 85% de los casos y se asocia a un mejor pronóstico, mientras que el subtipo L2 representa el 15% de los casos y sólo el 1-2% de los pacientes muestra una morfología L3 (Dorantes et al., 2012; Tasian & Hunger, 2017).

Tabla 1. Clasificación FAB de LLA

Característica	L1- Leucemia linfoblástica típica	L2- Leucemia linfoblástica atípica	L3- Leucemia similar al linfoma de Burkit
Tamaño celular	Pequeño	Moderado heterogéneo	Moderado homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Heterogénea	Homogéneo
Contorno nuclear	Regular	Irregular, indentaciones	Regular, redondo-oval
Nucléolos	No visible	Visible	Evidente
Citoplasma	Escaso	Variable, abundante	Moderado, abundante
Basofilia citoplasmática	Ligera a moderada	Variable	Intensa

(Ladines et al., 2016)

Sin embargo, la clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2016, se basa además en realizar pruebas citogenéticas (aneuploidía), de inmunofenotipo (expresión de antígenos) y biología molecular (alteraciones cromosómicas) que permiten recabar más información y logrando tener un diagnóstico más preciso (Arber et al., 2016).

La clasificación inmunofenotipica subclasifica en linaje B o T de acuerdo con la expresión de los antígenos CD's (Cluster of Differentiation). Alrededor del 80-85% presenta linaje pre-B, 15% linaje T y solo 1-2% B madura (Dorantes et al., 2012; Tasian & Hunger, 2017).

En un estudio llevado a cabo por Jiménez et. al. 2017, identificarón que en las leucemias pediátricas de linaje de células B, las translocaciones t(12;21) (TEL-AML / ETV6-RUNX1), t(1;19) (E2A-PBX1 / TCF3-PBX1) y t(9;22) (BCR-ABL) y las fusiones que involucran al gen MLL (principalmente MLL-AF4) son las anomalías genéticas mejor caracterizadas y de mayor frecuencia. En promedio, ETV6-RUNX1 se ha reportado en el 25% de los casos, seguido por TCF3-PBX1 (13%), BCR-ABL (3-5%) y KMT2A-AFF1 (6.0%). En pacientes mexicanos, las primeras tres alteraciones son las más comunes y

constituyen alrededor del 17.7 al 28.8% de las anomalías genéticas (S. Jiménez et al., 2017). Por otro lado, en la LLA-T la alteración cromosómica más común es la fusión de los genes TAL1-STIL en aproximadamente 30% de los casos (D'Angio et al., 2015).

Alteraciones cromosómicas en leucemia linfoblástica aguda

t(1;19)(q23;p13)

La translocación t(1;19)(q23;p13) es el resultado de la fusión de los genes TCF3 que se encuentra en 19p13 y PBX1 localizado en 1q23. Esta fusión codifica una proteína que contiene la transactivación del dominio de TCF3 y el homeodominio de unión al DNA de PBX1 (Kulis et al., 2022; Yuki et al., 2004).

La fusión de estos genes frecuentemente ocurre de un 5 a 10% de los pacientes pediátricos y 3.8% de los adultos con LLA-B. Con una supervivencia de 5 años libre de eventos observada en aproximadamente el 85%. Inicialmente estaba asociada con un mal pronóstico, pero con las terapias recientes ha mejorado el pronóstico del paciente (Kulis et al., 2022; Salim et al., 2022).

TCF3 codifica una proteína reguladora del desarrollo y maduración de las células B. Esta proteína se requiere para el compromiso de progenitores linfoides con el linaje de células B y es esencial para la reorganización del gen Ig (re-arreglo VDJ), el cual es considerado un paso importante en el desarrollo temprano de células B. Además, este gen forma parte fundamental para la formación y función de diferentes tipos de células B maduras y células plasmáticas, ya que también regula la expresión de varios factores importantes en el desarrollo linfoide (Wöhner et al., 2016).

Debido a la amplia variedad de funciones que desempeña TCF3 en la dirección de la diferenciación y activación de linfocitos, probablemente esto contribuya a su capacidad para transformar células cuando se expresa como parte de la oncoproteína TCF3-PBX1 (Aspland et al., 2001).

t(12;21)(q13;p22)

La translocación t(12;21)(p13;q22) que codifica el gen de fusión ETV6/RUNX1 es la anomalía más común detectada en el 20-25% de los casos de LLA infantil. La supervivencia libre de eventos (SLE) de los pacientes con LLA infantil después del tratamiento de primera línea es de aproximadamente

de un 80%, en el caso de pacientes que presentan esta alteración cromosómica tiene un pronóstico más favorable de SLE con un 90% (Zakaria et al., 2017).

El gen ETV6 codifica los factores de transcripción de la familia ETS que intervienen en el crecimiento y diferenciación de los diversos tipos celulares implicados en la hematopoyesis y la formación de redes vasculares. Por otra parte, el gen RUNX1 codifica un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la diferenciación celular. Cuando se genera la fusión de estos dos genes se interrumpe el desarrollo normal de las células hematopoyéticas y diferenciación de linfocitos B, lo que conduce a un aumento de progenitores de células B (Akbari et al., 2020).

La proteína quimérica creada por la fusión ETV6/RUNX1 puede aumentar la actividad del promotor MDM2, el cual tiene la función de regulador negativo de P53, cuya supresión de su señalización es crucial en el desarrollo de supervivencia de células leucémicas (Sun et al., 2017).

Análisis retrospectivos estudiados en gemelos idénticos han mostrado que el origen del clon pre-leucémico de la fusión de los genes ETV6/RUNX1 se originan en el periodo prenatal en el útero. Esta fusión de genes es el primer paso para la transformación de células normales en células malignas. Pero para desarrollar la leucemia son necesarios de eventos genéticos postnatales adicionales. El análisis de diversos estudios para el diagnóstico de la fusión ETV6/RUNX1 con la técnica hibridación de fluorescencia in situ (FISH), ha mostrado que aparte de encontrar la fusión de estos genes presentes en las células leucémicas. El segundo evento genético era que presentaban en la mayoría de los casos es una deleción subclonal del alelo ETV6 “normal”. Esta anormalidad ocurre aproximadamente en el 73% de los casos con t(12;21)(p13;q22). ETV6 puede funcionar como supresor de tumores, la dimerización de ETV6/RUNX1 puede reducir su actividad transformadora (Ford & Greaves, 2017).

Los pacientes con esta alteración cromosómica tienen en promedio 3.5% de alteraciones del número de copias (rango 0-14). Entre estas alteraciones, varias son deleciones recurrentes en genes como CDKN2A, PAX5, BTG1, TBLXR1, RAG1, RAG2 que controlan el linaje de células B.

La deleción de 12p es la anormalidad más común (39%) cuyo resultado patogénico más importante es la pérdida del alelo ETV6 de tipo silvestre. Mientras que la deleción de 9p se puede observar en el 25% de los pacientes con la fusión ETV6/RUNX1, normalmente afectando al supresor de tumores CDKN2A/CDKN2B y al regulador de diferenciación de células B, PAX5. La pérdida de PAX5, EBF1 y TCF3 puede iniciar una producción dañada de células B maduras (Sun et al., 2017).

El genoma de esta fusión ha sido caracterizado con un gran número de alteraciones genéticas secundarias, por ejemplo, en un estudio realizado por Papaemmanuil et al. 2014 se analizó la secuenciación del genoma completo de la fusión para examinar los eventos secundarios asociados con la transformación leucémica y encontró que la actividad aberrante de la recombinada RAG contribuye de manera crítica a los eventos secundarios (Papaemmanuil et al., 2014).

Del(1)(p32)

La deleción del gen TAL1 en la región 1p32, es la alteración cromosómica más común con aproximadamente 30% de los casos en la LLA de células T (LLA-T). Esta deleción intersticial submicroscópica (90 kb) se forma entre la región no traducida (UTR) 5' de los genes TAL1-STIL o en mutaciones no codificantes que conducen a un potenciador de novo a estimular la expresión del gen TAL1. La LLA-T está asociada al 15% de los casos en niños y al 25% de los casos en adultos, teniendo un pronóstico desfavorable (D'Angio et al., 2015; Thielemans et al., 2022).

El gen TAL1 genera el factor de transcripción TAL1, el cual controla tanto los procesos comunes de las CMH (regulación del ciclo celular, proliferación, apoptosis), así como los procesos específicos de las células eritroides (procesos redox, organización del citoesqueleto, etc.) que es indirectamente indicativo de su multifuncionalidad (Vagapova et al., 2018).

Los cambios dinámicos en la expresión del gen TAL1 sugieren que el factor TAL1 demuestra una actividad diferente en las células durante la elección inicial de la dirección de diferenciación y la formación de células sanguíneas maduras. En las CMH, células progenitoras mieloides y de linaje eritro-megacariocitico es donde se expresa el gen TAL1, en las células progenitoras linfoides (eosinófilos, macrófagos y neutrófilos) se expresa en niveles bajos y en células T y B maduras ya no se expresa. Este gen TAL1 está directamente relacionada con su capacidad para formar complejos de múltiples componentes en las regiones reguladoras del gen objetivo (Vagapova et al., 2018).

El gen TAL1 pertenece a la familia de los factores de transcripción que poseen un motivo hélix-loop-helix (bHLH) de clase II, este factor puede formar heterodímeros con las proteínas bHLH de clase I, denominadas proteínas E (E2A, HEB y E2-2), las cuales se unen al motivo E-box. Juntos el Factor TAL1 y las proteínas E forman un complejo con otros factores de transcripción, incluidos LMO (LMO1 o LMO2), GATA (GATA1, GATA2 o GATA3), RUNX1 y LDB1. Este complejo formado por TAL1, regula la actividad de ciertas vías de señalización durante la diferenciación hematopoyética (Tan et al., 2019).

Por otro lado, el silenciamiento de los genes TAL 1 y LMO2, permite generar la formación de dímeros de proteína E, los cuales regulan los genes necesarios para la diferenciación de células T, como RAG1, RAG2 y PTCRA. Por lo que, la regularización especifica de los factores de transcripción de la familia bHLH es fundamental para el desarrollo normal de las células T al cambiar el programa transcripcional (Tan et al., 2019).

El aumento de la actividad del gen TAL1 en las células T da como resultado una mayor vida útil de las células linfoides en forma de timocitos inmaduros y es considerado un evento inicial para el desarrollo de la LLA-T (Vagapova et al., 2018).

La fusión SIL-TAL1 es un reordenamiento mediados por RAG que se encuentra exclusivamente en la LLA-T, lo que conduce a una sobreexpresión aberrante de la proteína TAL1 (Wang et al., 2013). Además de esta anomalía Mansour et al. y Navarro et al. 2019 descubrieron recientemente mutaciones somáticas heterocigóticas dentro de un elemento intergenico no codificante antes del sitio de inicio de la transcripción TAL1, que induce un motivo de unión a MYB y genera un nuevo potenciador que impulsa la expresión de TAL1, llamado MuTE (Tan et al., 2019).

t(4;11)(q21;p23)

La LLA-B causada por la fusión de los genes KMT2A/AFF1, se encuentra en 5% de niños con LLA. Este reordenamiento se caracteriza por tener hiperleucocitosis, un comportamiento con recaída temprana, una incidencia alta de compromiso del sistema nervioso central (SNC) y mal pronóstico debido a las altas tasas de recaída (Chaer et al., 2020). En general, a corta edad y con un conteo leucocitario alto están asociados a resultados desfavorables en los pacientes diagnosticados con leucemia; pero la presencia de infiltración a SNC, mutaciones en RAS, altos niveles de FLT3, y bajos niveles de HOX-A se han reportado como factores negativos en el pronóstico relacionado con la t(4;11)(q21;q23) (Sanjuan-Pla et al., 2015).

Las leucemias con re-arreglos de KMT2A normalmente tienen activadas mutaciones en FLT3 y alrededor del 50% de los casos tienen anormalidades cromosómicas adicionales. Éste tipo de leucemia está caracterizada por una incontrolada expansión de precursores de células B inmaduras dentro de la médula ósea (Bueno et al., 2011).

El gen de la histona lisina K-metiltrasferasa 2 A (KMT2A), presente en la región cromosómica 11q23, codifica un coactivador transcripcional que forma un complejo con proteínas adicionales que

conduce a la metilación de su histona 4 (H3SK4), la cual promueve la accesibilidad y la transcripción del genoma (Rao & Dou, 2015). Este gen es importante para la hematopoyesis normal y participa en la regulación de la expresión del gen HOX, el cual es requerido para el desarrollo del sistema hematopoyético (Tandon et al., 2020).

La presencia del re-arreglo MLL ha sido asociada a diferentes factores ambientales, dentro de los cuales se encuentra la dieta de la madre durante el embarazo y el peso del niño al nacer. Investigaciones que se han realizado sobre exposiciones prenatales con esta alteración cromosómica han documentado que los hábitos dietéticos de las madres ricos en bioflavonoides han sido vinculados a rupturas y reordenamientos del locus del gen KMT2A de las células progenitoras hematopoyéticas en el útero, ya que estos actúan como inhibidores de la topoisomerasa II, la cual es una enzima reparadora de DNA altamente expresada durante el desarrollo embrionario (Sanjuan-Pla et al., 2015; Winters & Bernt, 2017).

Existe evidencia convincente de que varias de las translocaciones cromosómicas comunes es decir, MLL/AFF1, ETV6/RUNX1, RUNX/RUNX1T1 que se observan en la leucemia linfoblastica aguda pediátrica a menudo se originan en el útero durante el desarrollo embrionario lo que sugiere que tal reordenación puede surgir en un precursor prehematopoyético mesodérmico/hemangioblasto bipotente capaz de originar linajes tanto hematopoyéticos como endoteliales (Bueno et al., 2011).

t(9;22)(q34;p11)

Esta translocación también conocida como cromosoma filadelfia, resulta en la fusión entre la parte 5’ del gen BCR denominado región de clúster de punto de interrupción, que se encuentra normalmente ubicado en el segmento centromérico del cromosoma 22q11, y la parte 3’ del protooncogén tirosina quinasa Abelson ABL en el telomero del cromosoma 9q34 dando origen a una proteína tirosina quinasa anormal (Al-Achkar et al., 2013; Reckel et al., 2017).

La proteína ABL muestra homología estructural con la familia Src de quinasas, y contiene dominios de tirosina quinasa SH1, SH2 y SH3. Los dominios SH2 y SH3 están involucrados en la interacción proteína-proteína, que regulan la actividad de la tirosina quinasa. Estos dominios representan los componentes básicos que generalmente se encuentran en las proteínas tirosina quinasa y son necesarios para la función de transducción de señales. El dominio SH2 desempeña un papel crucial en la modulación de la activación de la proteína c-ABL por su capacidad para integrar las

interacciones de las diversas proteínas de unión a SH2 que a su vez fosforilan en el marco de la actividad de traducción de señales intracelulares. Los residuos ubicados inmediatamente c-terminal de las fosfotirosinas son responsables de las interacciones dianas de alta afinidad y confieren especificidad entre diferentes proteínas que contienen unión a SH2 (Pane et al., 2002).

BCR es una proteína que se expresa de manera ubicua y aunque se han reconocido múltiples dominios funcionales en su estructura, el rol fisiológico de esta proteína aún sigue siendo incierto. El primer exón del gen codifica un dominio de oligomerización, que está involucrado en la dimerización en espiral de la proteína BCR, un dominio único de serina/treonina quinasa y un dominio de unión a SH2. Esto sugiere un papel de BCR en la transducción de señales. La proteína quimérica resultante de BCR/ABL es una tirosina quinasa que activa la proliferación y diferenciación mieloide (Pane et al., 2002).

Dependiendo de las posiciones del punto de ruptura dentro de los genes BCR y ABL, se generan diferentes isoformas de la proteína. Tres híbridos de genes de fusión BCR-ABL1 codifican las isoformas p190, p210 y p230 de la proteína BCR-ABL1, que tienen una actividad de tirosina quinasa mejorada de forma persistente. Estas quinasas activadas de forma anómala alteran las vías de señalización, lo que provoca una mayor proliferación, detención de la diferenciación y resistencia a la muerte celular (Piedimonte et al., 2019).

El gen de fusión BCR-ABL1 consiste en el extremo 5´ del gen BCR Ubicado en 22q11 y el extremo 3´ del gen ABL1 ubicado en 9q34. Los puntos de ruptura de la translocación generalmente involucran el exón 13 o 14 de BCR, llamado punto de ruptura “major” (M-BCR), el exón 1 de BCR, llamado punto de ruptura “minor“(m-BCR), y el exón 19 de BCR, llamado punto de ruptura “micro” (µ-BCR). Para ABL1, el punto de ruptura siempre involucra la región entre los exones 1b y 2 (Piedimonte et al., 2019).

La isoforma p190 fusiona del exón 1 de BCR y el exón ABL1 2 (e1a2), esta fusión codifica una proteína de 190 KDa la cual se considera que constituye el transcrito de menor tamaño. Se detecta comúnmente en la LLA de células B (LLA-B) y ocasionalmente en LMA, pero rara vez se observa en LMC. Mientras que la p210 tiene una fusión del exón 13 o 14 de BCR y el exón ABL1 2 (e13a2 o e14a2), la fusión codifica una proteína de 210 KDa, constituyen el transcrito principal M-BCR (unión de b2a2p b3a2), se detecta con mayor frecuencia en LMC y ocasionalmente en LLA o LMA. Por ultimo 230 (e19a2), también conocido como transcrito µ -BCR, codifica una proteína hibrida de 230 KDa. Esta se genera por la fusión de casi todo el gen BCR con el gen ABL1 y se considera un marcador

de diagnóstico molecular para la leucemia mieloide crónica neutrofílica (LMC-N) (Li et al., 1999; Reckel et al., 2017).

Aunque las tres isoformas de proteínas quinasas de BCR-ABL tienen una estructura similar, exhiben propiedades distintas. Cuando las células primarias de la medula ósea de ratón son infectadas con las diferentes variantes de BCR-ABL y se cultivan en presencia de citocinas y estroma, los cultivos de p185 se diferencian en un linaje linfoide, mientras que p210 y p230 se vuelven mieloides. In vitro, p185 tiene mayor capacidad para estimular la expansión de las células linfoides, en comparación con p210. Los cultivos p230 BCR-ABL requieren citocinas para un crecimiento optimo, mientras que los cultivos p185 y p210 BCR-ABL son independientes de las citocinas para el crecimiento y la supervivencia (Advani & Pendergast, 2002).

Leucemia mieloide aguda (LMA)

La Leucemia mieloide aguda es un trastorno clonal heterogéneo de las células progenitoras hematopoyéticas de linajes celulares mieloides, eritroides, monociticos y megacariociticos, como resultado de la adquisición de reordenamientos cromosómicos y múltiples mutaciones genéticas (Rubnitz et al., 2010).

Los factores de riesgo relacionados a la LMA son: exposición a sustancias químicas, radiaciones ionizantes, tabaco, retrovirus, tratamiento quimioterápico previo los cuales producen alteraciones en los cromosomas, alteraciones genéticas y patologías hematológicas subyacentes como: anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia telangiectasia o síndrome de Shwachman-Diamond, etc. (Arana et al., 2022).

Otros factores encontrados en pacientes con LMA son alteraciones en la expresión de receptores en la membrana celular en las células tumorales como RAS (proto-oncogen con función de proteína G), y mutaciones en los receptores de la tirosina quinasa, es decir, los encargados del control de la proliferación y sobrevivencia celular: el FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) y c-KIT así como aumento en la expresión de otros genes de la familia homeobox (HOX) (Aguilar et al., 2010).

Los diversos factores genotóxicos o leucemogénicos generan alteraciones moleculares implicadas en la patogénesis que cambian o interrumpen muchas de las facetas de la transformación celular, como la regulación de la proliferación y la diferenciación celular, la autorrenovación, la

supervivencia, la regulación del control del ciclo celular, la reparación del DNA y la diseminación celular (Leyton, 2018).

Los pacientes con LMA presentan síntomas relacionados con complicaciones de citopenias, palidez, astenia, fiebre, debilidad, hemorragias, como: gingivorragia, equimosis, epistaxis o metrorragia, infiltración gingival característica del componente monocitoide, coagulación intravascular diseminada, síntomas neurológicos secundarios a infiltración a sistema nervioso central, afectación de la piel (sarcomas mieloides) y dolor óseo (Arana et al., 2022).

Los síntomas de pacientes con LMA son similares a los síntomas de pacientes con la LLA, pero se ha encontrado que los pacientes con LMA, tienden a presentar mayor conteo de leucocitos e incidencia de infecciones y no es muy común que presenten linfadenopatía y hepatoesplenomegalia (Seth & Singh, 2015).

La clasificación de la LMA por la Asociación Franco-Américo-Británica (FAB) se fundamenta en diferenciar entre ocho subtipos de acuerdo con las características morfológicas del tipo de células y la madurez de las mismas como se observa en la **Tabla 2**. Los subtipos de la LMA se pueden clasificar en M0-M5 que indican formas inmaduras de glóbulos blancos. El subtipo M6 deriva de formas inmaduras de glóbulos rojos, mientras que M7 se inicia de células inmaduras que producen plaquetas (Leyton, 2018).

Tabla 2. Clasificación FAB de la LMA

Subtipo	Nombre
M0	Leucemia mieloide aguda sin diferenciación
M1	Leucemia mieloide aguda con diferenciación mínima
M2	Leucemia mieloide aguda con diferenciación
M3	Leucemia promielocítica aguda hipergranular
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4eos	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

(Arana et al., 2022)

En el 2016 la OMS incorporo en la clasificación de la LMA diversos elementos como características clínicas, información genética, morfológica e inmunofenotipo, lo cual permitiría tener un diagnóstico certero (Arber et al., 2016). Con base en la clasificación de la FAB, y la implementación de la OMS de estos elementos encontraron que la morfología está asociada a algunas alteraciones cromosómicas. Las mejor caracterizadas y de mayor frecuencia son: la M2 asociada con la translocación t(8;21), la M3 con la t(15;17) y M4e con la inv(16)(p13.1q22) (Klein et al., 2017; Ladines et al., 2016).

Alteraciones cromosómicas en leucemia mieloide aguda

t(15;17)(q24;p21)

La leucemia promielocítica aguda (LPA) se caracteriza por presentar un reordenamiento en el cual el gen RARα (17q21.2) se rompe en el extremo 5' y se fusiona con el extremo 3' del gen PML (15q24.1), formándose así el gen fusión PML/RARα (A. C. Pérez et al., 2019). El sello genético de la LPA es la translocación cromosómica equilibrada característica entre los cromosomas 15 y 17 t(15;17)(q24;q21) (Mannan et al., 2020).

La LPA representa del 10% al 15% de las leucemias mieloides agudas. Se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación en el que las células leucémicas se detienen en una etapa distinta de la maduración celular, específicamente la etapa de promielocitos (Jimenez et al., 2020).

En células normales, el receptor de ácido retinoico alfa (RARA) forma un heterodímero con otra forma de una proteína receptora de la hormona celular llamada receptor de retinoide X (RXR). Juntos, el heterodímero RARα-RXR se une a regiones de DNA denominadas elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) para mediar en la transcripción de cientos de genes. Muchos de los RARE están involucrados en la auto-renovación y diferenciación. Cuando se une el ácido retinoico al dominio de unión al ligando de RARA desencadena un cambio conformacional, lo que permite que el complejo proteico libere correpresores y comience a reclutar coactivadores, para posteriormente, producir la remodelación de la cromatina, junto con el reclutamiento de la maquinaria transcripcional que conduce a la expresión génica. Pero si exististe la fusión de PML y RARα, en ausencia de la unión del ligando con su receptor del ácido retinoico, ocasiona que el complejo proteico heterodímero interrumpa el reclutamiento de coactivadores y reclute en vez de ello a correpresores como proteínas, enzimas e histonas desacetilasas (HDAC) involucrados en la represión transcripcional (Jimenez et al., 2020).

La proteína fusión PML-RARA también interrumpe le formación de cuerpos nucleares de PML, un proceso que se ha implicado en la transformación de células LPA. Los cuerpos nucleares de PML son dominios en forma de esfera que se localizan en la matriz nuclear y se sabe que están involucrados en muchas funciones asociadas con el núcleo, como el silenciamiento epigenético, la transcripción y la replicación. Los dominios nucleares de PML también modulan la señalización de p53, así como la senescencia, posiblemente a través de su capacidad para controlar la sumoilación y la proteólisis (Jimenez et al., 2020).

Existen tres posibles transcriptos de PML/RARA, o isoformas, que pueden producirse dependiendo de la ruptura genómica de la región de corte (rc) de PML. Mientras que la ruptura del cromosoma 17 es consecuentemente localizada dentro del intrón 2 de RARA, la ruptura dentro de PML puede ser variable e involucrar tanto el intrón 6 (rc1) que produce la isoforma larga (L), exón 6 (rc2) la isoforma variante (V), o el intrón 3 (rc3) la 23 isoforma corta (S). El transcripto de rc3 ha sido reportado presentar mayor frecuencia en niños que en adultos. RARA es consecuentemente involucrada soportando su papel en la patogénesis de LPA, que ha sido implicada en la regulación en el desarrollo, diferenciación, apoptosis y granulopoyesis (Ghaoui et al., 2018).

Los pacientes con LPA se pueden clasificar según el riesgo en tres grupos: bajo, intermedio y alto según su recuento de glóbulos blancos. Los subconjuntos bajo e intermedio pueden agruparse y se definen por un recuento de glóbulos blancos de menos de 10,000/ µL. Mientras que los pacientes de alto riesgo se definen por tener un recuento de glóbulos blancos por encima de 10,000/µL (J. Jiménez et al., 2020), además de que presentan mutaciones somáticas de FLT3 y la isoforma corta (S) PML/RARA. FLT3, la duplicación interna en tándem (ITD) o el dominio tirosina quinasa (TKD) activan mutaciones que son frecuentes cambios secundarios en LMA asociados a una reducida supervivencia. En LPA se ha asociado más específicamente con altos conteos de células blancas, morfología microgranular variante, transcrito rc3 y una mayor presencia de eventos trombótico (Ghaoui et al., 2018).

La proteína quimérica producto de la fusión PML/RARA ocasiona un bloqueo en la maduración a nivel del promielocito en la diferenciación mieloide. La terapia con el ácido transretinoico (ATRA) sola o en combinación con quimioterapia ha mostrado un gran avance en el tratamiento de LPA. El ATRA puede aliviar rápidamente la CID induciendo la diferenciación de las células leucémicas (Imagawa, 2018).

inv(16)(p13;q22)

Los puntos de ruptura involucrados en la inversión 16 involucran el gen del factor de unión central β (CBFβ, también conocido como PEBP2/CBF) en 16q22 y el gen de la cadena pesada de miosina del musculo liso (MYHII) en 16p13. La translocación involucra los mismos puntos de ruptura en los brazos largos y cortos del homólogo del cromosoma 16 (Eghtedar et al., 2012).

CBFβ es un factor de transcripción heterodimérico compuesto por subunidades: una subunidad CBFβ y tres subunidades CBFα (CBFα1, CBFα2 también conocida como RUNX1 y CBFα3). Estas subunidades codifican el llamado dominio runt, que se requiere tanto para la unión al DNA como para la interacción con CBFβ. El producto de fusión de inv(16)(p13q22) bloquea la diferenciación hematopoyética de forma negativa dominante al inhibir la función normal del complejo de transcripción CBF (Reilly, 2005; Weckerle et al., 2011).

CBF regula el desarrollo óseo y la transcripción de un gran número de genes hematopoyéticos específicos, incluidos los receptores de la superficie celular, como las subunidades del receptor de antígeno de las células T y el receptor del factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF), enzimas mieloides asociadas, como la mieloperoxidasa y granzima B, y citocinas, incluidas la interleucina 3 (IL-3) y estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Los re-arreglos cromosómicos que involucran el complejo CBF, son los comúnmente observados en casi 30% de pacientes con LMA (Reilly, 2005).

Inicialmente, la estratificación de la leucemia estaba basada en la citomorfología y el inmunofenotipo de los blastos en proliferación de acuerdo con la French-American-British (FAB). La leucemia mielomonocítica aguda, de acuerdo con esta clasificación, es la M4. Actualmente los pacientes de leucemia con esta alteración cromosómica son clasificados por la OMS en base a su citogenética y biología molecular, como pacientes con inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13.1q22) que son un subgrupo con un pronóstico favorable y pacientes con M4eo (LMA-M4 con eosinofilia) que tiene una presencia adicional de 5% o más de eosinófilos atípicos. Esta morfología es indicativa a una patogenia diferente en comparación con la LMA-M4 sin eosinofilia, por lo que se ha sugerido que la expresión de CD2 y CD58 estimula la proliferación de estas células leucémicas, la cual está relacionada a características clínicas únicas y biológicas de M4eo (Klein et al., 2017).

t(8;21)(q22;p22)

La translocación t(8;21) (q22;q22) se genera mediante la fusión de dos genes AML1 (también llamado RUNX1) del cromosoma 21 y ETO (también llamado RUNX1T1 gen que codifica la proteína CBFA2T1) del cromosoma 8 (Bruserud et al., 2011).

RUNX1 es un factor de transcripción crucial para la diferenciación hematopoyética, y se une a potenciadores y promotores a través de su dominio corto amino terminal. Este dominio también está presente en la proteína de fusión RUNX1- RUNX1T1 por lo tanto, pueden unirse a los promotores del gen diana RUNX1. Sin embargo, aunque la proteína de fusión tiene similitudes de unión con RUNX1, provoca una activación transcripcional alterada y tiene otra localización subnuclear de la transcripción normal del factor RUNX1. La proteína codifica por RUNX1T1 referida como CBFA2T es también una proteína nuclear y funciona como un represor transcripcional a través de su unión a ambas histonas desacetilasas y factores de transcripción (Dowdy et al., 2010). Se ha demostrado que RUNX1/RUNX1T1 reprime la expresión de supresor de tumores p14ARF, el cual es normalmente activado por RUNX1 (Hyde & Liu, 2010).

La proteína de fusión no contiene el aminoácido 31 N-terminal. El dominio NHR-2 es importante para homodimerización e interacciones con componentes de los complejos represores y parece ser responsable de la movilidad intracelular reducida de la proteína fusión. Por lo tanto, el resultado final de esta combinación a menudo será unirse a los promotores del gen diana RUNX1 dando como resultado represión. Además, la proteína de fusión está dirigida a microambientes nucleares distintos de aquellos en los que la molécula RUNX1 reside y, por esta razón, es posible que no se unan a todos los objetivos RUNX1. La proteína fusión también se colocaliza con el factor de unión central beta (CBFβ) dentro del núcleo. Esta colocalización resulta en una movilidad intracelular reducida de CBFβ que probablemente altere la diferenciación mieloide (Bruserud et al., 2011).

Diagnóstico

El enfoque patológico actual para el diagnóstico de la leucemia aguda es multifacético que involucra morfología, citoquímica, citogenética, inmunofenotipo y estudios de diagnóstico molecular. Cada uno de estos componentes es fundamental para una evaluación diagnostica adecuada, que conlleva a un pronóstico del desarrollo de la LA y ayuda a tomar decisiones terapéuticas basadas en su clasificación (Salto et al., 2003).

Citogenética clásica o convencional

La citogenética clásica o convencional estudia microscópicamente los cromosomas para identificar anormalidades estructurales (reordenamientos, inversiones, deleciones) o numéricas (monosomías y trisomías).

La citogenética es una herramienta insustituible tanto en los estudios prenatales, postnatales así como en investigaciones relacionadas al cáncer. Se utiliza para el diagnóstico de enfermedades genéticas de origen cromosómico. Permite la detección de patologías cromosómicas asociadas a retardo mental, malformaciones congénitas múltiples y enfermedades de origen hemato-oncológicos (Rosado et al., 2012).

El estudio citogenético, es un procedimiento estándar, comenzando por la extracción de la muestra de sangre periférica, seguido de un cultivo celular de leucocitos en medios especiales con un mitógeno que estimula la proliferación celular y después de determinado tiempo se agrega un compuesto químico como la colchicina que detiene la división celular en metafase. Posteriormente se realiza la "cosecha" que consiste en el procesamiento de la muestra con una solución hipotónica, sucesivos lavados con fijadores, hasta la obtención de un extendido, el cual es sometido a distintas técnicas de tinción (Torres, 2018).

En primer lugar, directamente con el colorante de Giemsa para su tinción convencional, con esta técnica se realiza un recuento para determinar el número de cromosomas del paciente. Normalmente se observan 20 a 30 metafases. Con esta tinción no es posible la identificación individual de cada cromosoma, por grupo y se puede llegar hasta la determinación del sexo. En segundo lugar, se tratan los preparados con técnicas de Bandeo G, con la cual se logran visualizar anomalías visibles al microscopio óptico (Torres, 2018).

Finalmente, para la obtención del resultado del paciente, se realiza el cariotipo. El cual consiste en agrupar a los cromosomas en pares, a través de un software llamado Spectral Imaging, que constituye un soporte informático adecuado. Además de los linfocitos de sangre periférica, la otra muestra que se cultiva es la médula ósea para el diagnóstico de enfermedades hemato-oncológicas, el procesamiento de esta es similar al de linfocitos, con algunos cambios principalmente en el tiempo de cultivo (Torres, 2018). Aunque esta técnica es una herramienta valiosa para el diagnóstico y pronóstico de LA, también presenta algunas limitaciones como la falta de sensibilidad a mutaciones, el tiempo de análisis generalmente es alto, requieren expertiz del analista, además de ser muy sensible a interferencias por tratamientos quimioterapéuticos.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Hibridación fluorescente *in situ* (*in situ* significa «en ese lugar») es una técnica citogenética molecular que sirve para identificar la localización cromosómica de un gen de interés (Palma, 2010).

La metodología FISH se basa en la complementariedad de las dos cadenas de DNA de doble hélice. En primer lugar, la muestra de DNA, ya sean cromosomas en metafase o núcleos en interfase, se desnaturalizan, posteriormente se le añade la sonda de interés marcada con un fluoróforo que se asocia al DNA de la muestra en el sitio diana, medante el proceso denominado hibridación. Se vuelve a formar la doble hélice. La señal emitida por la sonda se observa en un microscopio de fluorescencia y así la muestra se clasifica según la presencia o ausencia de la señal (Torres, 2018).

Esta técnica sirve para la detección e identificación rápida de aneuploidías, en células en metafase para la detección de síndromes de microdeleción, rearreglos cromosómicos, microdeleciones, microduplicaciones, identificar un material adicional de origen desconocido, caracterización de reordenamientos cromosómicos poco marcados e identificación de marcadores cromosómicos que no pueden identificarse mediante las técnicas citogenéticas clásicas (Torres, 2018). Al igual que con el Cariotipo, FISH tiene limitaciones similares, añadiendo que es una técnica más costosa que limita la accesibilidad para algunos pacientes.

Citometría de Flujo

Con la citometría de flujo se identifican y caracterizan fenotípicamente poblaciones de células heterogéneas, combinando el carácter cuantitativo de los métodos bioquímicos, con la capacidad multiparamétrica del análisis microscópico de células individuales en una sola técnica, que permite realizar un estudio celular a velocidades rápidas con alta precisión y sensibilidad (Muirhead et al., 1985). En esta técnica el equipo está compuesto de una fuente de luz que es un láser, una cámara de muestra, un conjunto óptico de fotodetectores, un procesador para convertir señales de luz en impulsos eléctricos que después se convertirán en señales digitales en donde un sistema informático almacena y analiza los datos obtenidos (Ramírez Orellana, 2012).

Las células problema son introducidas en el centro de una corriente de fluido de movimiento rápido y forzado a fluir en fila. Estas células estan restringidas hidrodinámicamente al centro de la corriente por una capa circundante de fluido envolvente. Cuando una de las células en la corriente de flujo pasa a través del haz de luz, la luz que ilumina es dispersado elásticamente por la célula y la intensidad de dispersión de diferentes ángulos proporcionan información acerca del tamaño, forma, viabilidad, densidad y la morfología de la superficie de la célula (Macey, 2007).

Se producen dos tipos de dispersión de luz denominadas dispersión frontal (Forward scatter, FSC) y dispersión lateral (Side scatter, SSC). Los factores que afectan la dispersión total de luz incluyen la membrana, el núcleo, la granularidad de la célula, la forma de la célula y la topografía de la superficie. Generalmente, el tamaño de una celda o partícula y su complejidad interna especifican el tipo de dispersión. La luz FSC es el resultado de difracción recolectada a lo largo del mismo eje que el rayo láser. FSC es proporcional al área o tamaño de la superficie celular y es adecuado para detectar partículas mayores a un tamaño dado que lo hace el método más utilizado para el inmunofenotipo. Por otro lado, la luz SSC es principalmente una medida de luz refractada y reflejada, que se recoge aproximadamente a 90° del rayo láser. SSC es proporcional a la granularidad celular o complejidad interna tan importante como la luz fluorescente derivada de anticuerpos marcados con fluorescencia o colorantes que se reflejan en el mismo ángulo que SSC. Para diferenciar los tipos de células en una población heterogénea, se pueden usar mediciones correlacionando de FCS y SSC (Adan et al., 2017; Muirhead et al., 1985).

En una muestra de sangre, los linfocitos tienen un FSC baja y normalmente se pueden distinguir de los granulocitos más grandes con una FSC más alta, mientras que los monocitos muestran un valor de FSC intermedio (Adan et al., 2017; Muirhead et al., 1985).

El marcaje celular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y clasificar poblaciones específicas de células. Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser. De este modo, la célula se "tiñe" y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador (Pérez et al., 2018).

La luz fluorescente que emiten las células es monitoreada por un detector óptico ubicado ortogonalmente al haz de iluminación. Las emisiones de varios fluorocromos diferentes se pueden cuantificar por separado en la misma celda mediante el uso de una serie de filtros y espejos dicroicos de división de haz que seleccionan las longitudes de onda apropiadas (Adan et al., 2017).

Hoy en día, se cuenta con una gran cantidad de anticuerpos acoplados a fluorocromos que cuando son excitados, emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Ello permite estudiar diversas poblaciones celulares a la vez (Pérez et al., 2018).

La citometría de flujo caracterizo la hematopoyesis normal por la adquisición precisa de combinaciones de antígenos en diferentes etapas de maduración. En las leucemias reflejaban un patrón diferente, donde las células leucémicas muestran invariablemente ciertos fenotipos aberrante distintos, y estas anormalidades son particularmente útiles para la caracterización precisa de la enfermedad maligna. Se ha demostrado que muchos de estos patrones patológicos se correlacionan con anomalías moleculares y, además, pueden servir con marcadores únicos para ayudar a identificar la enfermedad mínima residual (Weir & Borowitz, 2001).

El análisis de la LA por citometría de flujo es interpretativo, combinando los patrones y la intensidad de la expresión del antígeno para llegar a un diagnóstico definitivo. Este análisis determina la naturaleza, origen y comportamiento de las células, además de categorizar a la población celular mediante el análisis del tamaño celular, complejo y granularidad en relación con la expresión de antígenos de superficie, citoplasma y nucleares (Muirhead et al., 1985).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia deseada es copiada fielmente. Para poder realizar la reacción se requiere de componentes fundamentales que son: el material genético a amplificar (DNA o RNA), la enzima DNA polimerasa, los oligonucleótidos, dNTP´s, el ion magnesio (Mg^{2+}), una solución amortiguadora o buffer y agua destilada (Tamay de Dios et al., 2013).

El DNA o RNA molde contiene la región que se va a amplificar. En caso de utilizar RNA primero es transformado en cDNA mediante transcripción reversa.

La DNA o RNA polimerasa es una enzima termoestable aislada de organismos termófilos, de calidad suficiente que evitan pérdidas en especificidad, eficiencia, fidelidad y rendimiento. Esta se encarga de sintetizar las nuevas cadenas del material genético (Elnifro et al., 2000).

Los oligonucleótidos (cebadores o primers) son secuencias de nucleótidos complementarias al material genético que flanquean y delimitan la secuencia que se desea amplificar. Su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia, debido a que existe la posibilidad de la formación de dímeros de oligonucleótidos, es decir, de productos inespecíficos (Tamay de Dios et al., 2013). Estos oligonucleótidos son diseñados para que hibriden con la secuencia de DNA. Están formados por dos secuencias diferentes denominadas como forward o sentido y otra revers o antisentido.

Los desoxinucleotidos trifosfatos (adenina, timina, guanina y citosina) o bases nitrogenadas son nucleótidos que sirven para construir las nuevas cadenas de DNA. Estos contribuyen a la especificidad de la reacción su concentración debe ser adecuada ya que de lo contrario puede afectar la función de la polimerasa (Tamay de Dios et al., 2013).

El ion de magnesio (Mg^{2+}) es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción. Debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la polimerasa (Tamay de Dios et al., 2013). Si existe un exceso en la reacción produce amplificaciones inespecíficas de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción del amplificado.

La solución amortiguadora o buffer mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la polimerasa. El agua es el disolvente en la reacción, por lo tanto, debe ser destilada y de grado de

biología molecular para que se encuentre libre de nucleasas ya que estas enzimas degradan a los ácidos nucleicos.

Los termocicladores son los equipos en donde se realiza la reacción de la PCR. Están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos (Tamay de Dios et al., 2013).

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia de interés se utiliza la técnica de electroforesis en gel de agarosa, para separar y visualizar los fragmentos de DNA basándose en el tamaño.

La agarosa es un material que se aísla de las algas, fundido en una solución amortigudora y vertido en una bandeja de plástico. A medida que se enfría la agarosa, se solidifica formando un gel semisólido horizontal que tiene poros a través de los cuales viajaran los fragmentos de DNA. El porcentaje de agarosa utilizada para crear el gel determina su capacidad para que migren los fragmentos de DNA de diversos tamaños. La mayoría de las aplicaciones suelen usar geles que contienen de 0.5 a 2% de agarosa. Un gel con alto porcentaje de agarosa tiene mejores cualidades para separar pequeños fragmentos de DNA porque se abrirán paso a través de los poros más fácilmente que los fragmentos grandes, que no se separan bien a través de un gel más denso. Para separar grandes fragmentos de DNA es mejor utilizar porcentajes más bajos de agarosa (Palma, 2010).

En un equipo electroforético se coloca el gel y se llena con solución amortiguadora con sales que conducirán la corriente eléctrica. El extremo del gel que tiene los pozos se coloca hacia el electrodo negativo. El extremo sin pozos (hacia donde migrarán los fragmentos de DNA) se coloca hacia el electrodo positivo. Una vez que el gel está en la cámara, cada una de las muestras de DNA se le añade buffer de carga el cual ayuda a controlar la migración durante la electroforesis y se transfiere cuidadosamente a uno de los pozos. Un pozo se reserva para el marcador de peso molecular, un estándar de referencia que contiene fragmentos de DNA de longitudes conocidas. Después se aplica energía eléctrica a la cámara y empieza a fluir corriente a través del gel. Los grupos fosfato de su esqueleto de azúcares-fosfato les otorgan una carga negativa a las moléculas de DNA, cuando se coloca en un campo eléctrico, migra hacia el ánodo o polo positivo y es repelido por el cátodo o polo negativo. Cuando el sistema está encendido y pasa corriente por el gel, se dice que el gel está corriendo. Conforme corre el gel, los fragmentos más cortos de DNA viajarán más rápido a través de los poros de la matriz del gel que los fragmentos más grandes. Después de un rato que ha

corrido el gel, los fragmentos más pequeños de DNA estarán más cerca del extremo positivo del gel y los más grandes se mantendrán cerca de los pozos. Una vez que los fragmentos se han separado, podemos examinar el gel y saber el tamaño de las bandas que se encuentran en él. Cuando se prepara el gel se le coloca bromuro de etidio el cual es un agente intercalante de DNA, al colocarse bajo el transiluminador de luz UV, los fragmentos de DNA brillarán, lo cual nos permite ver el DNA presente en distintos lugares a lo largo del gel. Por ultimo se obtiene un registro permanente del gel fotografiándolo mientras está expuesto a la luz ultravioleta (Palma, 2010).

Características de la PCR

Existen cuatro características importantes que se deben de considerar en una PCR que son: la sensibilidad, especificidad, eficiencia y fidelidad.

Sensibilidad: es la cantidad mínima de DNA necesaria para que se produzca la amplificación, es decir, para obtener una banda. Se relaciona con los falsos negativos, ya que puede que una muestra sea positiva, pero sea dada como negativa porque no se ha amplificado por no tener suficiente cantidad del amplicon (Rossi, 2021).

Especificidad: se refiere a la obtención de un solo producto amplificado. Viene determinada por los oligonucleótidos y la especificidad con la que se unen al DNA molde. De esta forma, si los oligonucleótidos tienen más de un sitio al que se pueden unir aparecerá más de un producto amplificado. Se relaciona con los falsos positivos, ya que puede que una muestra sea negativa, pero sea dada como positiva porque se ha amplificado una región de DNA no diana o que no se buscaba amplificar (Rossi, 2021).

Eficiencia: es la amplificación máxima que se puede obtener en un número determinado de ciclos (Svec et al., 2015).

Fidelidad: La fidelidad es la capacidad de la DNA polimerasa de replicar con exactitud una plantilla deseada. Esta característica a su vez se refiere a los errores que comete la DNA polimerasa durante la amplificación. Una buena fidelidad permite evitar falsos positivos y/o negativos (Pezza et al., 2017).

Etapas

La PCR se lleva a cabo en tres etapas. La primera es la desnaturalización en donde las cadenas de DNA son separadas al elevar la temperatura a 95°C durante 20-30 segundos, provocando que se rompan los puentes de hidrogeno y generando así dos cadenas que servirán como templado para la siguiente etapa. Después sigue la hibridación en donde los oligonucleótidos se unen al extremo 3' de la hebra de DNA e hibridan con su secuencia complementaria. Aquí la temperatura oscila entre 50-60°C. Por último, está la extensión en donde la polimerasa actúa sobre el complejo templado-oligonucleótidos y empieza su función catalítica, agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional (Tamay de Dios et al., 2013).

Variantes

La versatilidad de la técnica de PCR ha dado lugar a un gran número de variantes, en las cuales existen modificaciones en el protocolo de la PCR estándar para lograr el objetivo deseado o pueden preceder y/o seguir otra técnica. En la **Tabla 3** se muestran las principales variantes de la PCR donde explica su fundamento las ventajas y desventajas que tienen utilizar cada técnica y la forma en que se puede ver el resultado. La variante de PCR se elige dependiendo del estudio que se desea realizar. Estas variantes en muchas ocasiones se complementan como es en el caso para el diagnóstico de la LA.

La mayoría de los transcritos de fusión recurrentes generados por una translocación en la LA han demostrado tener un valor pronóstico, debido a que la identificación de estos genes de fusión es necesaria en el proceso de diagnóstico de rutina en la mayoría de los protocolos clínicos avanzados, ya sea, para la estratificación del riesgo para tratamientos específicos y/o marcadores para monitorear la enfermedad mínima residual. La fusión de estos genes generados por las alteraciones cromosómicas puede ser detectadas por la RT-PCR, esta técnica utiliza mRNA para realizar una síntesis de cDNA (Corradi et al., 2008), y posteriormente con ese molde poder amplificar y buscar las alteraciones cromosómicas ya sea a través de una PCR convencional, en PCR en tiempo real, o una PCR anidada.

Para seleccionar que PCR utilizar se analizan las ventajas y desventajas de las variantes que se muestran en la **Tabla 3**. En el caso de realizar una PCR convencional solo se detecta un único

segmento de DNA por lo que se tendrían que realizar una reacción por cada alteración cromosómica, tiene menor sensibilidad y especificidad, pero los equipos y reactivos son menos costosos en comparación con la PCR en tiempo real. La PCR anidada tiene mayor sensibilidad y especificidad, pero existe mayor probabilidad de contaminación además de que requiere más tiempo para dar un resultado.

Se elige con mayor frecuencia realizar la PCR convencional ya que es más accesible económicamente, además existen formas de mejorar esta técnica apoyándose de otras variantes de PCR como los son la PCR multiplex y la PCR Touch Down.

La PCR multiplex optimiza y mejora el proceso de PCR realizando una sola reacción, ya que se pueden amplificar al mismo tiempo 2 o más genes debido a que se agregan a la reacción más de un par de cebadores en un tubo para obtener múltiples amplificaciones. Lo que da como resultado la formación de múltiples productos o también para confirmar la detección precisa de un solo objetivo, en esta se requieren de bajas concentraciones del DNA molde, ahorra dinero y tiempo al dar un resultado rápido (Buckingham, 2019). La PCR Touch Down, que a través del cálculo de la Tm ayuda a optimizar las reacciones sin necesidad de rediseñar los oligonucleótidos, además de mejorar la calidad del amplificado, incrementar el rendimiento y la especificidad (Korbie & Mattick, 2008).

Tabla 3. Variantes de la PCR

Variante	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Resultados
PCR convencional (punto final)	*Reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia deseada es copiada fielmente. El producto amplificado se visualiza mediante una banda, cuya intensidad depende y es proporcional a la cantidad de producto amplificado.	*Equipos y reactivos menos costosos. *Se obtienen resultados rápidos.	*Detecta un único segmento del DNA. *Es semicuantitativa.	*Detección del producto por electroforesis en gel.
RT-PCR	*Retrotranscribe una hebra de RNA en cDNA usando la enzima llamada retrotranscriptasa inversa.	*Permite retrotranscribir una hebra de RNA en DNA complementario lo cual posibilita cuantificar la expresión génica.	*Su complejidad y los problemas asociados con la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad.	*Detección del producto por electroforesis en gel.

Variante	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Resultados
PCR anidada	*Se utilizan dos pares de cebadores para amplificar un solo segmento en dos ejecuciones de PCR separadas.	*Aumenta la sensibilidad: Se detectan cantidades de DNA muy inferiores a las que se detectan con una PCR normal. *Aumenta la especificidad: al utilizar otros dos cebadores internos se aumenta la posibilidad de amplificar solo un tipo de molécula.	*Puede existir contaminación y requiere más tiempo para dar un resultado.	*Detección del producto por electroforesis en gel.
PCR en tiempo real	*Detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción.	*Es semiautomatizada y da un resultado rápido. *Detecta y cuantifica el DNA en un paso. *Tiene mayor sensibilidad y especificidad. *Discriminación de productos inespecíficos con la opción "curvatura de desnaturalización".	*Equipos y reactivos más costosos.	*Detección del producto en cada ciclo de la reacción.
PCR Touch Down	*Mejora la unión del primer a una secuencia objetivo especifica modificando y calculando la Temperatura de fusión en la etapa de alineamiento.	*A través del cálculo de la Tm ayuda a optimizar las reacciones sin necesidad de rediseñar los oligonucleótidos, mejorando la calidad del amplificado, incrementa el rendimiento y la especificidad.	*Se tienen que modificar los programas del termociclador.	*Detección del producto por electroforesis en gel.
PCR multiplex	*En la reacción se agregan más de un par de cebadores para obtener múltiples amplificaciones, lo que da como resultado la formación de múltiples productos o también para confirmar la detección precisa de un solo objetivo.	*En una sola reacción de PCR se amplifican al mismo tiempo 2 o más genes. *Requiere de bajas concentraciones del DNA molde. *Se ahorra en tiempo y reactivos.	*Requiere de una cuidadosa optimización.	*Detección del producto por electroforesis en gel.

(Bolivar et al., 2014; Buckingham, 2019; Korbie & Mattick, 2008; Tamay de Dios et al., 2013)

Comparación de técnicas y su importancia en el diagnóstico de LA

La citogenética, FISH, la citometría de flujo y la PCR son técnicas que se complementa entre si brindando información de suma importancia para la caracterización especifica de la LA.

La citometría de flujo nos permite conocer la clasificación y maduración del linaje celular de la leucemia. Permite al igual que la PCR, detectar la enfermedad mínima residual, aunque no proporciona información sobre rasgos genotípicos que caracterizan algunas leucemias.

Por otra parte, FISH es una técnica más rápida y objetiva que el cariotipo convencional al tener sondas dirigidas hacia la región que se desea buscar. Además de que esta tecnica se puede realizar tanto en metafase como en interfase y el resultado se obtiene al cabo de 24 a 48 horas. La gran desventaja es que se requiere de un microscopio fluorescente para realizar el análisis y los costos son elevados (Torres, 2018).

Con el análisis citogenético convencional se tiene la capacidad para determinar globalmente la presencia de anormalidades, tanto estructurales como numéricas. Aunque los estudios citogenéticos convencionales siguen siendo la piedra angular de las pruebas genéticas, las tecnologías de base molecular se han convertido en una herramienta muy útil para la detección de lesiones genéticas que definen la enfermedad. La mayoría de las translocaciones, cuando se evalúan a nivel molecular, se detectan mediante la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) como parte del diagnóstico de rutina. La detección por RT-PCR de las principales translocaciones de leucemia tiene numerosas ventajas sobre la citogenética convencional, incluido un tiempo de respuesta más corto, no se requiere proiferación celular, detecta translocaciones que pueden pasar desapercibidas con la citogenética convencional como son las translocaciones cripticas y proporcionan un marcador sensible para las subsiguientes pruebas de enfermedad mínima residual (Salto et al., 2003). Esta técnica permite estudiar la expresión génica, además de caracterizar los transcritos formados por las translocaciones desencadenantes de las leucemias, como son los puntos de ruptura en las regiones de los genes. Un diagnóstico de mayor precisión y determina la estructura y composición de las proteínas por fusión de genes producidos por los distintos rearreglos genómicos, y por lo tanto, el fenotipo de la leucemia (Jiménez et al., 2008).

Los ensayos de RT-PCR están diseñados para detectar fusiones específicas, y seria extremadamente laborioso evaluar las leucemias a través de un panel de ensayos monoplex individuales, para ello puede ahorrarse tiempo y reactivos estableciendo una prueba de diagnóstico por PCR múltiplex (Salto et al., 2003).

Optimización de parámetros críticos y estandarización de la técnica PCR multiplex

Para optimizar y estandarizar una técnica se requiere estudiar, analizar y comprender el proceso para realizar una PCR, los reactivos y la función que tiene cada uno dentro de la reacción. Esto permite establecer parámetros que serán evaluados de uno en uno con el fin de ver cual proporciona un mejor resultado.

Diversos estudios han demostrado que la especificidad, el rendimiento, la eficiencia y la fidelidad de la PCR se encuentran directamente influenciadas por los diversos componentes que integran la técnica tales como: 1. Diseño de oligonucleótidos, 2. Máster Mix, 3. DNA polimerasa, 4. Reactivos Aditivos y 5. Régimen de ciclaje, los cuales se describirán a detalle a continuación. Resulta necesario planificar en cada caso una metodología en la que pueda existir equilibrio entre estos parámetros, ya que para lograr la mayor especificidad no siempre es compatible con un alto rendimiento, y tratar de optimizar la fidelidad pudiera reducir la eficiencia.

1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos apropiados es esencial para el éxito de la PCR. Cuando se diseña un conjunto de cebadores para una región especifica de DNA deseada para la amplificación, un cebador forward debe hibridar con la cadena sentido, que por convención está orientada en la dirección 5'->3' y el otro cebador reverse debe complementar la hebra anti sentido, que está orientada en la dirección 3'->5'. Existen algunos problemas comunes que surgen cuando se diseñan cebadores como: 1) el alineamiento de los cebadores que da como resultado la formación de estructuras secundarias como bucles de horquilla, 2) la hibridación de cebadores entres si, creando dímeros de cebadores, 3) temperaturas de fusión (Tm) drásticamente diferentes para cada cebador, lo que dificulta seleccionar una temperatura de hibridación que permita que ambos cebadores se unan de manera eficiente a su secuencia objetivo durante el ciclo térmico (Lorenz, 2012).

Al diseñar los oligonucleótidos se debe tener en cuenta las siguientes características: los oligonucleótidos deben tener un tamaño de 18-30 nucleótidos, además de una temperatura de fusión (Tm) similar. La temperatura de hibridación de los cebadores al molde se ajusta para que sea ± 5 °C menor que la temperatura calculada. Evitar tramos largos de una sola base y que el extremo 3' forme una estructura secundaria importante. Procurar en lo posible que las ultimas bases del extremo sean G o C, para que brinden mayor estabilidad al punto de inicio de la etapa de extensión. Evitar la complementariedad entre los oligonucleótidos para minimizar la posibilidad de que se

creen dímeros de cebadores. La concentración a la que suelen emplearse está en el intervalo de 0,1-0,5 Mm y el contenido de G-C debe oscilar entre 40 y 60% (Bolivar et al., 2014; Lorenz, 2012).

Para una PCR multiplex se requiere analizar la interaccion de los oligonucleótidos a través de su ΔG° de los oligonucleótidos, ya que esta información nos proporciona si en al realizar una mezcla existirán estructuras secundarias u horquillas.

Estos valores de la ΔG° representa la estabilidad de los dímeros y es la energía requerida para romper su formación. Al tener valores positivos de la ΔG° indican que los dímeros u horquillas para formarse requieren un aporte de energía (calor), por lo que existe una menor probabilidad de que se formen espontáneamente sin energía adicional. En cambio, si la ΔG° es negativo se producirán fácil y espontáneamente se pueden formar los dímeros u horquillas sin energía adicional. Los números de ΔG° muy negativos indican que existe una afinidad para formar estructuras y es probable que se requiera mucho calor para revertir la horquilla o el dímero a su forma lineal, por lo que se deben evitar estructuras secundarias más estables (valores negativos de ΔG° más grandes) (Benchling, 2003).

2. Máster Mix

Desoxinucleótidos 5'-trifosfatos (dNTP's)

La variación en su concentración afecta especificidad y fidelidad. Concentraciones altas hacen disminuir la actividad de la enzima e incluso pueden llegar a inhibirla. También se puede ver afectada la reacción de PCR debido a su inestabilidad por congelación y descongelación de forma repetitiva de los dNTP's. El uso de concentraciones desbalanceadas también afecta la fidelidad, siendo las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos entre 0,2 a 1Mm. Los dNTP's pueden captar iones de magnesio (Mg^{2+}) por lo tanto las concentraciones de ambos deben guardar siempre la misma relación (Rodríguez & Barrera, 2004).

Iones divalentes y monovalentes

Los iones divalentes actúan como cofactores de la enzima por tanto tienen una función crítica en la reacción. Se suele usar Mg^{2+}, agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), usado a una concentración que oscila regularmente entre 0,5 y 2,5 mM. En muchos casos la concentración debe optimizarse para cada ensayo. En general, concentraciones insuficientes dan lugar a bajo rendimiento mientras que el exceso tiende a producir amplificaciones inespecíficas (Sint et al.,

2012). Entre los iones monovalentes el más empleado es el potasio (K), generalmente unido a otros iones como el cloro (KCl) en una solución amortiguadora (Rodríguez & Barrera, 2004).

Solución amortiguadora

Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la DNA polimerasa. La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), KCl, y $MgCl_2$ (Rodríguez & Barrera, 2004).

Concentración y pureza de la muestra

La calidad y la pureza del DNA o RNA tendrá un efecto sustancial en el resultado de un experimento. Las concentraciones de DNA y RNA se pueden determinar utilizando mediciones de densidad óptica a 260 nm (OD260). Los contaminantes de extracción de la muestra son inhibidores comunes en la PCR y deben evitarse. Los inhibidores comunes de extracción incluyen proteínas, RNA, solventes orgánicos y detergentes (Lorenz, 2012). Utilizando la absorción máxima de los ácidos nucleicos OD260 en comparación con las proteínas OD280 (OD260/280), es posible determinar una estimación de la pureza del DNA extraído. Idealmente, la proporción de OD260/280 está entre 1.8 y 2.0. Un DNA de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de RNA en la muestra. A 230nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el DNA es puro cuando la relacion A260/230 se sitúa en torno 1.8-2.2. Una proporción menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra. Cuanto menor sea esta relación la presencia de contaminantes en la muestra será mayor. Una relación < 1.5 estaría indicando una impureza relevante en la muestra que podría comprometer su funcionalidad. Además de la calidad del DNA molde, la optimización de la cantidad de DNA puede beneficiar enormemente el resultado (ThermoScientific, 2017).

3. DNA polimerasa

La temperatura óptima de catálisis de la DNA polimerasa oscila alrededor de 70-72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo (Bolivar et al., 2014). En la actualidad la mayoría son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética (Rodríguez & Barrera, 2004). Varios fabricantes tienen una matriz de DNA polimerasas especificas diseñadas para necesidades especializadas, las condiciones de reacción y las características del

amplicon deseado, para hacer coincidir el experimento de PCR con la DNA polimerasa adecuada. La mayoría de los fabricantes tienen tablas que ayudan a la selección de la DNA polimerasa al enumerar características como la fidelidad, el rendimiento, la velocidad, las longitudes optimas de los objetivos y si es útil para la amplificación de G-C o de la PCR Hot Star (Lorenz, 2012).

4. Reactivos aditivos

Los reactivos aditivos pueden dar resultados cuando los demás parámetros fallan. Comprender para que se utilizan es fundamental para determinar que reactivos pueden ser más efectivos para la obtención del producto PCR deseado. Agregar reactivos a la reacción es complicado por el hecho de que la manipulación de un reactivo puede afectar la concentración utilizable de otro reactivo (Lorenz, 2012).

Los aditivos que benefician a las plantillas G-C Rich:

Q-Solution: Cambia el comportamiento de fusión del DNA, y a menudo, mejora una PCR subóptima causada por plantillas que tienen un alto grado de estructuras secundarias o altos contenidos de GC (Technologies Assay, 2010).

Dimetilsulfóxido (concentración de reacción final de 1-10% de DMSO) en a pruebas PCR en las que el DNA molde es particularmente rico en G-C (contenido de GC > 60%), la adición de DMSO puede mejorar la reacción interrumpiendo el apareamiento de bases y reduciendo efectivamente la Tm. Existen calculadoras de Tm que incluyen una variable para sumar la concentración de DMSO deseado en el experimento de PCR. Sin embargo, agregar más de 2% de DMSO deseado puede requerir agregar más de DNA polimerasa ya que este puede inhibirla (Lorenz, 2012).

Formamida (Concentración de reacción final de 1.25-10%), al igual que el DMSO, también interrumpe el apareamiento de bases al mismo tiempo que aumente la rigurosidad del alineamiento de los cebadores, lo que resulta en menos reacciones no específicas. También se ha demostrado que la formamida es un potenciador de las plantillas de G-C (Lorenz, 2012).

7-deasa-2-desoxiguanosina 5-trifosfato (concentración de reacción final de dc7GTP; 3dc7GTP:1 dGTP 50 µM) desestabiliza la formación de estructuras secundarias en el producto. A medida que se desnaturaliza el amplicon o la plantilla de DNA, a menudo formará estructuras secundarias, como horquillas o bucles. La incorporación de dc7GTP en el amplicon de DNA prohibirá la formación de estas estructuras (Lorenz, 2012).

Betaína (concentración de reacción final de 0.5 M a 2.5 M): La betaína (N,N,N-trimelglicina) es un análogo de aminoácido zwitterionico que se reduce e incluso puede eliminar la temperatura de fusión del DNA en la composición de nucleótidos. Se utiliza como aditivo para ayudar a la amplificación por PCR de dianas ricas en G-C. La betaína a menudo se emplea en combinación con DMSO y puede mejorar en gran medida las posibilidades de amplificar el DNA objetivo con un alto contenido de G-C (Henke et al., 1997).

5. Ciclaje

Se debe tener en consideración que la mayoría de las modificaciones que afectan la reacción están directamente relacionadas con los factores que afectan el alineamiento y la extensión. La temperatura de alineamiento resulta más dependiente de un correcto balance entre los oligonucleótidos. Por su parte, la temperatura de extensión lo es de la actividad enzimática y dNTP's (Bolivar et al., 2014).

Desnaturalización

Esta es una etapa crítica. Es muy importante que el DNA molde se desnaturalice completamente y así pueda iniciar la síntesis de su nueva cadena complementaria, proceso que se consigue a temperaturas de 94°C por lo menos durante 1 min. Hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media aproximada: 92.5°C =2h, 95°C =40 min. y 97.5°C =5 min.). En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (94°C por 5 min.) para asegurar que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula de DNA (Rodríguez & Barrera, 2004).

Extensión

La enzima utilizada en la reacción necesita del grupo OH- libre en el extremo 3´ a partir de donde iniciar la síntesis, punto que constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria. El alineamiento específico de ambos oligonucleótidos se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40°C y 70°C se recomienda emplear temperaturas de alineamiento entre 50°C y 65°C. Un aumento favorece la especificidad, ya que disminuye uniones incorrectas de los oligonucleótidos con sitios erróneos del DNA molde (Bolivar et al., 2014).

Alineamiento

Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, coincidente con la máxima actividad de la enzima para evitar alineamientos inespecíficos. El tiempo depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min. a 72°C para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan exactamente la misma longitud (Bolivar et al., 2014).

La duración y temperatura de cada paso dentro de un ciclo puede ser modificado para optimizar la producción del amplicón deseado. El número de ciclos por encima de 35 dará como resultado una mayor cantidad de productos de PCR, demasiadas rondas a menudo resultan en el enriquecimiento de productos secundarios indeseables (Lorenz, 2012).

Uso de controles en la aplicación de diagnóstico por pruebas basadas en PCR

Para perfeccionar una PCR es preciso contar con controles negativos, positivos e internos que garanticen el desarrollo e interpretación de las reacciones (Acevedo et al., 2009; Moldovan & Moldovan, 2020).

Controles Internos

Un control interno es una secuencia de DNA o cDNA que es amplificado en la misma reacción con el DNA objetivo, esto permite evaluar y monitorear la integridad del ácido nucleico diana; en muestras recolectadas, almacenados o procesados incorrectamente en una reacción de PCR (Rosenstraus et al., 1998).

Los controles internos que se emplean en la PCR son genes de referencia o housekeeping los cuales se expresan en una amplia variedad de tejidos y tipos de células y muestran cambios mínimos o nulos en los niveles de expresión entre las muestras individuales y las condiciones experimentales. La elección correcta es crucial para analizar acertadamente los resultados de la PCR (Rebouças et al., 2013).

Como el control interno se amplifica junto con la secuencia objetivo, es crucial que el control interno no compita con la región objetivo de interés, es por ello que se deberá colocar menor concentración de sus oligonucleótidos en la reacción que del objetivo de interés.Los dos tipos de controles internos que se utilizan en los experimentos de PCR cotidianos son los controles exógenos y los controles

endógenos, cada uno con sus indicaciones de uso, según el tipo de experimento (Moldovan & Moldovan, 2020).

Los controles exógenos se pipetean directamente en la muestra sin procesar, o sea agregan al ácido nucleico aislado antes de la reacción de PCR, y se dirigirán a una especie diferente a la estudiada. Se utilizan principalmente para la cuantificación absoluta (es decir, el numero de copias de genes por muestra examinada) y para el control de la amplificación relativa a partir de un conjunto de cebadores específicos. Otro uso de controles exógenos es la discriminación entre muestras negativas (donde el control seguirá amplificando) y la inhibición de la PCR (cuando no se observará amplificación) (Moldovan & Moldovan, 2020).

Los controles endógenos son objetivos dentro de la muestra estudiada, distintos de la región o regiones de interés, como los genes expresados de forma constitutiva que cumplen funciones de células basales y, por lo tanto, dependen del tipo de tejido que se examina (Moldovan & Moldovan, 2020).

Controles negativos

El control negativo o también denominado como control sin plantilla es una reacción de PCR sin amplificación. Los controles negativos contienen la mezcla de reacción de PCR y se le agrega agua de grado molecular, que sustituye el volumen de material genético que se les agrega a los demás tubos de experimentación. Este tipo de reacción verifica si no hay contaminación dentro de la mezcla de reacción y si no se forman dímeros de cebador. Aunque se deben de evitar los dímeros desde la etapa de diseño de los cebadores, las reacciones de control negativo también se pueden usar para comprobar si hay homodímeros de cebadores (Moldovan & Moldovan, 2020).

Controles Positivos

Los controles positivos es una secuencia de DNA o cDNA de amplificación que se emplean en la estandarización de los ensayos y permiten evaluar posibles falsos negativos (Acevedo et al., 2009). A menudo estos controles se usan para verificar que todos los reactivos de la mezcla de PCR funcionan, las temperaturas de hibridación de los cebadores son correctas, los tiempos de extensión son suficientes y no hay inhibidores de PCR en el experimento. Cuando se utiliza el mismo control positivo durante experimentos comparables (o del mismo tipo), el umbral del ciclo debe ser muy similar, lo que indica coherencia entre varias ejecuciones de PCR (Moldovan & Moldovan, 2020).

Los controles positivos pueden tener una variedad de fuentes. La forma más sencilla de obtener uno es adquiriendo un control positivo comercial disponible, para un tipo específico de experimento. Sin embargo, principalmente en situaciones de investigación, los controles positivos pueden obtenerse ya sea secuenciando y confirmando una muestra que previamente fue diagnosticada como positiva, o diseñando un plásmido con la secuencia requerida, información que suele estar disponible en bancos de datos genéticos (Moldovan & Moldovan, 2020; Rosenstraus et al., 1998).

Vectores bacterianos (plásmidos)

Un plásmido es una molécula pequeña de DNA circular que se encuentra en muchas bacterias y eucariontes unicelulares. Los plásmidos están separados físicamente del DNA cromosómico y se replican de manera independiente. Habitualmente tienen un número reducido de genes (algunos asociados a la resistencia a los antibióticos), y se pueden transmitir de una célula a otra. Los científicos utilizan a los plásmidos como vectores de clonación ya que pueden aceptar, transportar y replicar DNA recombinante de genes que desean estudiar. Cuando el plásmido se copia a sí mismo, también hace copias del gen insertado(Palma, 2010).

Características prácticas de los vectores de clonación del DNA

Los modernos vectores de clonación del DNA plasmídico suelen incluir la mayoría de las siguientes características deseables y prácticas (Watson et al., 2016).

1.-Tamaño: deberían ser lo suficientemente pequeños como para que se puedan separar fácilmente del DNA cromosómico de la bacteria hospedadora.

2.-Origen de la replicación (ori): es el sitio de replicación del DNA que permite a los plásmidos replicarse de forma separada del cromosoma de la célula hospedadora. El número de plásmidos que hay en una célula se denomina número de copias. El número normal de copias de plásmidos en la mayoría de las células bacterianas es pequeño (suele ser menos de 12 plásmidos por célula); sin embargo, muchos de los plásmidos de clonación más deseables se conocen como plásmidos de alto número de copias porque se replican para crear cientos de miles de copias de plásmidos por célula.

3.-Sitio de clonación múltiple (MCS): el MCS, también llamado polylinker, es un fragmento de DNA con secuencias de reconocimiento para muchas enzimas de restricción comunes diferentes. Estos sitios se crean en el plásmido de modo que la digestión del plásmido por las enzimas de restricción no da como resultado la pérdida de un fragmento de DNA. Más bien, lo que ocurre es que el

plásmido circular sencillamente se vuelve lineal cuando lo digiere una enzima de restricción. Un MCS (o polylinker) aporta gran flexibilidad a los fragmentos de DNA que pueden ser clonados en un plásmido porque es posible insertar fragmentos de DNA generados por los cortes con muchas enzimas diferentes.

4.- Genes marcadores que se puedan seleccionar: estos genes permiten la selección e identificación de bacterias transformadas mediante un plásmido recombinante en comparación con las células no transformadas. Algunos de los marcadores más comunes que se pueden seleccionar son genes de resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina.

5.- Secuencias del promotor de RNA polimerasa: se utilizan estas secuencias para la transcripción del RNA in vivo e in vitro por la RNA polimerasa. In vivo, estas secuencias permiten a las células bacterianas fabricar RNA a partir de genes clonados, lo que a su vez causa la síntesis de proteínas.

Justificación

La detección de las alteraciones cromosómicas de la LA a través de una RT-PCR es de suma importancia ya que permite determinar el subtipo molecular de leucemias y el riesgo de esta, lo cual contribuye a establecer de manera efectiva el tratamiento y mejorar la sobrevida de los pacientes.

Esta prueba en la mayoría de los centros de tratamiento es inaccesible debido a su alto costo. En el Hospital para el niño IMIEM en el laboratorio de Hemato-oncología, Cuero-Quezada desarrolló la propuesta de una prueba de identificación de alteraciones cromosómicas comunes por RT-PCR monoplex punto final para pacientes con leucemia aguda infantil, el cual permite ampliar el acceso de este estudio.

La RT-PCR monoplex tiende a ser laboriosas e implica emplear más reactivos por reacción, es por ello que con este trabajo se busca obtener una RT-PCR multiplex para de reducir el costo de reactivos y el costo de la prueba, además de tener otra ventaja ya que reduce el tiempo en obtener el resultado.

Objetivos

Objetivo general

Optimizar una prueba por RT-PCR multiplex para la identificación de alteraciones cromosómicas en leucemia aguda infantil.

Objetivos específicos

Determinar las condiciones de PCR optimas de la RT-PCR multiplex (Concentración de $MgCl_2$, temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y mezcla de oligonucleótidos de LA).

Comprobar la propuesta de RT-PCR multiplex en muestras de pacientes con leucemia aguda infantil.

Materiales y Métodos

Plásmidos control de las alteraciones cromosómicas

En este proyecto se utilizo el plásmido pJET1.2 como control para las alteraciones más comunes con los diferentes re-arreglos exónicos que se muestran en la **Tabla 5**, estos fueron realizados por Cuero-Quezada en su tesis.

Tabla 5. Características de los plásmidos control

Alteración cromosómica	Plásmido	Genes	Tamaño teórico del amplicón (pb)
t(1;19)(q23;p13)	Pt(1;19)	TCF3 ex13 - PBX1 ex3	253
t(12;21)(p13;q22)	Pt(12;21)	ETV6 ex5 - RUNX1 ex5	287
t(9;22)(q34;q11) m-bcr	Pt(9;22)m	BCR ex1 - ABL ex3	513
t(9;22)(q34;q11) M-bcr	Pt(9;22)M	BCR ex12 - ABL ex3	516
del(1)(p32)	PDel 1	SIL ex1 - TAL1 ex2	241
t(4;11)(q21;q23)	Pt(4;11)	MLL ex7 - AFF1 ex8	265
t(15;17)(q24;q21) a	Pt(15;17) a	PML ex6 - RARA ex4	280
t(15;17)(q24;q21) b	Pt(15;17) b	PML ex3 - RARA ex4	218
inv(16)(p13;q22) a	PInv 6 1	CBFB ex4 - MYH11 ex35	452
inv(16)(p13;q22) b	PInv 6 2	CBFB ex3 - MYH11 ex31	627
t(8;21)(q22;q22)	Pt(8;21)	RUNX1 ex5 - RUNX1T1 ex4	514
Control Positivo Interno Beta-2-microglobulina (B2M)	PB2M	B2M ex1 - B2M ex3	808

(Cuero Quezada, 2018)

Células *E. coli Top 10* quimio competentes

Las células *E. coli Top 10* se convirtieron en quimio competentes con el Ca_2Cl, ya que al encontrarse las células en un medio rico de cloruro de calcio hace que se contrarreste la repulsión electrostática entre el DNA plasmídico sobre la superficie celular y después se pueda realizar el choque térmico, ocasionando que se desestabilice la membrana, de manera que favorece la entrada del plásmido a la célula a través de poros temporales formados en ella.

El protocolo que se realizó para convertir las células fue el siguiente:

1. Inocular una colonia de *E. coli* TOP10 en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) en un tubo cónico de 50 mL. Crecer a 32.5°C a 160 rpm durante 24 hrs.

2. Utilizar 1 mL para inocular 100 mL de LB en matraz de 250 mL previamente esterilizado al día siguiente.

3. Incubar a 32.5 °C a 160 rpm por 2 horas.

4. Medir la densidad óptica la cual debe estar entre 0.5 – 0.6 a 600 nm.

5. Añadir del cultivo previo 30 mL a un matraz con medio de cultivo LB-liquido ajustando su densidad óptica en 0.2 en 600 nm. Transferir el cultivo a un tubo cónico de 50 mL.

6. Colocar las células en hielo por 10 min.

7. Centrifugar a 4100 rpm por 7 min.

8. Lavar las células con 10 mL de Ca_2Cl.

9. Centrifugar a 4100 rpm por 7 min.

10. Decantar todo el sobrenadante y resuspender gentilmente en 10 mL de Ca_2Cl 0.1 M frío.

11. Incubar en hielo por 15 min.

12. Centrifugar a 4100 rpm por 7 min.

13. Decantar y resuspender en 700 µL de Ca_2Cl 0.1 M/Glicerol al 15% frío.

14.Dispensar en alícuotas 300 µL en cada tubo y congelar a -70°C hasta su uso.

Transformación de células competentes *E. coli* TOP10

Las células competentes se transformaron mediante choque térmico agregándole el plásmido, el cual contiene las secuencias de los genes fusionados de las diversas alteraciones cromosómicas usando el vector pJET1.2.

La transformación se llevó a cabo colocando toda la reacción de ligación en células competentes siguiendo los pasos a mencionar:

1. Colocar en un tubo eppendorf 30 µL de células competentes *E. coli* Top 10. Agregar 3 µL del plásmido e incubar por 20 min en hielo.

2. Dar un choque térmico a 42°C por 1:30 min.

3. Incubar en frío por 5 min.

4. Añadir 950 µL de medio Luria-Bertani (LB).

5. Dejar en incubación a 32°C por 1 hora con agitación de 100 rpm.

6. Inocular 50 µL por extensión en una caja de LB-Amp (100 µg/mL), misma que se incubó a 37°C durante 18 hrs.

Después se realizó la propagación cultivando las células transformadas en cajas con el medio de cultivo solido Luria-Bertani con ampicilina (100 µg/ml). El aislamiento de colonias del vector pJET1.2 contiene el gen β-lactamasa que le confiere resistencia a la ampicilina, por lo que las colonias que crecieron en LB-Amp contienen la secuencia que se desea clonar. Para la extracción de DNA plasmídico se tomó una colonia que se inoculó en 5 mL de medio LB-Amp (100 µg/mL) líquido dejando en incubación a 32.5°C con agitación de 159 rpm por 16 hrs, para posteriormente realizar la extracción de DNA plásmidico con el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit Zyppy^{TM} Plasmid Miniprep del laboratorio ZYMO RESEARCH (Estados Unidos), el cual se presenta a continuación:

1. Centrifugar el cultivo LB-Amp (100 µg/mL) líquido a 2000 rpm durante 15 minutos, con el fin de obtener el botón celular, eliminar el sobrenadante.

2. Resuspender el pellet con 200 µL de Sol. I (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA) y 10 mg/mL de RNasa del tubo falcón y pasar a un tubo eppendorf.

3. Incubar en el termobloque durante 5 min a 60 °C.

4. Añadir 200 µL de Sol. II (0.2 M NaOH, 1% SDS) y agitar por inversión.

5. Incubar en el termobloque durante 5 min a 60 °C.

6. Agregar 200 µL de Sol. III (1.32 M de acetato de potasio) y homogenizar por inversión.

7. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min.

8. Transferir 500 µL de sobrenadante para precipitar el DNA plasmídico con isopropanol (1/1 v/v).

9. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y retirar el sobrenadante;

10. Realizar dos lavados con 1 mL de etanol al 75%.

11. Dejar secar al aire libre y resuspender el botón en 30 µL de H_2O

La cuantificación y determinación de pureza se realizó mediante espectrofotometría de luz ultravioleta a 260 nm en el Nanofotómetro Implen.

Diseño y compatibilidad de oligonucleótidos para RT-PCR multiplex

Cuero-Quezada diseño la secuencia de oligonucleótidos estableciendo el tamaño de 19 a 24 pb, la diferencia de sus Tm no superara ± 5°C y su contenido de G-C oscilara entre 40-60%.

En la **Tabla 4** se describen a detalle las características fisicoquímicas de cada oligonucleótido, en base a esta información se establecieron *In silico* las condiciones estándar de la RT-PCR multiplex y usando el programa Perl Primer se analizaron las interacciones de los oligonucleótidos con la finalidad de ver si se formaban dímeros u horquillas, esto fue determinado a través de su ΔG°.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de los oligonucleótidos

Alteración cromosómica	Nombre	Locus	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Tm (°C)	GC%
t(1;19)	Fw119	TCF3 ex13	CACTCAAGCAATAACTTCTCGT	22	59.16	40
	Rv119	PBX1 ex3	ACTGAGTTGTCTGAACCTGC	20	60.37	50
t(12;21)	Fw1221	ETV6 ex5	ACATCATGGTCTCTGTCTCC	20	58.99	50
	Rv1221	RUNX1 ex5	ATGGCTCTGTGGTAGGTGG	19	61.48	57
t(9;22)m	Fwm	BCR ex1	CAGAACTCGCAACAGTCCT	19	60.1	52
t(9;22)M	FwM	BCR ex12	GTTCCTGATCTCCTCTGACT	20	58.33	50
t(9;22)m y t(9;22)M	RvM	ABL ex3	CAGCAGATACTCAGCGGCA	19	62.56	57
Del 1	FwD1	SIL ex1	GACCCCAACGTCCCAGAG	18	62.17	66
	RvD1	TAL1 ex2	GACCGGCCCCTCTGAATA	18	60.91	61
t(4;11)	Fw411	MLL ex7	CAGCCTCCACCACCAGAAT	19	62.1	57
	Rv411	AFF1 ex8	CTTGCTGAGAATTTGAGTGAGT	22	59.09	40
t(15;17)a	Fw1517_a	PML ex6	TCTCCAATACAACGACAGCC	20	60.23	50
t(15;17)b	Fw1517_b	PML ex3	ACCTCAGCTCTTGCATCACC	20	62.69	55
t(15;17)a y t(15;17)b	Rv1517	RARA ex4	GTACACCATGTTCTTCTGGATG	22	59.22	45
Inv 6 1	Fwi16_a	CBFB ex4	CATGATTCTGAATGGAGTCTGT	22	58.35	40
	Rvi16_a	MYH11 ex35	GTTGCTTTCGCTCGTCTTC	19	59.95	52
Inv 6 2	Fwi16_b	CBFB ex3	GAACAGCGACAAACACCT	18	58.3	50
	Rvi16_b	MYH11 ex31	CGTAGACACGTTGAGCTTCTG	21	61.47	52
t(8;21)	Fw821	RUNX1 ex5	GCTTCACTCTGACCATCACTG	21	61.17	52
	Rv821	RUNX1T1 ex4	GTGCGAACTCTTTCTCCTATCTC	23	61	47
B2M	FwBM	B2M ex1	TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG	23	62.77	47
	RvBM	B2M ex3	AGATTAACCACAACCATGCCT	21	60.15	42

(Cuero Quezada, 2018)

Tomando esta información se hicieron las siguientes pruebas: 1) Realizar una mezcla con todos los oligonucleótidos, la cual se nombró mezcla de LA. 2) por subtipo de LA que son dos, una para LLA la cual contiene 6 pares de oligonucleótidos y otra para LMA que contiene 7 pares de oligonucleótidos.

Se organizaron de esta manera las mezclas con el fin de reducir la cantidad de uso de los reactivos permitiendo reducir el costo de la prueba, así como de al momento de elaborar la RT-PCR multilex reducir el tiempo de preparación de las reacciones lo cual nos permite tener resultados en menor tiempo.

PCR

Los parámetros para la optimización de la RT-PCR multiplex que se consideraron fueron los siguientes: la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos (59 y 58 °C), la mezcla de los oligonucleótidos (mezcla de LA y por subtipo LLA y LMA) y la concentración del $MgCl_2$ (1.5, 3 y 4.5 mM). Los amplificados obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bromuro de etidio 0.05 ng/ml, y se le adiciona en el primer pozo el marcador de peso molecular de 100 pb.

Una vez teniendo las condiciones de la PCR establecidas se proseguió a comprobar la propuesta de RT-PCR multiplex en muestras almacenadas de pacientes con leucemia aguda infantil. Se utilizaron 4 cDNA de pacientes con LLA y 4 con LMA.

Condiciones estándar iniciales de la RT-PCR multiplex

Una vez que se probaron las condiciones *In silico* y se analizaron las interacciones de los oligonucleótidos, se llevaron a cabo las reacciones de PCR, inicialmente utilizando la mezcla de los oligonucleótidos de LA con las concentraciones que Cuero-Quezada estableció para cada oligonucleótido en sus experimentos, los cuales se muestran en la **Tabla 8**.

Las condiciones iniciales de la Máster Mix y el ciclaje se muestran en las **Tablas 6 y 7**, y con base al primer experimento de PCR se fueron modificando los parámetros de la RT-PCR multiplex.

En un inicio se tomó la concentración inicial obtenida de la extracción de los plásmidos que se muestran en la **Tabla 9**, con el motivo de analizar la integridad del plásmido.

Tabla 6. Condiciones iniciales de la Master Mix de la Reacción en Cadena de la RT-PCR multiplex

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (µl)
DNA polimerasa	5 U/ µl	0.025 U/ µl	0.125
dNTP's	10mM	0.2 mM	0.5
Buffer	10 X	1X	2.5
DNA plásmido	-	-	1
Mix oligos	12.5 µM	0.5 µM	5
Q-solution	X	0.5 X	2.5
H_2O	-	-	13.375
	Volumen Final		25

Tabla 7. Condiciones del termociclador para la reacción de la primer RT-PCR multiplex.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Activación Hot-Start Pol	94	10 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	59	30 s	28
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1
Almacenamiento	4	∞	-

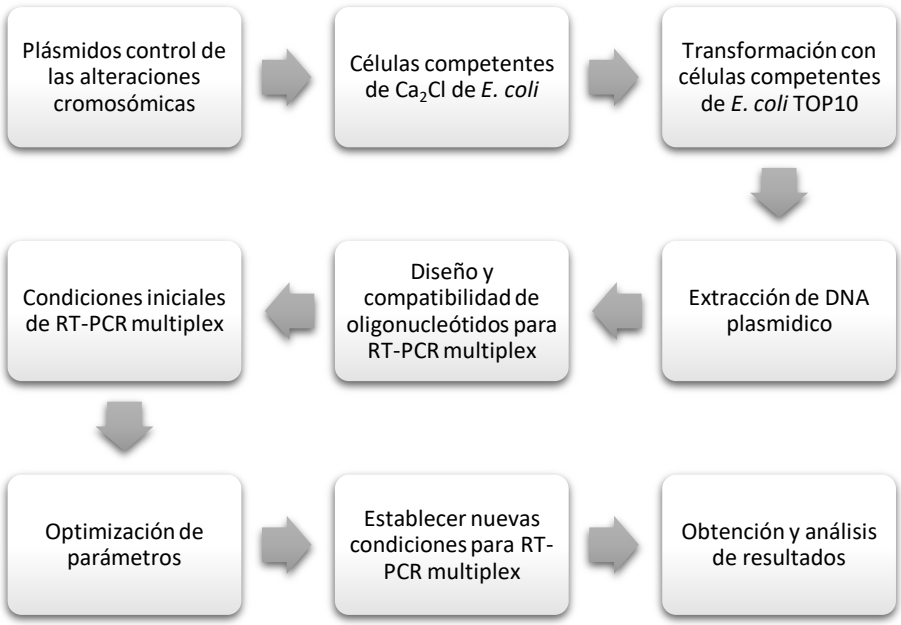
Tabla 8. Concentraciones de la mezcla de oligonucleótidos de las translocaciones de LA

Oligonucleótidos	Concentración utilizada (µM)
BM	0.25
t(1;19)	1.0
t(12;21)	0.5
Del 1	0.5
t(4;11)	0.5
t(9;22 m)	0.5
t(9;22M)	0.5
t(9;22 m) y t(9;22M)	0.5
t(15;17) a	0.5
t(15;17) b	0.5
t(15;17) a y (15;17) b	0.5
Inv 6 1	0.5
Inv 6 2	0.5
t(8;21)	0.5

Tabla 9. Características de los plásmidos

Plásmido	Concentración inicial (ng/µl)	Tamaño teórico del amplicón (pb)
Plásmido t(1;19)	102	253
Plásmido t(12;21)	506	287
Plásmido t(9;22)m	205	513
Plásmido t(9;22)M	247	516
Plásmido Del 1	313	241
Plásmido t(4;11)	200	265
Plásmido t(15;17) a	476	280
Plásmido t(15;17) b	210	218
Plásmido Inv 6 1	425	452
Plásmido Inv 6 2	353	627
Plásmido t(8;21)	287	514
Plásmido B2M	467	808

Estrategia general del trabajo



Resultados

Interacción de los oligonucleótidos en la RT-PCR multiplex

Las interacciones de los oligonucleótidos de las mezclas de LA y por subtipos (LLA y LMA) de la RT-PCR multiplex se analizaron a través de los valores de la ΔG° en el programa PerlPrimer, los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 10, 11 y 12**. Estos valores de la ΔG° representa la estabilidad de los dímeros y es la energía requerida para romper su formación.

En la mezcla de oligonucleotios de LA de la **Tabla 10**, se observa que los valores más alto de la ΔG° para dímeros no extensibles son: Fw119 vs Rv411 -4.83 kcal/mol, Fw1221 vs Fw821 -4.99 kcal/mol, Rv1221 vs Fw 1517a -4.21 kcal/mol, Rv1221 vs RvBM -4.64 kcal/mol, Fwm vs Rv821 -4.43 kcal/mol, RvM vs Rvi16b -4.96 kcal/mol, Rv411 vs Fw1517b -4.66 kcal/mol, Rv411 vs Fw821 -5.91 kcal/mol y Fwi16a vs FwBM -4.32 kcal/mol. Estos valores no son menores a -6 kcal/mol lo cual nos indica que al realizar las reacciones de RT-PCR multiplex se espera que no exista la formación de dímeros no extensibles.

En cuanto a dimeros extensibles el valor más alto fue el Fwi16a vs FwBM -3.48 kcal/mol, pero no es menor a -5 kcal/mol por lo tanto existe la posibilidad de que no se formen dímeros extensibles.

Los oligonucleótidos Fw119 vs Fw1221, Fw119 vs Rv1517, Fw 1221vs Rv1221, Fw1221 vs Rv821, Rv1221 vs Rv 1221, Fwm vs Fw1517b, Fwm vs FwBM, FwD1 vs Fw 411, FwD1 vs Rv821, Fw1517a vs Fwi16b, Rv1517 vs Rvi16a, Fwi16b vs Rvi16b y Fwi16b vs FwBM el programa no determino un valor de su interacción, pero menciona que no son extensibles.

Tabla 10. Valores de la ΔG° de las interacciones de los oligonucleótidos para la mezcla de LA.

Oligos	Fw119	Rv119	Fw1221	Rv1221	Fwm	RvM	FwD1	RvD1	Fw411	Rv411	FwM	Fw1517_a	Fw1517_b	Rv1517	Fwi16_a	Rvi16_a	Fwi16_b	Rvi16_b	Fw821	Rv821	FwBM	RvBM
Fw119	*-0.08	*-2.69	NE	*-2.6	*-0.36	*-0.08	*-1.22	*-0.01	*-0.11	*-4.83	*-0.33	*-2.3	*-1.63	NE	*-0.86	*-3.99	*-0.08	-0.72	*-1.95	*-1.3	*-0.16	*-0.16
Rv119		-0.08/*-1.30	*-1.29	-0.49/ *-1.76	*-2.54	-1.3/*-3.83	-1.48	*-0.26	*-0.4	*-0.3	*-1.31	*-2.6	*-1.98	*-0.81	*-0.18	*-2.06	*-0.6	*-2.69	*-1.47	*-1.47	-2.21	*-2.6
Fw1221			-0.12/*-1.17	NE	*-1.61	*-0.7	*-2.62	*-0.73	*-2.11	-0.16/*-2.58	*-0.42	*-2.79	*-0.89	*-1.9	*-3.01	*-0.95	*-2.32	*-0.63	*-4.99	NE	*-0.89	*-3.05
Rv1221				NE	*-2.11	-0.29/*-3.02	-2.27/*-2.46	*-2.63	*-3.84	-0.26	*-0.72	-4.21	* -2.76	*-1.58	-0.26	* -0.08	*-3.25	*-2.17	-0.25/*-2.11	*-0.31	*-2	*-4.64
Fwm					*-0.08	*-1.52	*-0.9	*-1.48	*-0.08	-1.81/*-2.12	*-1.47	*-1.09	NE	*-2.29	*-3.47	*-3.99	*-3.13	-0.26/ *-2.58	*-1.48	*-4.43	NE	*-1.30
RvM						*-2.05	*-0.26	*-1.65	*-0.88	-1.68/*-3.94	-0.07/*-0.40	*-1.72	*-1.30	*-1.31	*-2.51	-1.59/*-2.34	*-0.17	*-4.96	*-1.48	*-1.30	*-0.08	*-2.94
FwD1							*-2.43	*-2.62	NE	*-0.52	*-2.62	*-0.42	*-1.30	-0.59/ *-3.11	*-1.48	*-1.19	NE	*-3.14	-0.85	-0.26/*-1.30	*-0.36	NE
RvD1								*-0.64	*-1.72	*-0.26	NE	*-1.72	*-1.48	*-0.05	*-1.34	*-1.67	*-0.01	*-0.08	-0.01	NE	*-2.98	*-1.13
Fw411									*-0.08	*-2.44	*-1.48	*-0.16	*-1.13	*-2.82	-1.91/*-3.46	*-0.49	*-0.08	*-2.30	*-1.13	*-0.98	*-0.08	*-0.07
Rv411										*-0.79	-0.30/*-0.80	*-3.54	*-4.66	*-1.19	*-1.66	*-3.32	*-2.44	*-0.78	*-5.91	*-2.15	*-3.32	*-0.08
FwM											*-0.97	*-0.4	*-1.48	*-0.75	*-1.9	*-0.42	*-1.25	*-0.16	*-1.01	*-1.25	*-1.48	*-0.64
Fw1517_a												*-0.08	*-1.13	-0.84/*1.83	-1.27/*-1.70	*-2.47	NE	*-2.94	*-1.13	*-0.08	*-1.22	*-0.16
Fw1517_b													*-2.17	*-1.11	*-1.48	*-1.13	*-0.08	*-1.63	*-1.48	*-1.81	*-1.13	*-1.98
Rv1517														-0.59/*-2.02	*-1.86	NE	*-2.47	*-0.16	*-1.11	*-0.75	*-3.11	*-1.26
Fwi16_a															*-1.26	*-0.26	*-1.61	*-1.47	*-2.36	*-2.55	-3.48/*-4.32	*-1.67
Rvi16_a																*-0.95	*-3.34	*-1.62	*-0.42	*-3.26	*-3.1	*-0.93
Fwi16_b																	*-0.08	*-0.9	NE	*-0.08	NE	*-0.08
Rvi16_b																		*-2.43	*-0.93	*-1.13	-0.4/*-1.97	*-0.65
Fw821																			*-0.08	*-0.57	-0.4/*1.48	*-0.16
Rv821																				*-0.94	*-1.05	*-0.84
FwBM																					*-0.08	*-0.08
RvBM																						*-0.08

Dímeros de cebadores extensibles 3' más estables, dímeros *No extensibles más estables y NE no es extensible a una temperatura de 37°C .

Después al separar las mezclas de oligonucleótidos en subtipos de LA se reducen las posibilidades de que se generen amplificaciones inespecíficas y que disminuya que se peguen los oligonucleótidos entre sí. En la mezcla de LLA los oligonucleótidos que se muestra en la **Tabla 11** presentan una ΔG° estable, ya que solo presenta dos valores más altos para dímeros no extensibles que son el Fw119 vs Rv411 con -4.83 kcal/mol y Rv1221 vs RvBM con -4.64 kcal/mol, pero no son menores a -6 kcal/mol. Mientras que en los dímeros no extensibles el valor más alto fue el Rv1221 vs FwD1 -2.27 kcal/mol, este valor no es menor a -5 kcal/mol por lo que se espera que no se formen dímeros extensibles.

El programa no determino los vales de las interacciones de los oligonucleótidos Fw119 vs Fw1221, Fw 1221vs Rv1221, Rv1221 vs Rv 1221, Fwm vs FwBM y FwD1 vs Fw 411. Aunque menciona que no son extensibles.

Tabla 11. Valores de la ΔG° de las interacciones de los oligonucleótidos para la mezcla de LLA.

Oligos	Fw119	Rv119	Fw1221	Rv1221	Fwm	RvM	FwD1	RvD1	Fw411	Rv411	FwBM	RvBM
Fw119	*-0.08	*-2.69	NE	*-2.60	*-0.36	*-0.08	*-1.22	*-0.01	*-0.11	*-4.83	*-0.16	*-0.16
Rv119		-0.08/ *-1.30	*-1.29	-0.49/ *-1.76	*-2.54	-1.30/ *-3.83	*-1.48	*-0.26	*-0.40	*-0.30	*-2.21	*-2.60
Fw1221			-0.12/ *-1.17	NE	*-1.61	*-0.70	*-2.62	*-0.73	*-2.11	-0.16/ *-2.58	*-0.89	*-3.05
Rv1221				NE	*-2.11	-0.29/ *-3.02	-2.27/ *-2.46	*-2.63	*-3.84	-0.26	*-2.00	*-4.64
Fwm					*-0.08	*-1.52	*-0.90	*-1.48	*-0.08	-1.81/ *-2.12	NE	*-1.30
RVM						*-2.05	*-0.26	*-1.65	*-0.88	-1.68/ *-3.94	*-0.08	*-2.94
FwD1							*-2.43	*-2.62	NE	*-0.52	*-0.36	NE
RvD1								*-0.64	*-1.72	*-0.26	*-2.98	*-1.13
Fw411									*-0.08	*-2.44	*-0.08	*-0.07
Rv411										*-0.79	*-3.32	*-0.08
FwBM											*-0.08	*-0.08
RvBM												*-0.08

Dímeros de cebadores extensibles 3' más estables, dímeros *No extensibles más estables, NE no es extensible a una temperatura de 37°C.

Por otro lado, en la mezcla de LMA también presentan interacciones de los oligonucleótidos con ΔG° estables como se puede observar en la **Tabla 12.** En la formación de díMeros extensibles el valor más alto de la ΔG° fue el Fwi16a vs FwBM -3.48 kcal/mol. Mientras que en díMeros no extensibles fueron RvM vs Rvi16b -4.96 kcal/mol y Fwi16a vs FwBM -4.32 kcal/mol. Los oligonucleótidos Fw1517a vs Fwi16b, Rv1517 vs Rvi16a, Fwi16b vs Rvi16b y Fwi16b vs FwBM el programa no determino un valor de su interacción, pero menciona que no son extensibles.

Tabla 12. Valores de la ΔG° de las interacciones de los oligonucleótidos para la mezcla de LMA.

Oligos	FwM	RvM	Fw1517_a	Fw1517_b	Rv1517	Fwi16_a	Rvi16_a	Fwi16_b	Rvi16_b	Fw821	Rv821	FwBM	RvBM
FwM	*-0.97	-0.07/ *-0.40	*-0.40	*-1.48	*-0.75	*-1.90	*-0.42	*-1.25	*-0.16	*-1.01	*-1.25	*-1.48	*-0.64
RvM		*-2.05	*-1.72	*-1.30	*-1.31	*-2.51	-1.59/ *-2.34	*-0.17	*-4.96	*-1.48	*-1.30	*-0.08	*-2.94
Fw1517_a			*-0.08	*-1.13	-0.84/ *-1.83	-1.27/ *-1.70	*-2.47	NE	*-2.94	*-1.13	*-0.08	*-1.22	*-0.16
Fw1517_b				*-2.17	*-1.11	*-1.48	*-1.13	*-0.08	*-1.63	*-1.48	*-1.81	*-1.13	*-1.98
Rv1517					-0.59/ *-2.02	*-1.86	NE	*-2.47	*-0.16	*-1.11	*-0.75	*-3.11	*-1.26
Fwi16_a						*-1.26	*-0.26	*-1.61	*-1.47	*-2.36	*-2.55	3.48/* -4.32	*-1.67
Rvi16_a							*-0.95	*-3.34	*-1.62	*-0.42	*-3.26	*-3.10	*-0.93
Fwi16_b								*-0.08	*-0.90	NE	*-0.08	NE	*-0.08
Rvi16_b									*-2.43	*-0.93	*-1.13	-0.40/ *-1.97	*-0.65
Fw821										*-0.08	*-0.57	-0.40/ *-1.48	*-0.16
Rv821											*-0.94	*-1.05	*-0.84
FwBM												*-0.08	*-0.08
RvBM													*-0.08

Díméros de cebadores extensibles 3’ más estables, díméros *No extensibles más estables, NE no es extensible a una temperatura de 37°C.

Prueba con condiciones estándar

Resultados de la RT-PCR multiplex con las condiciones estándar, la cual se observa en la **Figura 1.** En esta PCR se muestra que hay mayor intensidad en las bandas en los amplificados que tiene mayor concentración. Por ejemplo el Pt(12;21) el cual tiene una concentración de 506 ng/µl, en comparación con el amplificado del Pt(1;19) el cual tiene una concentración menor de 102 ng/µl. A partir de esta observación, se determinó que, con la menor concentración, muestra un amplificado de calidad, por ello se decidió realizar los siguientes experimentos ajustando la concentración de todos los plásmidos. Adicionalmente se observaron productos espueros en la parte inferior del gel, para poder reducirlos y mejorar el amplificado se modificó la concentración de los plásmidos a 100 ng/µL y se redujo el número de ciclos a 25.

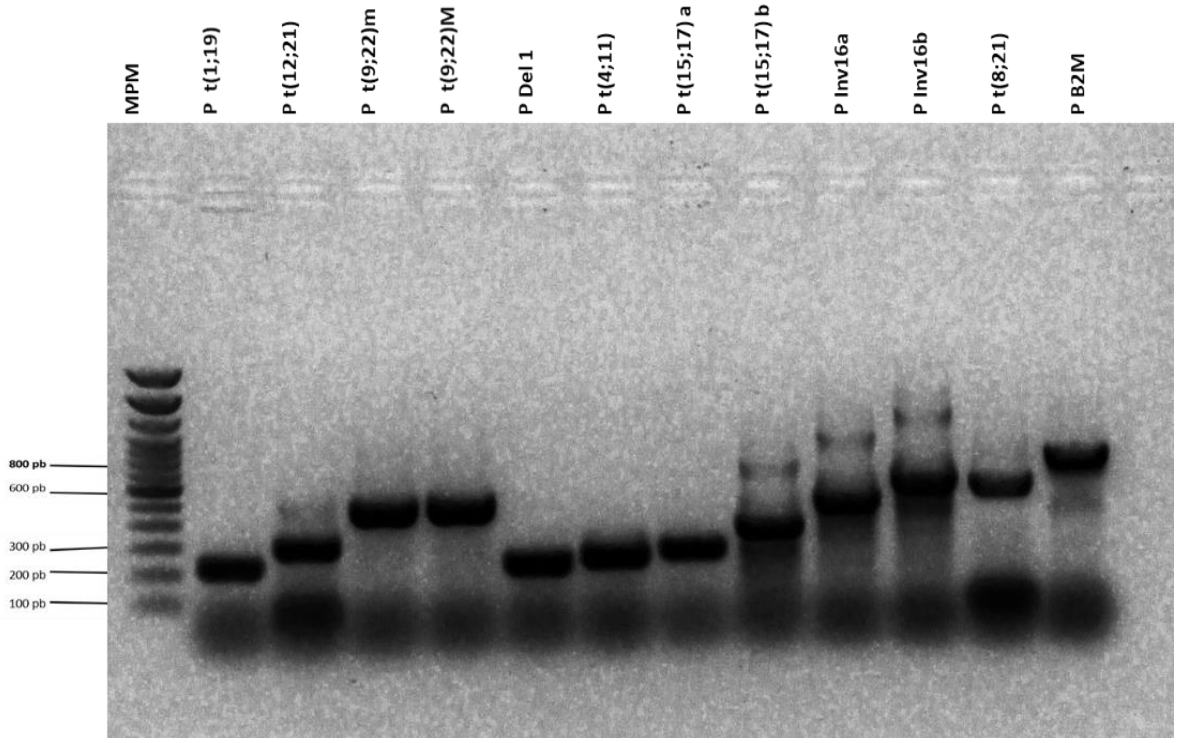


Figura 1. Producto de RT-PCR multiplex de la amplificación de los plásmidos de las translocaciones de LA.

Prueba de ajuste de concentración de plásmidos y número de ciclos

Debido a la intensidad de las bandas de los amplificados por las concentraciones iniciales se decidió ajustar la concentración de los plásmidos a 100 ng/µL, además de reducir el número de ciclos de 28 a 25 bajo condiciones estándar.

En la **Figura 2** se muestran los resultados. Se observó que se logró reducir las bandas de los amplificados, pero se vio que la amplificación del plásmido Pt(1;19) era muy tenue (pozo 2), además de que en los pozos 3 , 12 y 13 donde están los plásmidos Pt(12;21), Pt(8;21) y PB2M no hubo ninguna amplificación y por último en el pozo 9 del Pt(15;17)b se observa que hay dos amplificaciones. Para lograr reducir el amplificado inespecífico que se encontró en el Pt(15;17)b, mejorar el amplificado del Pt(1;19) y que amplificaran los plásmidos Pt(12;21), Pt(8;21) y PB2M, se optó por cambiar la temperatura de alineamiento y aumentar de nuevo el numero de ciclos a 28.

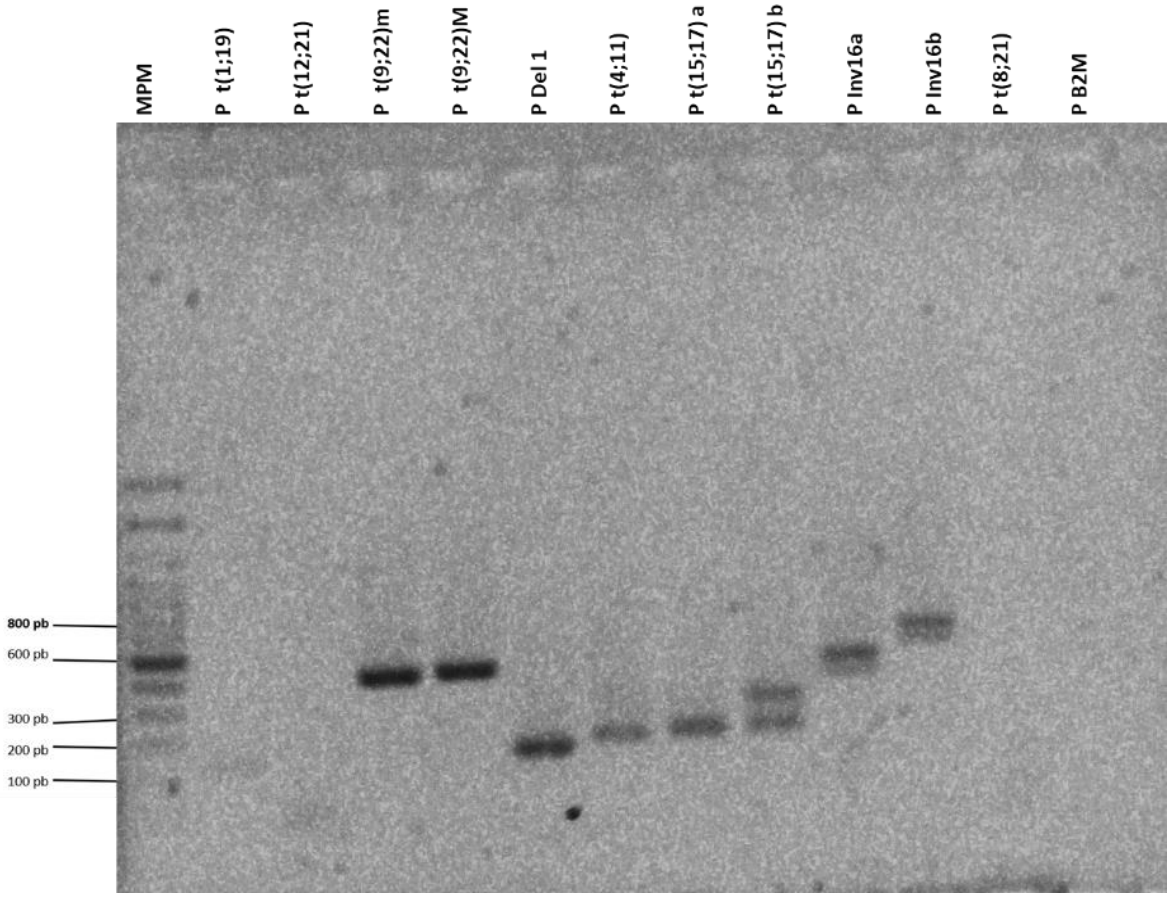


Figura 2. Producto de RT-PCR multiplex de la amplificación de los plásmidos de las translocaciones de LA.

Prueba del cambio en la temperatura de alineamiento

Resultado de la temperatura de alineamiento pasando de 59 °C a 58 °C con la finalidad de que los oligonucleótidos se unan específicamente a la secuencia del plásmido. Los resultados de la PCR se pueden ver en el gel en la **Figura 3,** en la cual se observó que en esta RT-PCR multiplex al cambiar la temperatura de alineamiento a 58 °C se ven menos amplificados no deseados, por lo que se realizaron las siguientes RT-PCR multiplex con estas condiciones.

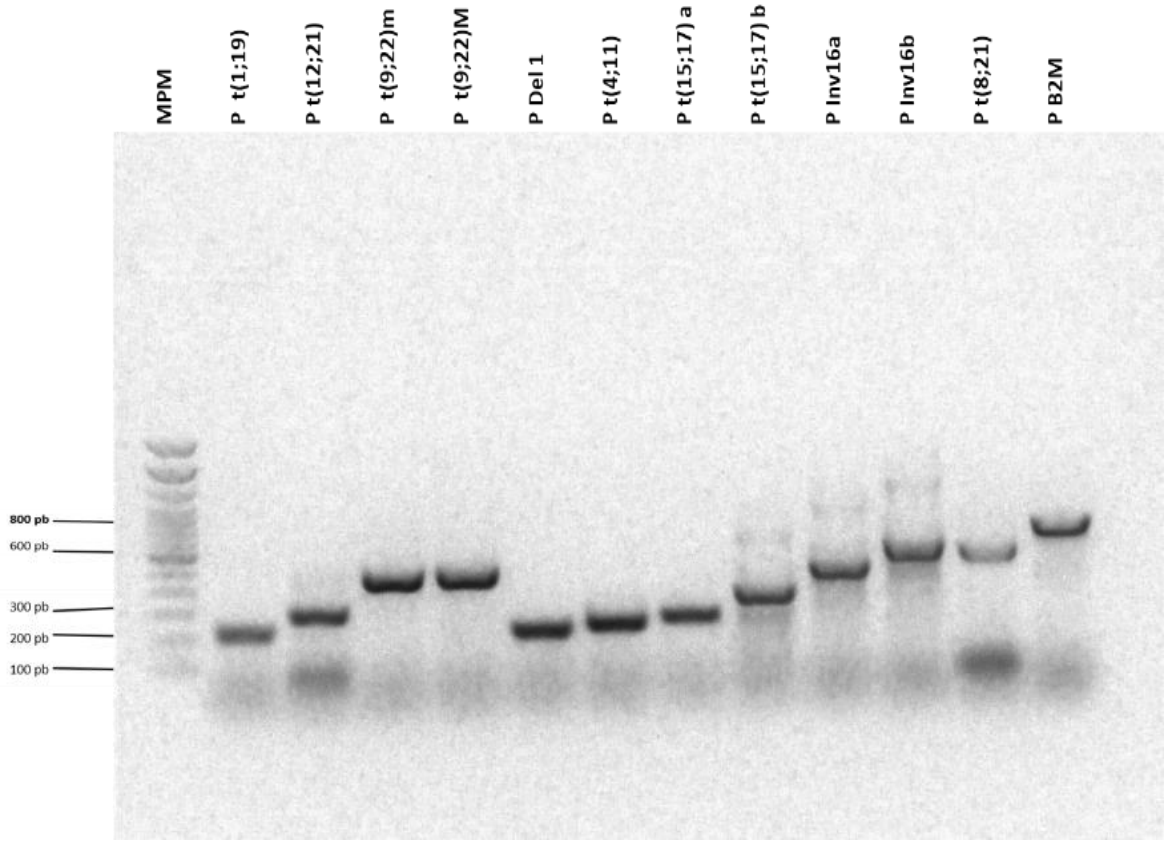


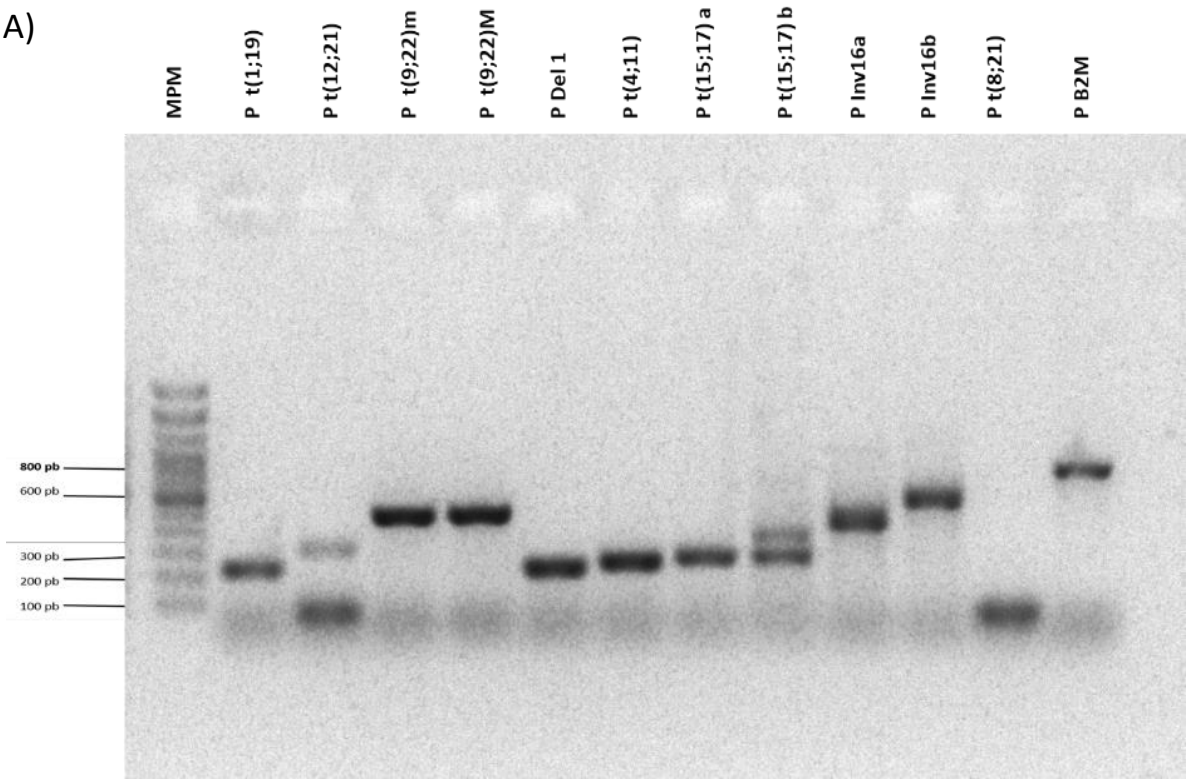
Figura 3. Producto de RT-PCR multiplex de la amplificación de los plásmidos con la mezcla de oligonucleótidos de LA.

Prueba de la concentración de $MgCl_2$

Para eliminar los productos espureos que se encuentran en la parte inferior del gel como referente de la concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$ en la **Figura 3,** se propuso incrementar la concentración del $MgCl_2$. Tambien para evaluar la concentración adecuada para la reacción.

Se aumentó la concentración a 3 y 4.5 mM de $MgCl_2$. En la **Figura 4A** con la concentración a 3 mM de $MgCl_2$ se encontró un amplificado no deseado en el plásmido Pt(15;17)b, además de que el plásmido Pt(8;21) no tiene amplificación y los agregados de los oligonucleótidos siguen apareciendo. Por otro lado, con la concentración de 4.5 Mm de $MgCl_2$ que se muestra en la **Figura 4B,** también aparecen los agregados de oligonucleótidos en el gel, la mayoría de los amplificados se ven más tenues y en los plásmidos Pt(12;21), PInv16a y PB2M no se encontro ninguna amplificación. Es por ello que se decidió continuar con la concentración de 1.5 mM de cloruro de magnesio.

A)



B)

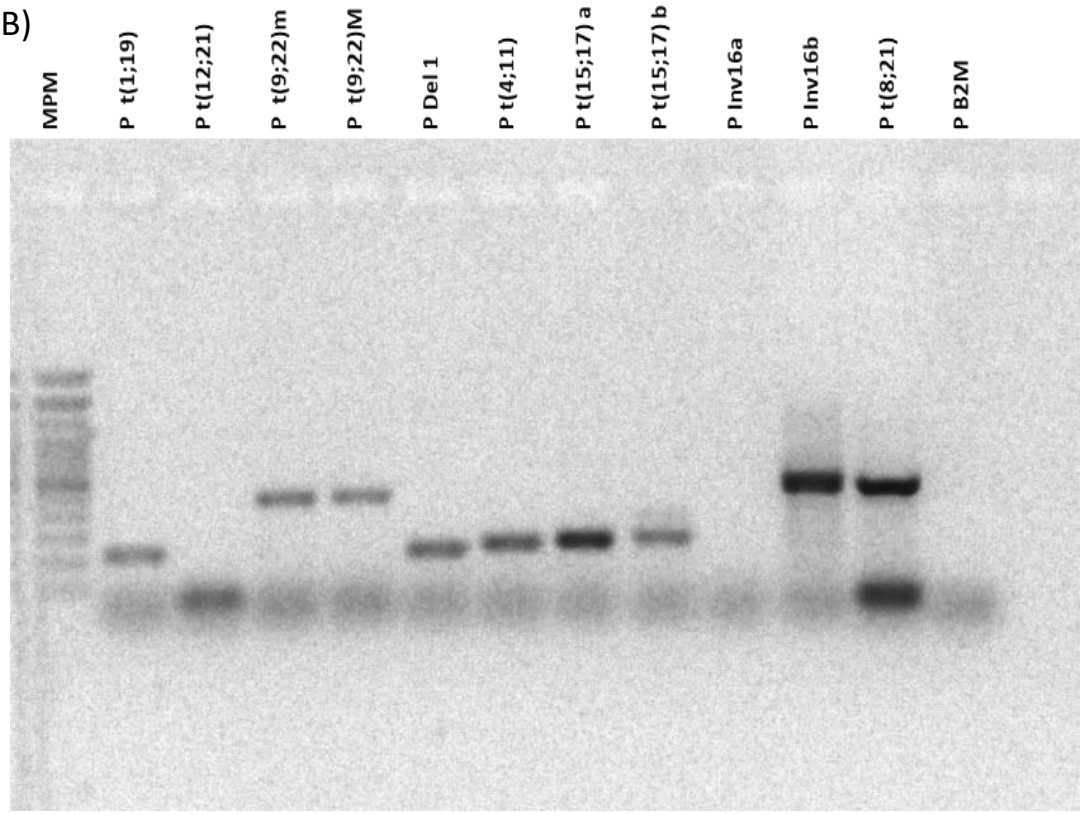


Figura 4. Producto de RT-PCR multiplex de la amplificación de los plásmidos con la mezcla de oligonucleótidos de LA con la modificación de las concentraciones de $MgCl_2$. A) Con concentración de 3 mM de $MgCl_2$. B) Con concentración de 4.5 mM de $MgCl_2$.

Prueba adicionando del control B2M

Considerando que además de la posible translocación la propuesta también estima la detección del control B2M, se decidió agregar el plásmido PB2M a cada una de las mezclas propuestas, el cual presentaría un amplicón esperado de 808 pb.

En la **Figura 5** se puede observar en el pozo 4, 5, 6, 9, 10 y 11 la amplificación del control PB2M, mientras que en los pozos restantes solo se ve la amplificación del plásmido de las translocaciones. En el pozo 9 donde se encuentra la translocación Pt(15;17)b se puede ver tres amplificado, el primer amplificado es el control del plásmido PB2M de 808 pb, el segundo es la translocación Pt(15;17)b con aproximadamente ≈300 pb y la tercera es un amplificado inespecífico no deseado de 400 pb.

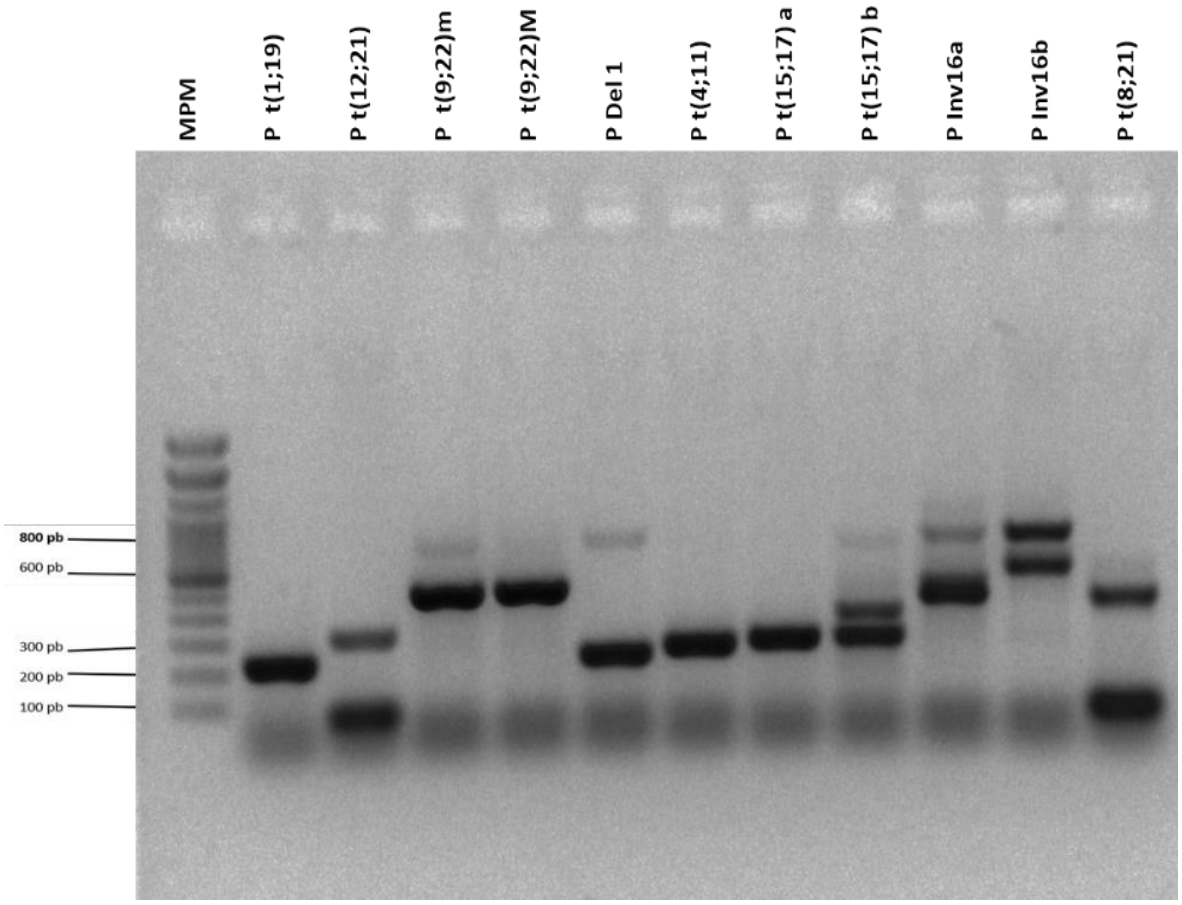


Figura 5. Producto de RT-PCR multiplex de la amplificación de plásmidos con la mezcla de oligonucleótidos de LLA y LMA y con el control P B2M.

Prueba con la mezcla de oligonucleótidos de LA y mezclas por subtipos de LLA y LMA

En el experimento número 2 se realizaron mezclas de oligonucleótidos separando las alteraciones cromosómicas por subtipos de LA que son LLA y LMA como se puede observar en la **Tabla 13 y 14**.

Tabla 13. Mezcla de oligonucleótidos para LLA

Subtipos de LA	Alteraciones cromosómicas	Concentración (µM)
Mezcla de oligonucleótidos LLA	t(1;19)	1.0
	t(12;21)	0.5
	t(9;22)m	0.5
	Del 1	0.5
	t(4;11)	0.5
	B2M	0.25

Tabla 14. Mezcla de oligonucleótidos para LMA

Subtipos de LA	Alteraciones cromosómicas	Concentración (µM)
Mezcla de oligonucleótidos LMA	t(9;22)M	0.5
	t(15;17)a	0.5
	t(15;17)b	0.5
	Inv 6 1	0.5
	Inv 6 2	0.5
	t(8;21)	0.5
	B2M	0.25

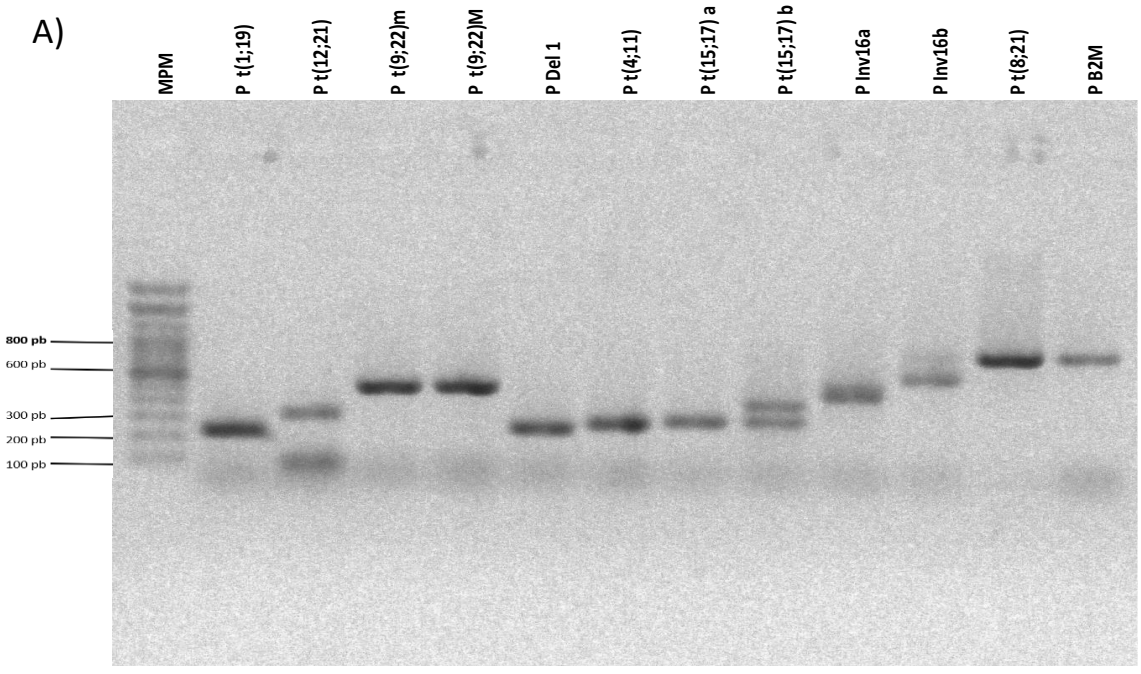
Una vez que se tuvieron las mezclas de oligonucleótidos por subtipo se prosiguió a realizar tres reacciones de RT-PCR multiplex para comparar las mezclas de oligonucleótidos y así poder observar si se podía eliminar las inespecificidades.

La primer RT-PCR multiplex se realizó con la mezcla que contienen todos los oligonucleótidos de los dos subtipos de LA. En la **Figura 6A,** se observa que existe productos espureos y en el pozo 9 en el que se encuentran el plásmidos P7 t(15;17)b dos amplificados.

En la **Figura 6B** se colocaron el producto de la RT-PCR multiplex en los pozos del 2 al 7 los plásmidos Pt(1;9), Pt(12;21), Pt(9;22)m, PDel 1, Pt(4;11) y PB2M con la mezcla de oligonucleótidos del subtipo LLA y del pozo 8 al 14 se colocaron los plásmidos Pt(9;22)M, Pt(15;17)a, Pt(15;17)b, Pinv16a, Pinv16b, Pt(8;21) y PB2M con la mezcla LMA sin el control del plásmido B2M. En este gel comparándolo con el de la **Figura 6A** se pudo observar que amplificaron todas las reacciones y no se encontraron inespecificidades.

Por último, en el tercer gel de la **Figura 6C** los geles se cargaron del pozo 2 al 7 los plásmidos Pt(1;9), Pt(12;21), Pt(9;22)m, PDel 1, Pt(4;11) y PB2M con la mezcla de oligonucleótidos LLA y del pozo 8 al 14 se colocaron los plásmidos Pt(9;22)M, Pt(15;17)a, Pt(15;17)b, Pinv16a, Pinv16b, Pt(8;21) y PB2M con la mezcla de oligonucleótidos LMA y se les agregó a las reacciones el plásmido control B2M.

En este gel de la **Figura 6C** podemos observar que los componentes de la reacción se dirigieron principalmente para la amplificación de las alteraciones cromosómicas, esto es debido a que hay mayor concentración de los oligonucleótidos de las translocaciones que de los controles. Por lo tanto, se determinó que al separar en dos mezclas los oligonucleótidos por subtipos de LA era mejor opción porque así ya no se generaban inespecificidades.



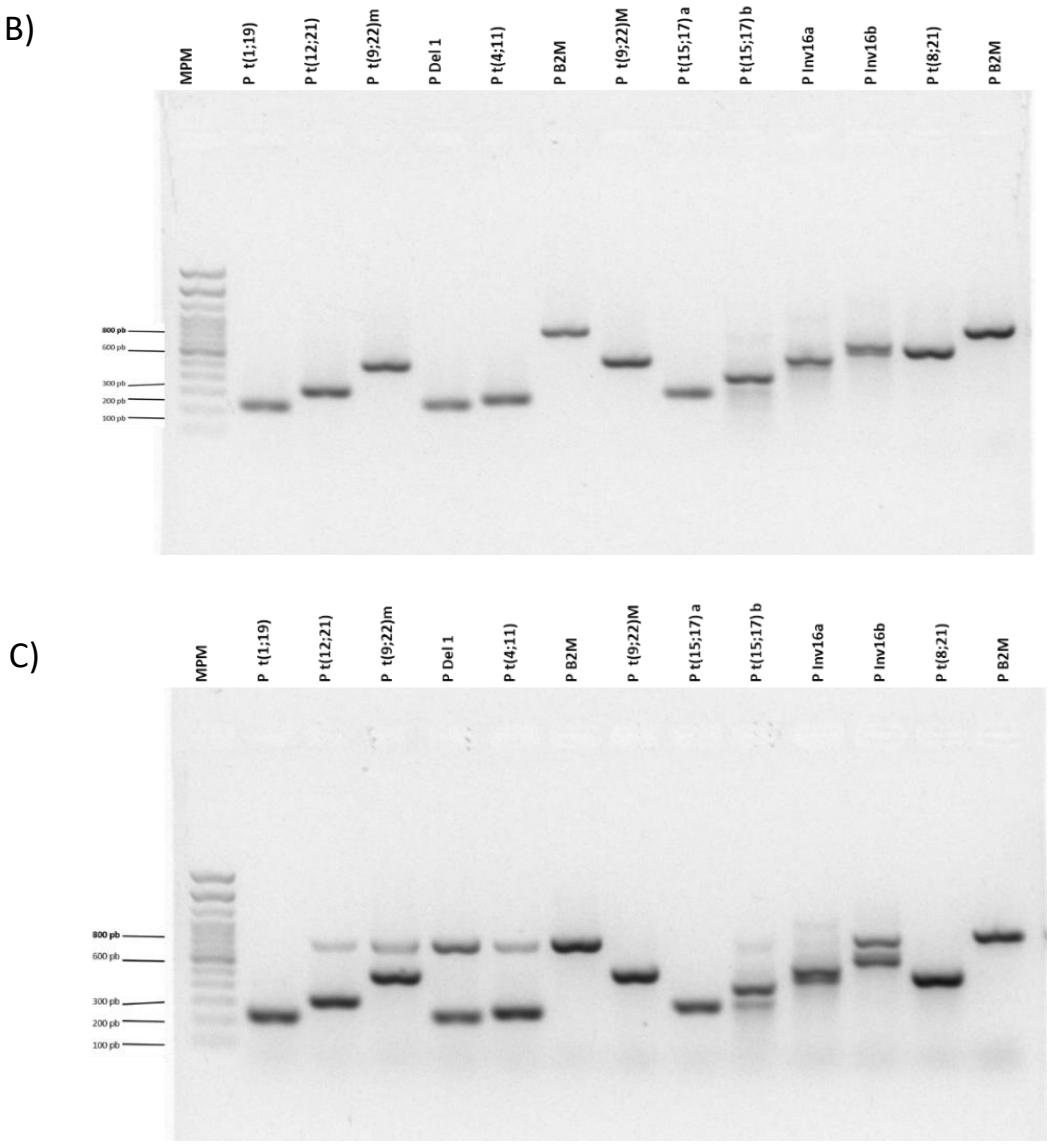


Figura 6. Productos de RT-PCR multiplex de la amplificación de plásmidos de las alteraciones cromosómicas, A) RT-PCR multiplex con la mezcla de oligonucleótidos de LA con el control PB2M. B) PCR multiplex sin el control del PB2M, con las dos mezclas de oligonucleótidos de los subtipos de LA. C) RT-PCR multiplex con el control PB2M (808 pb), con las dos mezclas de oligonucleótidos de los subtipos de LA.

Con la información de los experimentos anteriores de las reacciones de RT-PCR multiplex se probó que las condiciones estándar iniciales fueron las optimas, excepto por la temperatura de alineamiento la cual se modifico pasando de 59°C a 58°C y se obtiene mejor resultado separando las mezclas de oligonucleótidos por subtipo de leucemia aguda (LLA y LMA).

RT-PCR multiplex en muestras de pacientes con leucemia aguda infantil

Una vez que se estableció las condiciones óptimas de la RT-PCR multiplex, se prosiguió a probar la PCR agregando en lugar del plásmido 1 µl de DNA de niños con LA.

Las muestras se seleccionaron de pacientes con un resultado positivo del kit comercial Hemavision® 28N para las alteraciones cromosómicas más comunes y se buscó su muestra de cDNA del paciente para poder probarlo con la RT- PCR multiplex, dentro de los cuales se encontraron muestras de pacientes con las siguientes alteraciones: t(1;19)(q23;p13), t(12;21)(p13;q22), del(1)(p32), t(9;22)(q34;q11) m-bcr, t(9;22)(q34;q11) M-bcr, t(15;17)(q24;q21), inv(16)(p13;q22) y la t(8;21)(q22;q22).

Se realizaron las reacciones de RT-PCR multiplex con la temperatura de alineamiento a 58°C, pero al analizar los geles de agarosa no se encontró ningun amplificado, por lo que se considero que los oligonucleótidos posiblemente no se estaban uniendo correctamente, por ello se decidió incrementar la temperatura a 59°C, en donde se logró obtener mejores resultados, los cuales se muestran a continuación.

Las reacciones de RT-PCR multiplex se realizaron con las mezclas de oligonucleótidos LLA y LMA por paciente, por lo que se obtuvieron dos reacciones que se corrieron en un gel de agarosa. Primero se probaron en un individuo sano cuyo resultado se aprecia en la **Figura 7**. En este gel se observa dos amplificados de 808 pb los cuales corresponden al control B2M.

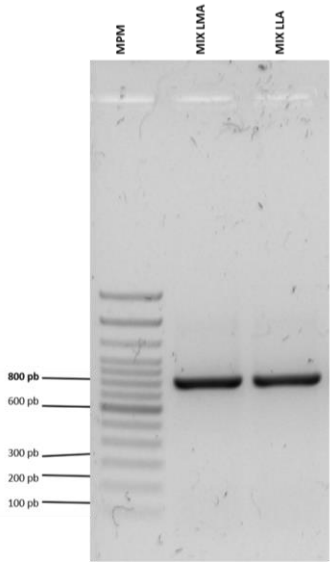


Figura 7. Productos de RT-PCR multiplex de amplificaciones de una muestra de un individuo sano con la mezcla LMA y LLA.

En los resultados de una RT-PCR multiplex nos ayuda a determinar si un paciente tiene LA y cual es su subtipo, pero no se puede determinar cual es la alteración cromosómica en especifico. Esto se debe a que el tamaño del amplificado de una alteración cromosómica puede coincidir con el amplificado de otra alteración, puesto que los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar los diferentes re-arreglos exónicos, los cuales se muestran en la **Tabla 15**.

Un ejemplo es la **Figura 13A** al tener un amplificado en la mezlca LMA con un tamaño de ≈210 pb, puede que el paciente tenga la t(15;17)(q24;q21)b que corresponde al re-arreglo exónico PML ex3 – RARA ex 4 con un tamaño teórico de 218 pb o de la inv(16)(p13;q22) b que corresponde al re-arreglo exónico CBFB ex4 – MYH11 ex31 con un tamaño teorico de 219 pb. Pero al realizar una reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos amplificó la t(15;17)(q24;q21)b dando a conocer así la alteración cromosómica.

Tabla 15. Re- arreglos exónicos

Alteración cromosómica	Re- arreglos exónicos	Amplificado teórico (pb)
t(1;19)(q23;p13)	TCF3 ex13 – PBX1 ex3	253
t(12;21)(p13;q22)	ETV6 ex5 – RUNX1 ex5	130
	ETV6 ex5 – RUNX1 ex4	287
	ETV6 ex5 – RUNX1 ex3	541
	ETV6 ex6 – RUNX1 ex5	273
del(1)(p32)	SIL ex1 – TAL1 ex2	241
t(4;11)(q21;q23)	MLLex8 - AFF1 ex6	265
	MLLex9 - AFF1 ex7	288
	MLLex8 - AFF1 ex5	310
	MLLex9 - AFF1 ex6	397
	MLLex10 - AFF1 ex7	424
	MLLex9 - AFF1 ex5	442
	MLLex10 - AFF1 ex4	1456
	MLLex11 - AFF1 ex4	1570
t(9;22)(q34;q11) m-bcr	BCR ex1 – ABLex3	336
	BCR ex1 – ABLex2	510
	BCR ex6 – ABLex3	984
	BCR ex6 – ABLex2	1158

Alteración cromosómica	Re- arreglos exónicos	Amplificado teórico (pb)
t(9;22)(q34;q11) M-bcr	BCR ex12 – ABL ex 3	238
	BCR ex13 – ABL ex 3	343
	BCR ex12 – ABL ex 2	412
	BCR ex14 – ABL ex 3	418
	BCR ex13 – ABL ex 2	517
	BCR ex14 – ABL ex 2	592
t(15;17)(q24;q21) a	PML ex6 – RARA ex 4	294
t(15;17)(q24;q21) b	PML ex3 – RARA ex 4	218
	PML ex6 – RARA ex 3	692
inv(16)(p13;q22) a	CBFB ex4 – MYH11 ex35	143
	CBFB ex5 – MYH11 ex34	452
	CBFB ex4 – MYH11 ex33	569
	CBFB ex5 – MYH11 ex33	665
inv(16)(p13;q22) b	CBFB ex3 – MYH11 ex31	102
	CBFB ex4 – MYH11 ex32	892
	CBFB ex5 – MYH11 ex32	988
	CBFB ex4 – MYH11 ex31	219
	CBFB ex5 – MYH11 ex31	315
	CBFB ex4 – MYH11 ex30	324
	CBFB ex5 – MYH11 ex30	420
	CBFB ex4 – MYH11 ex29	531
	CBFB ex5 – MYH11 ex29	627
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1 ex5 – RUNX1T1 ex4	322
	RUNX1 ex6 – RUNX1T1 ex4	514
	RUNX 1 ex7 – RUNX1T1 ex4	676
	RUNX 1 ex8 – RUNX1T1 ex4	1152
	RUNX 1 ex6 – RUNX1T1 ex3	652
	RUNX 1 ex7 – RUNX1T1 ex3	814
	RUNX 1 ex8 – RUNX1T1 ex3	1290

(Cuero Quezada, 2018)

Las reacciones de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para cada alteración cromosómica contienen también el control endógeno que realizó Cuero-Quezada en su trabajo de tesis, las reacciones se enumeraron del 1 al 5 para la identificación de la LLA y las reacciones del 6 al 11 son para la LMA como se pueden ver en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Concentraciones para la mezcla de oligonucleótidos específicos de las alteraciones cromosómicas

Subtipos de Leucemia Aguda	Número de reacción	Alteración que identifica	Concentración utilizada (µM)
LLA	1	t(1;19)(q23;p13)	1.0
		B2M	0.25
	2	t(12;21)(p13;q22)	0.5
		B2M	0.25
	3	del(1)(p32)	0.5
		B2M	0.25
	4	t(4;11)(q21;q23)	0.5
		B2M	0.25
	5	t(9;22)(q34;q11) m-bcr	0.5
		B2M	0.25
LMA	6	t(9;22)(q34;q11) M-bcr	0.5
		B2M	0.25
	7	t(15;17)(q24;q21)	0.5
		B2M	0.25
	8	t(15;17)(q24;q21)	0.5
		B2M	0.25
	9	inv(16)(p13;1q22)	0.5
		B2M	0.25
	10	inv(16)(p13;1q22)	0.5
		B2M	0.25
	11	t(8;21)(q22;q22)	0.5
		B2M	0.25

(Cuero Quezada, 2018)

Se obtuvierón 8 muestras de una biblioteca de cDNA de pacientes previamente diagnosticado con LA. Primero se realizó la RT-PCR multiplex, los resultados se muestran en las **Figuras 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 13A, 14A y 15A.** Posteriormente al obtener un amplificado en una de las dos mezclas se prosiguió a realizar la PCR con los oligonucleótidos específicos las cuales se ven en las Figuras **8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B y 15B.**

Pacientes con LLA

Los resultados de las reacciones de RT-PCR multiplex con DNA de pacientes que dieron positivo a LLA se muestran en las **Figuras 8A, 9A, 10A y 11A**.

El resultado de la **Figura 8B** se observa amplificaciones en las reacción 1 lo cual indica la **Tabla 15** que pertenece a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(1;19)(q23;p13). Los amplificados de la reacción 1 tienen tamaños de ≈250 pb, ≈450 pb y ≈600 pb. El amplificado tenue observado con un tamaño ≈250 pb corresponde con la t(1;19)(q23;p13) ya que el re-arreglo exónico TCF3 ex13 – PBX1 ex3 tiene un tamaño teorico de 253 pb.

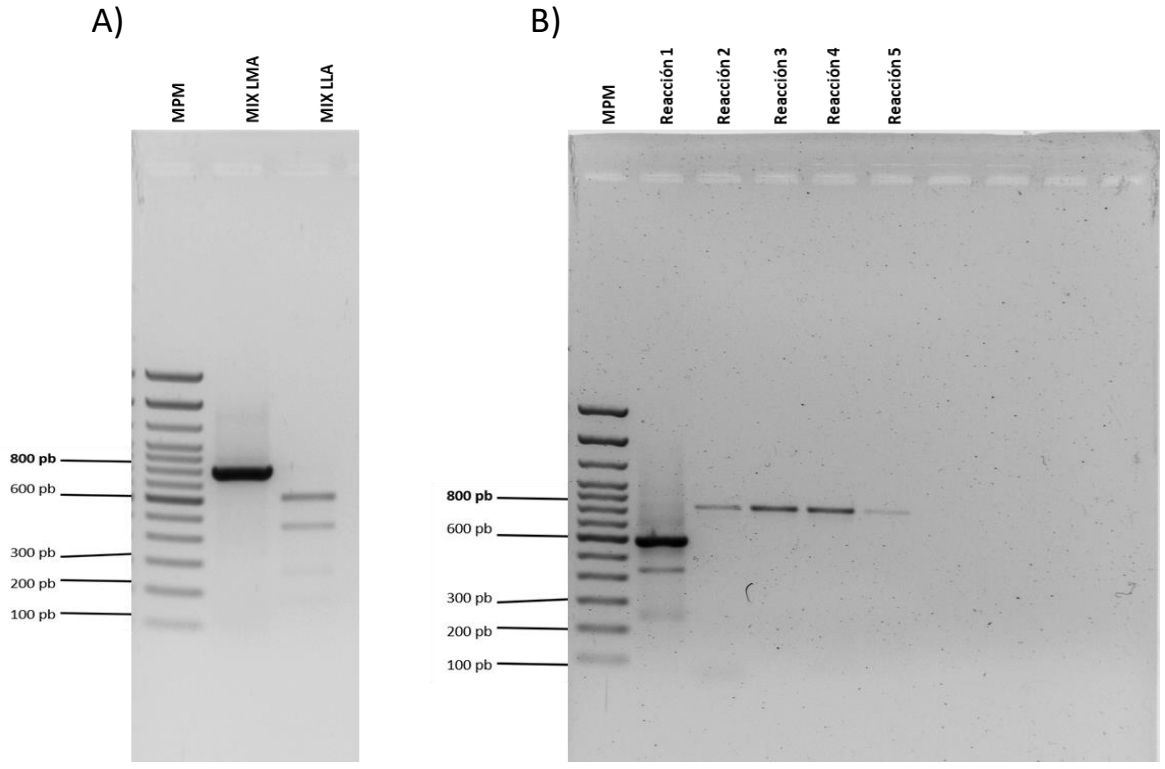


Figura 8. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LLA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(1;19)(q23;p13).

El resultado de la **Figura 9B** muestra una amplificación en la reacción 2 en donde la **Tabla 16** indica que pertenece a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(12;21)(p13;q22).

El amplificado observado tiene un tamaño ≈540 pb, el cual corresponde a la t(12;21)(p13;q22) con el re-arreglo exónico ETV6 ex5 – RUNX1 ex3 con un tamaño teorico de 541 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

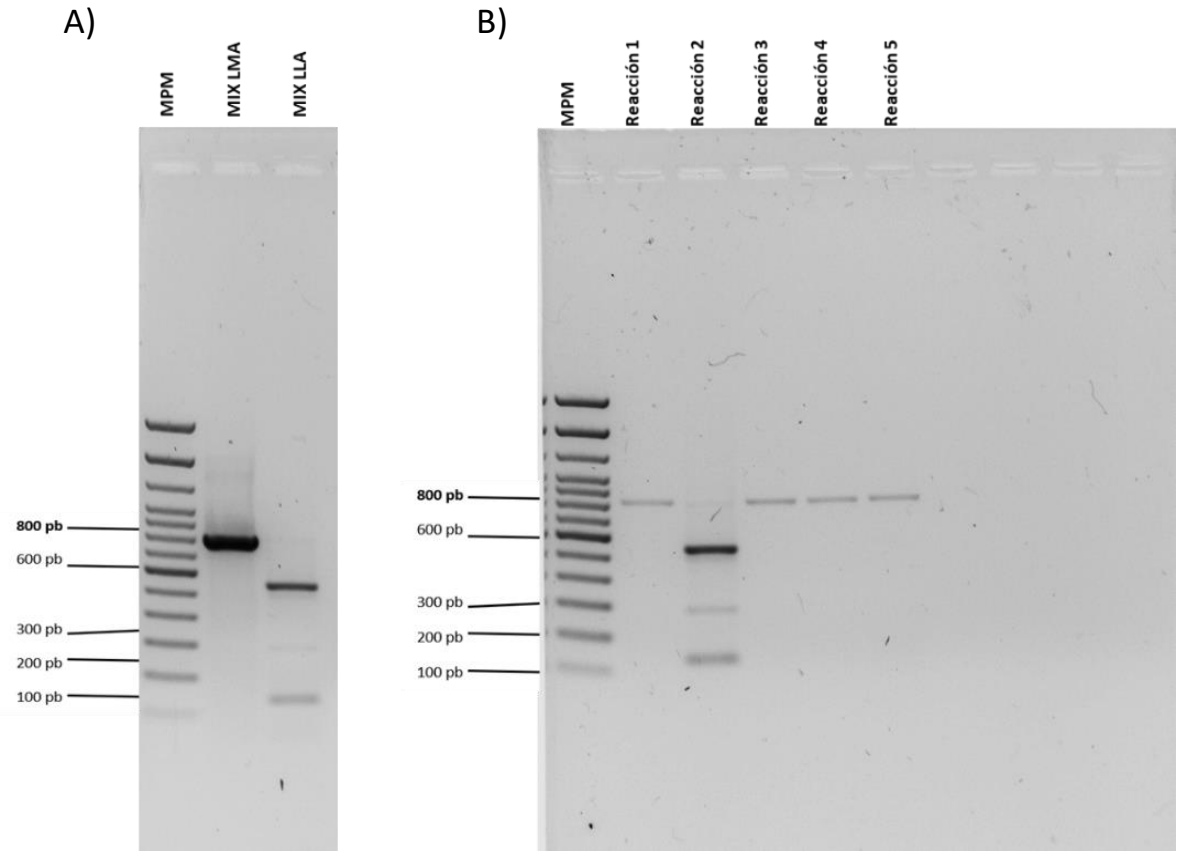


Figura 9. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LLA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(12;21)(p13;q22).

El resultado de la **Figura 10B** se observa una amplificación en la reacción 3 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la del(1)(p32).

El amplificado observado tiene un tamaño ≈240 pb, el cual corresponde a la la del(1)(p32) con el re-arreglo exónico SIL ex1 – RUNX1 ex2 con un tamaño teorico de 241 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

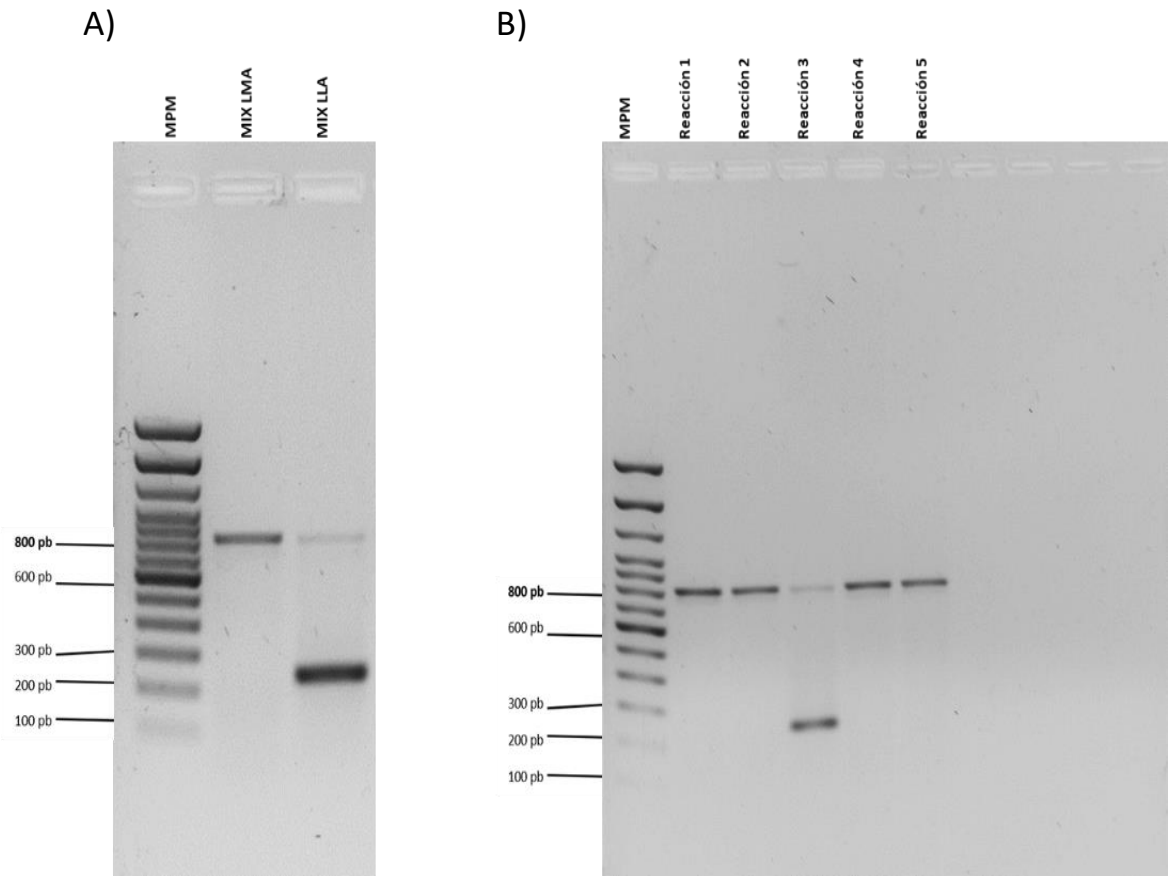


Figura 10. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LLA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la del(1)(p32).

El resultado de la **Figura 11B** se ve una amplificación en la reacción 5 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(9;22)(q34;q11) m-bcr.

El amplificado observado tiene un tamaño ≈500 pb, el cual corresponde a la t(9;22)(q34;q11) m-bcr con el re-arreglo exónico BCR ex1 – ABL ex2 con un tamaño teorico de 510 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

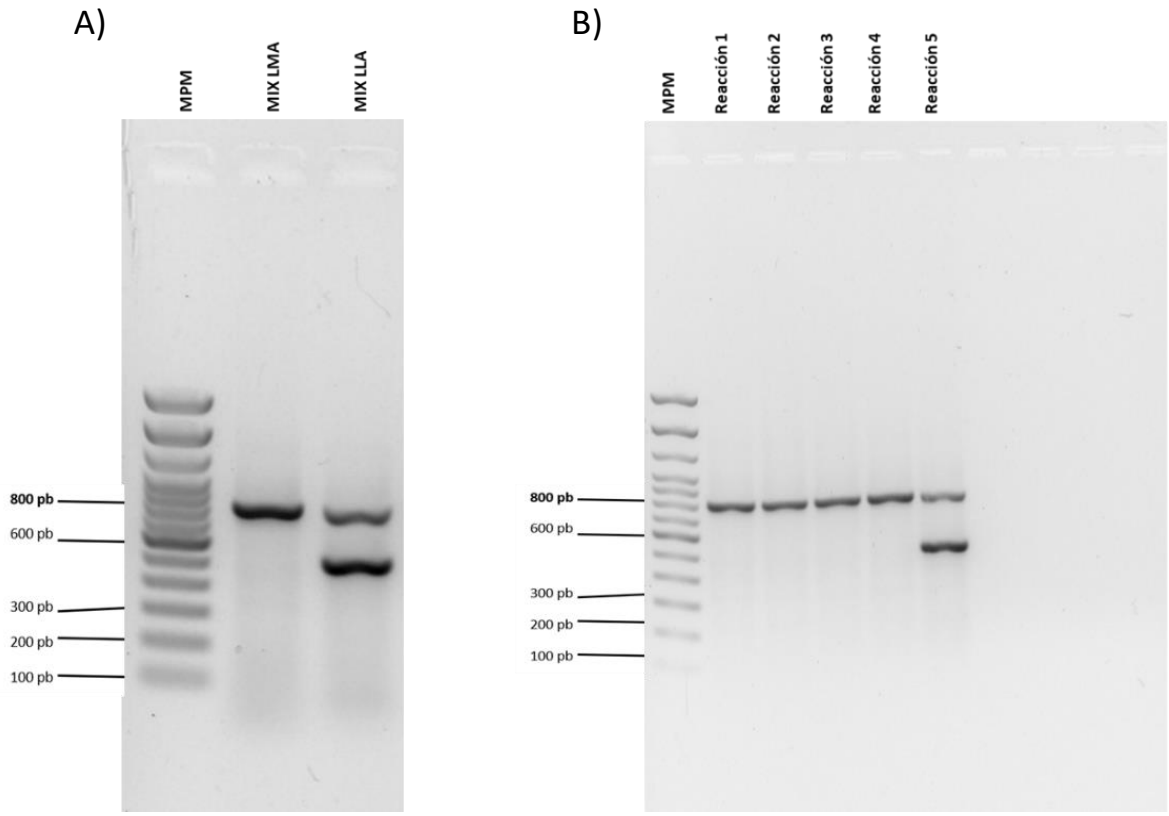


Figura 11. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LLA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(9;22)(q34;q11) m-BCR.

Pacientes con LMA

Los resultados de las reacciones de RT-PCR multiplex con DNA de pacientes que dieron positivo a LMA se muestran en las **Figuras 12A, 13A, 14A y 15A**.

El resultado de la **Figura 12B** se ve una amplificación en la reacción 6 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(9;22)(q34;q11) M-bcr. El amplificado observado tiene un tamaño ≈590 pb, el cual corresponde a la t(9;22)(q34;q11) M-bcr con el re-arreglo exónico BCR ex14 – ABL ex2 con un tamaño teorico de 592 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

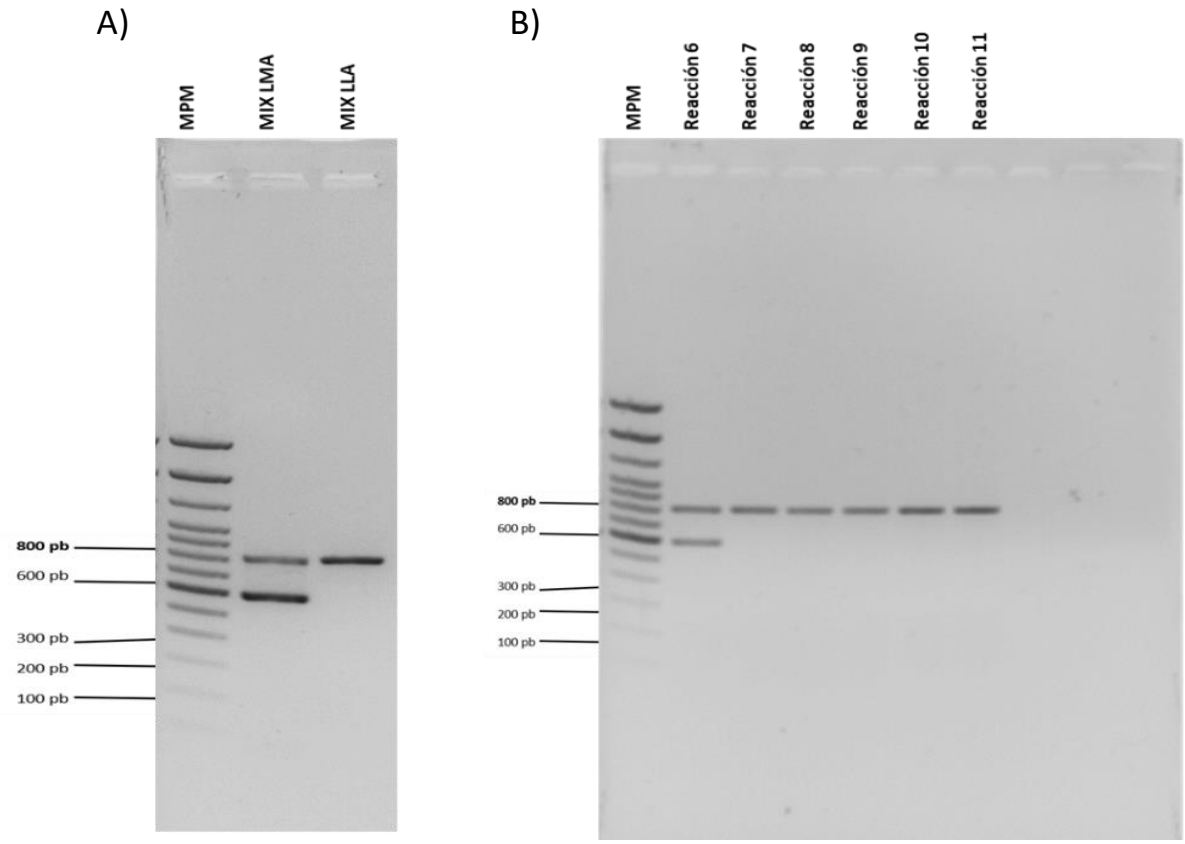


Figura 12. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LMA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(9;22)(q34;q11) M-BCR.

El resultado de la **Figura 13B** se ve una amplificación en la reacción 9 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(15;17)(q24;q21).

El amplificado observado tiene un tamaño ≈210 pb, el cual corresponde a la t(15;17)(q24;q21) con el re-arreglo exónico PML ex3 – RARA ex4 con un tamaño teorico de 218 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

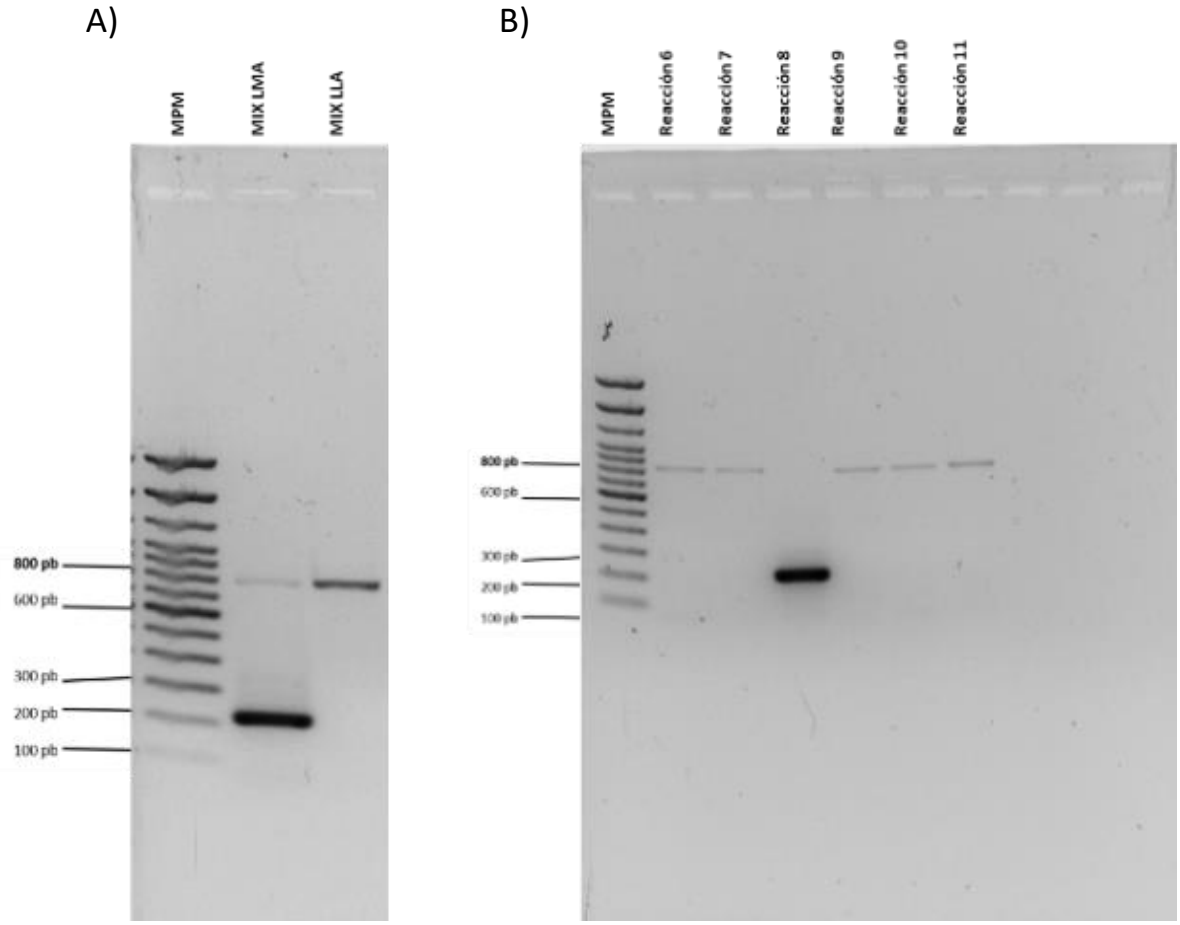


Figura 13. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LMA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(15;17)(q24;q21).

El resultado de la **Figura 14B** se ve una amplificación en la reacción 10 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la inv(16)(p13;q22).

El amplificado observado tiene un tamaño ≈620 pb, el cual corresponde a la inv(16)(p13;q22) con el re-arreglo exónico CBFB ex5 – MYH11 ex29 con un tamaño teorico de 627 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

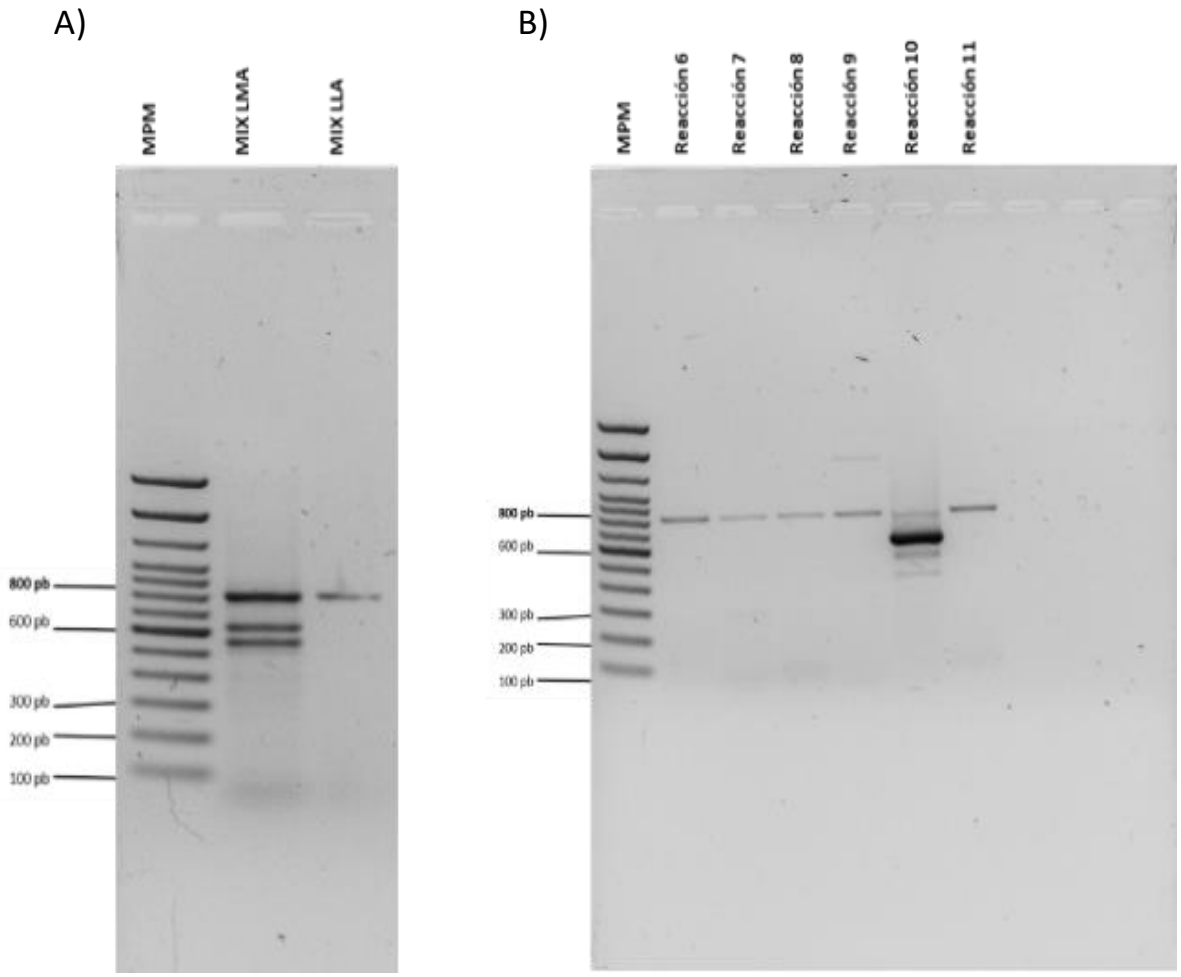


Figura 14. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LMA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la inv(16)(p13;q22).

El resultado de la **Figura 15B** se ve una amplificación en la reacción 11 en donde la **Tabla 16** indica que pertecene a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(8;21)(q22;q22).

El amplificado observado tiene un tamaño ≈500 pb, el cual corresponde a la t(8;21)(q22;q22) con el re-arreglo exónico RUNX1 ex6 – RUNX1T1 ex4 con un tamaño teorico de 514 pb que se muestra en la **Tabla 15**.

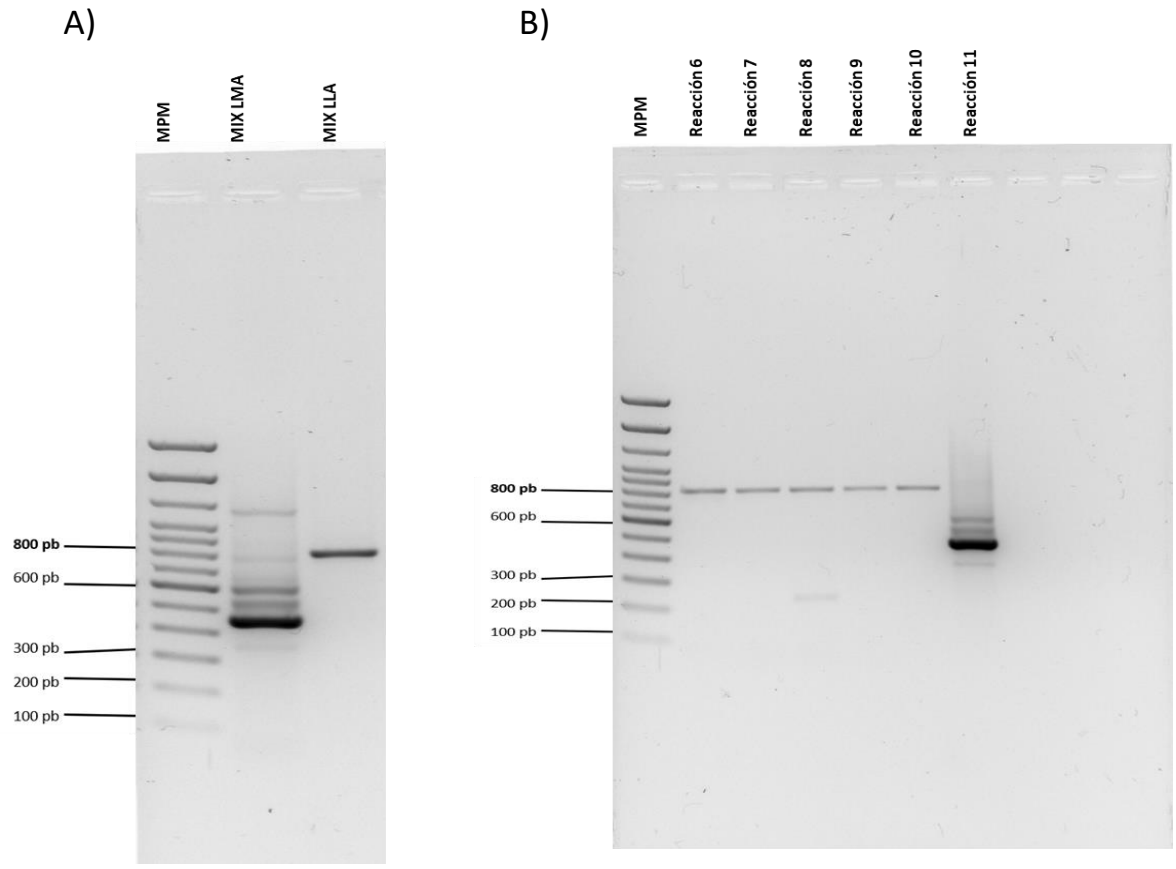


Figura 15. A) RT-PCR multiplex del paciente positivo al subtipo de LMA. B) RT-PCR monoplex del paciente positivo a la t(8;21)(q22;q22).

Los productos de las reacciones de RT-PCR multiplex coinciden con los resultados del kit comercial Hemavision® 28N. Además de que las amplificaciones tienen el tamaño de los re-arreglos exónicos teóricos de las alteraciones cromosómicas. Los parámetros óptimos de la RT-PCR multiplex son: la concentración de $MgCl_2$ al 1.5 Mm, la temperatura de alineamiento de 59 °C, el ciclaje de 28 ciclos y la mezcla de oligonucleótidos por subtipo de leucemia (LLA y LMA).

Discusión

El diagnóstico de la leucemia aguda infantil es multifacético e involucra de forma rutinaria diferentes técnicas moleculares que son: cariotipo, citometría de flujo, FISH y RT-PCR. Cada una de ellas son fundamentales para una evaluación diagnostica integral, que cuando son eficientes permiten realizar un diagnóstico preciso de la LA y estiman el pronóstico que apoyan a tomar mejores decisiones terapéuticas.

Dentro de estas técnicas, la RT-PCR destaca por ser una técnica específica, sensible y rápida diseñada para detectar fusiones de genes específicas para la caracterización de la leucemia. Generalmente se evalúa a través de ensayos monoplex que resultan ser laboriosos y por ende más costosos (Salto et al., 2003).

En el presente trabajo se optimizó una RT-PCR monoplex de 11 reacciones especificas a una propuesta de prueba de RT-PCR multiplex, con el fin de reducir el uso de recursos, la labor y el tiempo invertidos en la determinación. Para asegurar el éxito de la reacción Lorenz menciona que depende de diversos factores que son: el diseño de los oligonucleótidos, concentraciones de los reactivos, temperatura de alineamiento y el ciclaje, es por ese motivo que se tomaron a consideración estos parámetros para la optimización de la prueba.

De acuerdo con la literatura un paso clave para ejecutar una reacción de PCR multiplex es diseñar una combinación optima de conjuntos de cebadores. Es bien sabido que para la PCR convencional el conjunto de oligonucleótidos óptimos tiene los siguientes estándares o propiedades fisicoquímicas: 1) tamaño de los oligonucleótidos: 18-30 pb, 2) tamaño del producto: 100-500 pb, 3) Tm de los oligonucleótidos (Fw y Rv): 58-65°C, con una diferencia de menos ±5°C, 4) Contenido de GC de oligonucleótidos: 40-60%, 5) Energía libre de Gibbs. Sin embargo, existen diversos criterios adicionales que deben tenerse en cuenta al considerar un ensayo de PCR multiplex: 1) Dimerización de cebadores, la cual es medida por la ΔG°, 2) Similitud de las Tms de cada oligonucleótido y 3) Especificidad del oligonucleótido para evitar un cebado erróneo (Shen et al., 2010).

En este caso la interacción de los oligonucleótidos que se obtuvo tanto para la mezcla LA como para las mezclas por subtipos (LLA y LMA) presentaron una ΔG° estable, sus valores más altos para cada mezcla no tuvieron valores menores a -5 kcal/mol para dímeros extensible, ni menores a -6 kcal/mol en dímeros no extensibles, valores que fueron determinados por laboratorios como SIGMA-ALDRICH, además en la literatura mencionan que al tener valores más negativos y más grandes de

la ΔG° indica que existe una afinidad para formar estructuras y es probable que se requiera mucho calor para revertir las interacciones de los oligonucleótidos, por lo que se deben evitar estas estructuras más estables (Benchling, 2003). Sin embargo, al momento de realizar las pruebas en el laboratorio se observó que existían productos espureos y un amplificado no deseado en el Pt(15;17)b en la mezcla LA, esto se puede deberse a dos situaciones. La primera es que se crearon interacciones de oligonucleótidos de dímeros no extensibles tomando en consideración los valores más altos de ΔG° que fueron Fw1221 vs Fw821 -4.99 kcal/mol, Rv1221 vs Fw 1517a -4.21 kcal/mol, Rv1221 vs RvBM -4.64 kcal/mol, Fwm vs Rv821 -4.43 kcal/mol, RvM vs Rvi16b -4.96 kcal/mol, Rv411 vs Fw1517b -4.66 kcal/mol y Rv411 vs Fw821 -5.91 kcal/mol, los cuales no se encuentran en las mezclas de oligonucleótidos por subtipos. Y la segunda es que en el programa PerlPrimer solo se toman a consideración las interacciones entre dos oligonucleótidos, pero al momento de realizar las reacciones de RT-PCR multiplex estas interacciones pueden ser entre más de dos oligonucleótidos o en interacciones en bucles.

Una solución para analizar mejor las interacciones entre los oligonucleótidos puede ser el uso de una herramienta donde se evalúan las interacciones de oligonucleótidos de PCR multiplex llamada Ultiplex basada en la web, la cual puede diseñar de 1- 100 pares de cebadores, evalúa el rendimiento de diferentes pares de cebadores en una sola reacción, filtra y agrupa cebadores multiplexados. Además de ello verifica la compatibilidad para la exclusión de estructuras secundarias mutuas y alineaciones falsas mutuas en todo el genoma. Ofrece argumentos flexibles para que los usuarios definan sus propias referencias, valores de Tm de cebador, longitud del producto, número de objetivos y oligonucleótidos. Finalmente, ofrece informes gráficos de diseño de cebadores, los usuarios no solo pueden diseñar y generar cebadores de PCR multiplex altamente específicos con Ultiplex, sino que también pueden ajustar su estrategia para obtener los grupos de cebadores multiplex óptimos. El informe muestra un resumen del diseño, el filtrado, la agrupación y el rediseño de la información, y los motivos detallados del error en cualquier paso. Según el informe, el usuario puede elegir los cebadores generados o cambiar la estrategia para generar un conjunto de cebadores más específico (Yuan et al., 2021).

Estos diseños se han vuelto indispensables para las nuevas aplicaciones de secuenciación de nueva generación, ya que Ultiplex se puede usar para detectar cualquier área genómica con secuenciación de próxima generación para una especie con un genoma de referencia claro, incluida la

genotipificación, la detección de variaciones asociadas a enfermedades y la identificación de especies. No solo esta aplicación, también otras relacionadas (Yuan et al., 2021).

En cuanto al amplificado no deseado del Pt(15;17)b se intentó erradicar modificando la temperatura de alineamiento pasando de 59°C a 58°C, pero no se logró, aunque con este cambio se vio una mejora en la calidad de los amplificados ya que en un inicio estos eran muy tenues como se ve en la **Figura 2,** en las reacciones donde se colocaron los plásmidos Pt(1;19), Pt(12;21), Pt(8;21) y el PB2M no hubo amplificación, pero al disminuir la temperatura ayuda a que los oligonucleótidos se unieran específicamente a la secuencia del plásmido y mejoraran los amplificados como se muestra en la **Figura 3**. Mubarak et al. mencionan que cuando la temperatura de alineamiento es alta, los cebadores enfrentarán una gran dificultad para hibridarse con éxito con la plantilla de DNA, lo que lleva a minimizar la eficiencia de la PCR, pero al disminuir la temperatura ayuda a que los oligonucleótidos se unan específicamente a la secuencia del plásmido que es lo que se observo que ocurrio en la **Figura 3**.

Esta amplificación no deseada del Pt(15;17)b se eliminó en las mezclas de oligonucleótidos por subtipo, este resultado ayudo a comprender que en la mezcla LA influían las interacciones de oligonucleótidos. Además, los productos espureos se redujeron considerablemente en las mezclas por subtipos esto se debe a que existen menos oligonucleótidos en las mezclas y por ende se reduce la posibilidad de interacciones, que es como mencionan Yuan et al., 2021 que la probabilidad de amplificación inespecífica aumentará a medida que aumente la multiplicidad de PCR.

Por otro lado, se realizó la prueba de concentración de $MgCl_2$ ya que como menciona Tamay de Dios et al. y Lorenz el $MgCl_2$ es importante porque es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la polimerasa, si existe un exceso en la reacción produce amplificaciones inespecíficas de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción del amplificado. Las concentraciones de $MgCl_2$ de una reacción pueden ser de 0.5 a 5 mM, en las soluciones tampón de PCR 10X pueden contener $MgCl_2$ 1.5 mM, lo que se considera suficiente para una reacción de PCR típica, se puede ir agregando por separado a una concentración optimizada para una reacción en particular.

Basandonos en esta información se probarón las concentraciones de 1.5, 3 y 4 mM, en la **Figura 3** donde tiene una concentración de $MgCl_2$ al 1.5 mM se muestran con buena calidad las bandas de los amplificados, aunque mostraban agregados de oligonucleótidos en la parte inferior del gel, en

cambio en **Figura 4A** con la concentración de $MgCl_2$ de 3 mM se lograron ver de nuevo los agregados de oligonucleótidos, además en el Pt(15;17)b mostro un amplificado inespecífico y el Pt(8;21) no hubo amplificación. Por último en la **Figura 4B** donde tienen una concentración de $MgCl_2$ de 4 mM muestran también los agregados de oligonucleótidos asimiso de que no existen amplificados en los plásmidos Pt(12;21), PInv16a y el PB2M, además en la mayoría de las bandas se encontraron con amplificados muy tenues, aunque en esta PCR si amplifico el Pt(8;21).

Se obtuvieron mejores resultados en la RT-PCR multiplex con la concentración de de 1.5 mM de $MgCl_2$, ya que todos los plásmidos tuvieron un buen amplificado. En comparación con las concentraciones de 3 y 4.5 mM en las cuales hubo amplificados no deseados y en parte varios plásmidos no amplificaron, esto pudo ser a que son concentraciones altas del $MgCl_2$ y como menciona Markoulatos et al. puede evitar la desnaturalización completa de la plantilla de DNA al estabilizar la hebra dúplex.

Los resultados de los parámetros óptimos de la RT-PCR multiplex de los experimentos realizados con los plásmidos que se obtuvieron fuerón: la concentración de $MgCl_2$ al 1.5 Mm, la temperatura de alineamiento de 59 °C, el ciclaje de 28 ciclos y la mezcla de oligonucleótidos por subtipo de leucemia (LLA y LMA). Posteriormente se probarón con muestras de niños con LA ya diagnosticados con el kit comercial Hemavision® 28N. Sin embargo, se cambio la temperatura de alineamiento a 59 °C de las reacciones de PCR debido a que los oligonucleótidos no se estaban uniendo correctamente ya que en el gel no se encontraban las bandas de los amplificados.

En los resultados de las reacciones de PCR multiplex de pacientes con LA, se observó que la optimización de la prueba propuesta para la identificación de alteraciones cromósomicas fue exitosa, ya que todas las reacciones se puedo identificar el subtipo. Por utlimo se realizarón las PCR con los oligonucleótidos específicos y se determino su alteración cromosómica.

En los experimentos que se realizaron con las muestras de los pacientes se encontró que existían amplificados no deseados en las reacciones de PCR en las alteraciones cromosómicas t(1;19)(q23;p13), t(12;21)(p13;q22), inv(16)(p13;q22) y la t(8;21)(q22;q22). Esto se debe a al emplear la muestra ya de pacientes tiene un nivel mayor de complejidad comparado con el de los plásmidos en donde se tenía específicamente el fragmento de la alteración. A pesar de que estos resultados parecen poco prometedores, en el kit comercial Hemavision 28N también se observan estas inespecificidades de acuerdo con la experiencia en el laboratorio de hemato-oncología.

En cuanto a los resultados del gel de la **Figura 8B** se observó amplificaciones en las reacción 1 lo cual indica la **Tabla 15** que pertenece a los oligonucleotidos diseñados para detectar la t(1;19)(q23;p13). Los amplificados de la reacción 1 tienen tamaños de ≈250 pb, ≈450 pb y ≈600 pb. El amplificado tenue observado con un tamaño ≈250 pb corresponde con la t(1;19)(q23;p13) ya que el re-arreglo exónico TCF3 ex13 – PBX1 ex3 tiene un tamaño teorico de 253 pb. Este paciente dio positivo con el kit HemaVision 28N a la t(1;19)(q23;p13). Los otros amplificados observados puede tratarse de la isoforma E47 que codifica el locus genético E2A que se produce por el empalme alternativo (Hyndman & Lebrun, 2008).

Existe la posibilidad de que aparezcan otros amplificados que no correspondan con el tamaño propuesto, los re-arreglos exónicos presentes en el trabajo son teóricos, no todos los pacientes que sean positivos hacia alguna de las alteraciones cromosómicas propuestas van a presentar determinado re-arreglo diseñado teóricamente, por lo que cuando se obtenga algún amplificado que no esté presente en el diseño de las secuencias de oligonucleótidos se recomienda realizar una PCR de comprobación utilizando sólo los oligonucleótidos problema, además, para estos será necesaria su secuenciación por tratarse de alguna fusión no propuesta (Cuero Quezada, 2018; Engvall et al., 2020).

Optimizar esta RT-PCR ayuda a que esta prueba diagnóstica sea más accesible a pacientes con LA, ya que el acceso a los servicios de salud es diferente en todos los países. Los países con altos índices de desarrollo tienen tasas elevadas de incidencia de cáncer en menores de 19 años. Sin embargo, en los últimos 30 años, los avances tanto en detección temprana como en tratamiento oportuno han logrado que 90 % de los casos que se presentan en estos países tengan curación (González & Peralta, 2016).

Por otro lado, muchos niños de países con ingresos bajos y medios no logran recibir o completar los cuidados necesarios, resultando en que más de 90 % de las muertes por cáncer en niños ocurren en entornos de bajos recursos. Estas diferencias se deben a diversas razones, entre ellas podemos identificar la falta de conocimiento sobre la enfermedad, diagnósticos tardíos, infraestructura de centros de salud insuficiente, escasez de médicos oncólogos, y muchas otras (González & Peralta, 2016).

Como se había mencionado anteriormente de acuerdo con datos de la OMS, en México, aproximadamente el 75 % por ciento de los casos de cáncer en niñas, niños y adolescentes se diagnostican en etapas avanzadas, lo cual no solo incrementa los costos y dificultades del tratamiento, sino que reduce las posibilidades de cura. Además de que la tasa de supervivencia nacional en niños, niñas y adolescentes con cáncer sea del 57 %, en comparación con la de países desarrollados, donde la probabilidad de que una niña, niño o adolescente con cáncer sobreviva es mayor al 80 % (International Agency for Research on Cancer, 2018).

Por esta razón es relevante reiterar que un gran número de defunciones por LA pueden ser evitables ya que se derivan de la falta de diagnóstico, diagnósticos incorrectos y principalmente, diagnósticos tardíos. Al obtener un buen diagnóstico a tiempo ayuda a actuar de manera preventiva y permite garantizar la calidad del tratamiento de los pacientes (Gaceta del Senado, 2023).

En México, las instituciones públicas y algunas privadas la búsqueda rutinaria de alteraciones citogenéticas y moleculares en cada paciente con LA es limitada por la tecnología y los costos implicados (Zapata et al., 2017).

Al realizar la propuesta de una prueba de identificación de alteraciones cromosómicas comunes por RT-PCR monoplex punto final para pacientes con leucemia aguda infantil, Cuero-Quezada logro crear un método específico, robusto y económico que permite ampliar el acceso de este estudio. En este trabajo se optimizó esta prueba realizado una PCR multiplex, lo que permite ahorrar en reactivos, tiempo además de reducir el costo de la prueba, esto se logró ya que solo se realizan dos reacciones de las cuales permite determinar que subtipo de LA tiene el paciente.

El diagnóstico por Biología Molecular se lleva a cabo mediante RT-PCR haciendo identificación de los genes fusionados característicos de cada alteración cromosómica, aunque es un método sensible el costo de los kits comerciales es muy elevado, algunos precios de los kits comerciales se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Cotización de diferentes kits comerciales para la identificación de alteraciones cromosómicas por PCR. Precio en pesos mexicanos.

Distribuidor	Lagem	Abalat	Abalat	Herrera-Figueroa
Kit	QuanDX 30Q	Hemavision 28N	Hemavision 7N	Presente propuesta
Plataforma	30 alteraciones por tiempo real	28 alteraciones por punto final	7 alteraciones por punto final	8 alteraciones por punto final
Precio kit	63,011.20	130,810.88	110,831.04	4,500.80
Síntesis de cDNA	Incluida en el kit	Incluida en el kit	Incluida en el kit	67,278.65
DNApol	Incluida en el kit	3,536.00	952.00	6,528
Total de kit + DNA pol + síntesis de cDNA	63,011.20	134,346.88	111,783.04	78,307.45
No. de pruebas por kit	10	25	25	320
Precio por prueba	6,301.12	5,373.87	4,471.32	244.71

La Asociación Mexicana de Ayuda a Niños con Cáncer estima que el tratamiento para el cáncer infantil cuesta alrededor de 9 mil pesos semanales en promedio, lo que resulta en 468 mil pesos anuales (Gaceta del Senado, 2023).

El costo de la prueba de diagnóstico molecular para la detección de alteraciones cromosómicas por el kit Hemavision® 28N es de 5,373.87 pesos mexicanos por paciente, si se utilizara la propuesta de la prueba de identificación por PCR multiplex el costo se reduciría a 244.71 pesos mexicanos teniendo un 95.44% de ahorro y permitiendo que el resto se puede emplear para el tratamiento del paciente.

Conclusiones

- Se optimizó los recursos, la labor y el tiempo de la prueba para la identificación de alteraciones cromosómicas más frecuentes en leucemia aguda infantil al pasar de 11 reacciones RT-PCR monoplex a 2 reacciones por RT-PCR multiplex.
- La RT-PCR multiplex es más específica al realizar dos mezclas por subtipo de leucemia aguda.
- Los parámetros óptimos de la RT-PCR multiplex fuerón: la concentración de $MgCl_2$ al 1.5 Mm, la temperatura de alineamiento de 59 °C, el ciclaje de 28 ciclos y la mezcla de oligonucleótidos por subtipo de leucemia (LLA y LMA).

Referencias

Acevedo, A., Santana, E., Arce, H., Pérez, L., Caballero, A., & Sánchez, L. (2009). Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. *Salud Animal*, *31*(1), 50–54.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *37*(2), 1–14. https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876

Advani, A., & Pendergast, A. (2002). Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leukemia Research*, *26*, 713–720.

Aguilar, B., de Leon, R., Pérez, U., Montaño, E., Tereros, E., & Martinez, C. (2010). Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda. *IMSS*, 8. http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/276GER.pdf

Akbari, M., Ebrahimabadi, S., Golalipour, M., Shahbazi, M., & Farazmandfar, T. (2020). The correction of ETV6/RUNX1 translocation in acute lymphocytic leukemia cells: a new gene targeting system by homologous recombination mechanism. *Journal of Applied Genetics*, *61*(1), 67–73. https://doi.org/10.1007/s13353-019-00524-9

Al-Achkar, W., Wafa, A., Ikhtiar, A., & Liehr, T. (2013). Three-way Philadelphia translocation t(9;10;22)(q34;p11.2;q11.2) as a secondary abnormality in an imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patient. *Oncology Letters*, *5*(5), 1656–1658. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1228

Arana, L., Alvarado, M., Silva, L., Morales, A., González, M., Chávez, L., Tena, M., Mojica, L., Zapata, N., Galindo, P., Miranda, M., Morales, A., Silva, K., Grimaldo, F., Hernández, A., Bates, R., Álvarez, J., Tepepa, F., Teomitzi, O., … Ramírez, E. (2022). Consenso de leucemia mieloide aguda en México. *Gaceta de México*, *158*(73), 1–51. https://doi.org/10.24875/gmm.m21000597

Arber, D., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M., Le Beau, M., Bloomfield, C., Cazzola, M., & Vardiman, J. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391–2405. https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544

Aspland, S., Bendall, H., & Murre, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*, *20*(40), 5708–5717. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204592

Benchling. (2003). *Primer design for PCR*. https://www.benchling.com/primer-design-for-pcr

Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, *3*(1), 25–33.

Bruserud, O., Reikvam, H., Hatfield, K., Kittang, A., & Hovland, R. (2011). Acute myeloid leukemia with the t(8;21) translocation: Clinical consequences and biological implications. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*, 1–23. https://doi.org/10.1155/2011/104631

Buckingham, L. (2019). Nucleic acid amplification. In *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, and clinical applications* (Third Edit, pp. 142–165). F.A. Davis Company.

Bueno, C., Montes, R., Catalina, P., Rodríguez, R., & Menendez, P. (2011). Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia*, *25*, 400–410. https://doi.org/10.1038/leu.2010.284

Centro Nacional para la Salud de la Infancia y Adolescencia. (2019). *Cáncer Infantil en México*. Gobierno de México. https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956

Corradi, B., Fazio, G., Palmi, C., Rossi, V., Biondi, A., & Cazzaniga, G. (2008). Efficient detection of leukemia-related fusion transcripts by multiplex PCR applied on a microelectronic platform. *Leukemia*, *22*(2), 294–302. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404987

Cuero Quezada, I. (2018). *Propuesta de una prueba de identificación de alteraciones cromosómicas comunes por RT-PCR para pacientes con leucemia aguda infantil. TESIS*. 1–99.

D'Angio, M., Valsecchi, M., Testi, A., Conter, V., Nunes, V., Parasole, R., Colombini, A., Santoro, N., Varotto, S., Canglia, M., Slivestri, D., Consarino, C., Levati, L., Magrin, E., Locatelli, F., Basso, G., Foà, R., Biondi, A., & Cazzaniga, G. (2015). Clinical features and outcome of SIL/TAL1-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a 10-year experience of the AIEOP group. *Haematologica*, *100*(1), 10–13.

Dorantes, E., Zapata, M., Miranda, A., Medina, A., Reyes, A., del Castillo, H., Cortés, G., Muñoz, O., & Garduño, J. (2012). Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica aguda afiliados al seguro popular, con respecto al desenlace. *Boletin Medico Del Hospital Infantil de Mexico*, *69*(3), 190–196.

Dowdy, C., Xie, R., Frederick, D., Hussain, S., Zaidi, S., Vradii, D., Javed, A., Li, X., Jones, S., Lian, J., van Wijnen, A., Stein, J., & Stein, G. (2010). Definitive hematopoiesis requires Runx1 C-terminal-mediated subnuclear targeting and transactivation. *Human Molecular Genetics*, *19*(6), 1048–1057. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp568

Druker, B. J. (2014). Janet Rowley (1925-2013). *Nature*, *505*(7484), 484. https://doi.org/10.1038/505484a

Eghtedar, A., Borthakur, G., Ravandi, F., Jabbour, E., Cortes, J., Pierce, A., Kantarjian, H., & Garcia Manero, G. (2012). Characteristics of translocation (16;16)(p13:q22) acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, *87*(3), 315–317. https://doi.org/10.1002/ajh.22261

Elnifro, E., Ashshi, A., Cooper, R., & Klapper, P. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, *13*(4), 559–570. https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559-570.2000

Engvall, M., Cahill, N., Jonsson, B., Höglund, M., Hallböök, H., & Cavelier, L. (2020). Detection of leukemia gene fusions by targeted RNA-sequencing in routine diagnostics. *BMC Medical Genomics*, *13*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12920-020-00739-4

Ford, A., & Greaves, M. (2017). Acute Lymphoblastic Leukaemia in Identical Twins. In *RUNX Proteins in Development and Cancer* (pp. 217–228). Springer Natura Singapure. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2

Gaceta del Senado. (2023). *Iniciativa con Proyecto de Decreto por el que se reforman la Ley General Para La Detección Oportuna Del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia y la Ley General de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes; presentada por Senadoras y*

Senadores del Grupo. Senado de La República. https://www.senado.gob.mx/65/gaceta_del_senado/documento/132324

Ghaoui, R., St Heaps, L., Hung, D., Nagabushan, S., Harris, C., Mirochnik, O., Sharma, P., J. Kellie, S., & C. Wright, D. (2018). A Paediatric Acute Promyelocytic Leukaemia Patient Harbouring a Cryptic PML-RARA Insertion due to a Complex Structural Chromosome 17 Rearrangement. *Cytogenetic and Genome Research*, *153*(4), 181–189. https://doi.org/10.1159/000487000

Gobierno de México. (2019). *055. La leucemia representa el 50 por ciento de los casos de cáncer infantil*. Secretaria de Salud. https://www.gob.mx/salud/prensa/055-la-leucemia-representa-el-50-por-ciento-de-los-casos-de-cancer-infantil

González, J., & Peralta, A. (2016). *Iniciativa que adiciona el artículo 41 de la ley federal de presupuesto y responsabilidad hacendaria, suscrita por los diputados Jorge Emilio Gonzáles Martínez y Ana Patricia Peralta de la Peña, de los grupos parlamentarios del PVEM y Morena, respectivame*.

Grimwade, D., Ivey, A., & Huntly, B. (2016). Molecular Landscape Aml. *Blood*, *127*(1), 29–41. https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604496.have

Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., & Loening, S. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, *25*(19), 3957–3958. https://doi.org/10.1093/nar/25.19.3957

Hyde, R., & Liu, P. (2010). RUNX1 repression-independent mechanisms of leukemogenesis by fusion genes CBFB-MYH11 and AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1). *Journal of Cellular Biochemistry*, *110*(5), 1039–1045. https://doi.org/10.1002/jcb.22596

Hyndman, B., & Lebrun, D. (2008). E2A-PBX1. *Encyclopedia of Cancer* (Second, pp. 935–936). Springer.

Imagawa, J. (2018). Switching from all-trans retinoic acid to arsenic trioxide for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *59*(12), 1–3. https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1443333

International Agency for Research on Cancer. (2018). *GLOBOCAN: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018*. World Health Organization. http://globocan.iarc.fr/

Jiménez, G., Carrillo, J., Chaves, M., Jiménez, R., Vargas, M., Campos, L., de la Guardia, A., & Valverde, B. (2008). Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leukemia. *Revista de Biologia Tropical*, *56*(4), 1613–1618. https://doi.org/10.15517/rbt.v56i4.5747

Jimenez, J. J., Chale, R. S., Abad, A. C., & Andrew, V. (2020). *Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature*. *11*(11), 992–1003.

Jiménez, S., Hidalgo, A., & Ramírez, J. (2017). Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, *74*(1), 13–26. http://www.fcarreras.org/es/leucemia-linfoblastica-aguda-infantil_1190335

Klein, K., de Haas, V., Bank, I., Beverloo, H., Zwaan, C., & Kaspers, G. (2017). Clinical and prognostic significance of eosinophilia and inv(16)/t(16;16) in pediatric acute myelomonocytic leukemia

(AML-M4). *Pediatric Blood and Cancer*, *64*(10), 1–7. https://doi.org/10.1002/pbc.26512

Korbie, D., & Mattick, J. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, *3*(9), 1452–1456. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133

Kosmider, O., & Moreau, F. (2006). From mice to human: The "two-hit model" of leukemogenesis. *Cell Cycle*, *5*(6), 569–570. https://doi.org/10.4161/cc.5.6.2577

Kulis, J., Sedek, L., Slota, L., Perkowski, B., & Szczepanski, T. (2022). Commonly Assessed Markers in Childhood BCP-ALL. *Genes*, *13*, 3–13.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2015). Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. In *9a Ed. Elsevier* (pp. 579–628).

Ladines, W., Barragán, G., Luna-Pérez, M. A., Santoyo, A., Collazo, J., Mendoza, E., & Ramos, C. (2016). Morphology of leukaemias. *Revista Médica Del Hospital General de México*, *79*(2), 107–113. https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.007

Lagunas, F. (2016). Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, *15*(3), 150–157. https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.05.007

Leyton, F. (2018). Leucemia mieloide aguda. *Hematología*, *19*(1), 24–40. http://dx.doi.org/10.1016/S0186-159X(08)55002-9

Li, S., Ilaria, R., Million, R., Daley, G., & Van Etten, R. (1999). The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *Journal of Experimental Medicine*, *189*(9), 1399–1412. https://doi.org/10.1084/jem.189.9.1399

Lorenz, T. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, *63*, 1–14. https://doi.org/10.3791/3998

Macey, M. (2007). Flow cytometry: principles and applications. In *Principles of flow cytometry* (First, pp. 1–15). Humana Press.

Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *395*(10230), 1146–1162. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1

Mancero, M., Arellano, K., Santos, K., & Rodríguez, M. (2020). Leucemia linfoblástica aguda diagnostico- Acute lymphoblastic leukemia diagnosis. *Recimundo*, *4*(2), 53–63. https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(2).mayo.2020.53-63

Mannan, A., Muhsen, I., Barraga, E., Sanz, M., Mohty, M., Hashmi, S., & Aljurf, M. (2020). *Genotypic and phenotypic characteristics of acute promyelocytic leukemia translocation variants*. *May*. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.05.007

Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *16*(1), 47–51. https://doi.org/10.1002/jcla.2058

Mayani, H., Flores, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores, P., & Chávez, A. (2007). Hematopoyesis Cancerología 2. *Hematopoyesis*, *2*, 95–107.

Meaburn, K., Misteli, T., & Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Seminars in Cancer Biology*, *17*(1), 80–90. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.008

Méndez, J. R. L., Ceballos, E. C., Alfaro, C. C., Martínez, M. B., Tovar, J. O., Florencia, A., Ibargüen, R., Vera, S. R., Arturo, S., Guerrero, S., Cárdenas, M. S., Paulina, N., Canto, Z., Candelaria, M., Rafael, J., Méndez, L., Nacional, I., San, D. C., Col, F., … F, T. C. P. M. D. (2011). Leucemia Linfocítica Crónica. *Interntional Journal of Cancer*, *6*, 117–120.

Moldovan, E., & Moldovan, V. (2020). Controls in real-time polymerase chain reaction based techniques. *Acta Marisiensis - Seria Medica*, *66*(3), 79–82. https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025

Mubarak, S., Al-Koofee, D., Radhi, O., Ismael, J., & Al-Zubaidi, Z. (2020). An optimization and common troubleshooting solving in polymerase chain reaction technique. *Systematic Reviews in Pharmacy*, *11*(2), 427–436. https://doi.org/10.5530/srp.2020.2.63

Muirhead, K., Hora, P., & Poste, G. (1985). Flow cytometry: present and future. *Nature*, *3*, 337–356.

Palma, J. (2010). Introducción a La biotecnologia. In *Tecnologia del DNA recombinante y genómica* (Segunda ed, Vol. 25, Issue 3). Pearson Educación.

Pane, F., Intrieri, M., Quintarelli, C., Izzo, B., Muccioli, G., & Salvatore, F. (2002). BCR/ABL genes and leukemic phenotype: From molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*, *21*(7), 8652–8667. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206094

Papaemmanuil, E., Rapado, I., Li, Y., Potter, N., Wedge, D., Tubio, J., Alexandrov, L., Van Loo, P., Cooke, S., Marshall, J., Martincorena, I., Hinton, J., Gundem, G., Van Delft, F., Nik-Zainal, S., Jones, D., Ramakrishna, M., Titley, I., Stebbings, L., … Campbell, P. (2014). RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, *46*(2), 116–125. https://doi.org/10.1038/ng.2874

Pérez, J., Santiago, W., Romero, H., & Rodríguez, J. (2018). Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Portafolio Cientifico*, *18*(2), 41–52. https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2018/muv182d.pdf

Pezza, J. A., Kucera, R. K., & Sun, L. (2017). Polymerase Fidelity : What is it , and what does it mean for your PCR ? Introduction : What is fidelity ? *Neb*, *3*, 1–3. https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/polymerase-fidelity-what-is-it-and-what-does-it-mean-for-your-pcr

Piedimonte, M., Ottone, T., Alfonso, V., Ferrari, A., Conte, E., Divona, M., Bianchi, M., Ricciardi, M., Mirabilii, S., Licchetta, R., Campagna, A., Cicconi, L., Galassi, G., Pelliccia, S., Leporace, A., Lo Coco, F., & Tafuri, A. (2019). A rare BCR-ABL1 transcript in Philadelphia-positive acute myeloid leukemia: Case report and literature review. *BMC Cancer*, *19*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5265-5

Ramírez Orellana, M. (2012). Citometría de flujo: qué puede aportar al diagnóstico hematológico en pediatría. *Anales de Pediatria Continuada*, *10*(5), 282–285. https://doi.org/10.1016/S1696-2818(12)70099-9

Rao, R., & Dou, Y. (2015). Hijacked in cancer: The KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nature*

Reviews Cancer, *15*(6), 334–346. https://doi.org/10.1038/nrc3929

Rebouças, E., Costa, J., Passos, M., Passos, J., Hurk, R., & Silva, J. (2013). Real time PCR and importance of housekeepings genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *56*(1), 143–154. https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019

Reckel, S., Hamelin, R., Georgeon, S., Armand, F., Jolliet, Q., Chiappe, D., Moniatte, M., & Hantschel, O. (2017). Differential signaling networks of Bcr-Abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, *31*(7), 1502–1512. https://doi.org/10.1038/leu.2017.36

Reilly, J. T. (2005). Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): A paradigm for understanding leukaemogenesis? *British Journal of Haematology*, *128*(1), 18–34. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05236.x

Rodríguez, I., & Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invensión. *Ciencia UANL*, *VII*, 323–335. http://eprints.uanl.mx/1584/

Rosado, L., Rodríguez, A., Rodríguez, E., Martínez, A., Torres, M., & López, A. (2012). Diagnóstico prenatal citogenético mediante la hibridación in situ con fluorescencia. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecologia*, *38*(1), 1–10.

Rosenstraus, M., Wang, Z., Chang, S., Debonville, D., & Spadoro, J. (1998). An internal control for routine diagnostic PCR: Design, properties, and effect on clinical performance. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(1), 191–197. https://doi.org/10.1128/jcm.36.1.191-197.1998

Rossi, E. (2021). Test diagnósticos: ¿nos basta con considerar su sensibilidad y especificidad? *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, *51*(4), 372–374. https://doi.org/10.52787/FYYW6593

Rubnitz, J., Gibson, B., & Smith, F. (2010). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *24*(1), 35–63. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.11.008

Salim, M., Heldt, F., Thomay, K., Lentes, J., Behrens, Y., Kaune, B., Möricke, A., Cario, G., Schieck, M., Hofmann, W., Davenport, C., Steinemann, D., Schrappe, M., Schlegelberger, B., & Göhring, G. (2022). Cryptic TCF3 fusions in childhood leukemia: Detection by RNA sequencing. *Genes Chromosomes and Cancer*, *61*(1), 22–26. https://doi.org/10.1002/gcc.22998

Salto, M., Shelat, S., Benoit, B., Rennert, H., Carroll, M., Leonard, D., Nowell, P., & Bagg, A. (2003). Multiplex RT-PCR for the detection of leukemia-associated translocations: Validation and application to routine molecular diagnostic practice. *Journal of Molecular Diagnostics*, *5*(4), 231–236. https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60479-5

Sanjuan-Pla, A., Bueno, C., Prieto, C., Acha, P., Stam, R., & Marschalek, R. (2015). *Revisiting the biology of infant t(4;11)-MLL-AF41 B-cell acute*. *126*(25), 2676–2685. https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-667378.A

Seth, R., & Singh, A. (2015). Leukemias in Children. *Indian Journal of Pediatrics*, *82*(9), 817–824. https://doi.org/10.1007/s12098-015-1695-5

Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., & Zhang, C. (2010). MPprimer: A program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, *11*(143),

1–7. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-143

SIGMA. (2010). OligoArchitect™ Online Glossary of Parameters. *Bionucleics*, 2. http://www.gene-quantification.de/oligo_architect_glossary.pdf%0Ahttp://www.gene-quantification.de/oligo%7B_%7Darchitect%7B_%7Dglossary.pdf

Sun, C., Chang, L., & Zhu, X. (2017). Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*, *8*(21), 35445–35459. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16367

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., Kubista, M., & Al., E. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, *3*, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, *2*(2), 70–78.

Tan, T., Zhang, C., & Sanda, T. (2019). Oncogenic transcriptional program driven by TAL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Hematology*, *109*(1), 5–17. https://doi.org/10.1007/s12185-018-2518-z

Tandon, S., Shago, M., Davidson, S., Kanwar, N., Fuligni, F., Shlien, A., Whitlock, J., Villani, A., & Abla, O. (2020). First report of t(5;11) KMT2A-MAML1 fusion in de novo infant acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics*, *248–249*, 31–33. https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.09.004

Tasian, S., & Hunger, S. (2017). Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *British Journal of Haematology*, *176*(6), 1–16. https://doi.org/10.1111/bjh.14474

Technologies Assay. (2010). *HotStarTaq ® PCR Handbook without optimization Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies*. October.

ThermoScientific. (2017). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers 260/280 and 260/230 Ratios*. T042-Technical Bulletin. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf

Thielemans, N., Demeyer, S., Mentens, N., Gielen, O., Provost, S., & Cools, J. (2022). TAL1 cooperates with PI3K/AKT pathway activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *107*(10), 2304–2317. https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279718

Torres, E. (2018). Ventajas y limitaciones de la citogenética en la medicina actual. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, *16*(2), 107–112. https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2018.016(02)107-112

Vagapova, E., Spirin, P., Lebedev, T., & Prassolov, V. (2018). *The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis*. *10*(36), 15–23.

Valencia, M., Nájera, M., Tejocote, I., & Trujillo, V. (2021). *Factores etiológicos de la leucemia linfoblástica aguda infantil Etiological factors of infantile acute lymphoblastic leukemia*. *22*(3), 155–161. https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v22i3.5810

Wang, D., Zhu, G., Wang, N., Zhou, X., Yang, Y., Zhou, S., Xiong, J., He, J., Jiang, L., Li, C., Xu, D.,

Huang, L., & Zhou, J. (2013). SIL-TAL1 Rearrangement is Related with Poor Outcome: A Study from a Chinese Institution. *PLoS ONE*, *8*(9), 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073865

Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2016). Técnicas de biología molecular. In *Biología Molecular del gen* (7ma edició, pp. 154–156). Editorial médica panamericana. https://books.google.es/books?id=1rIBBXQhmCwC&printsec=frontcover&dq=termodinamica&hl=es&sa=X&ei=yCsoVeW1F8GLNvySgqAH&ved=0CCEQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false

Weckerle, A., Santra, M., C.Y.Ng, M., Koty, P., & Wang, Y. (2011). CBFB and MYHII in inv(16)(p13q22) of Acute Myeloid Leukemia Displaying Close Spatial Proximity in Interphase Nucleid of Human Hematopoietic Stem Cells. *Cancer*, *396*(January), 746–755. https://doi.org/10.1002/gcc

Weir, E., & Borowitz, M. (2001). Flow cytometry in the diagnosis of Acute Leukemia. *Cytometry*, *38*(2), 124–138. https://doi.org/10.1002/cyto.990090809

Wiernik, P., Dutcher, J., & Gertz, M. (2018). Neoplastic Diseases of the blood. In E. Freireich, J. Nichol, M. Kinal, & W. Miller (Eds.), *Neoplastic Diseases of the Blood* (Sixth, pp. 155–161). Springer International.

Wiernik, P., Goldman, J., Dutcher, J., & Kyle, R. (2013). Neoplastic diseases of the blood. In H. Nichol, J.; Assouline, A.; and Miller (Ed.), *blood* (Fifth edit, pp. 177–194). Springer New York. https://doi.org/10.1182/blood.v88.7.2442.bloodjournal8872442

Winters, A., & Bernt, K. (2017). MLL-Rearranged Leukemias — An Update on Science and Clinical Approaches. *Frontiers in Pediatrics*, *5*, 11–13. https://doi.org/10.3389/fped.2017.00004

Wöhner, M., Tagoh, H., Bilic, I., Jaritz, M., Poliakova, D., Fischer, M., & Busslinger, M. (2016). Molecular functions of the transcription factors E2A and E2-2 in controlling germinal center B cell and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine*, *213*(7), 1201–1221. https://doi.org/10.1084/jem.20152002

World Health Organization. (2020). Framework: WHO Global Initiative for Childhood Cancer. In *CureAll framework: WHO global initiative for childhood cancer: increasing access, advancing quality, saving lives*. https://apps.who.int/iris/handle/10665/347370

Yuan, J., Yi, J., Zhan, M., Xie, Q., Zhen, T., Zhou, J., Li, Z., & Li, Z. (2021). The web-based multiplex PCR primer design software Ultiplex and the associated experimental workflow: up to 100-plex multiplicity. *BMC Genomics*, *22*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12864-021-08149-1

Yuki, Y., Imoto, I., Imaizumi, M., Hibi, S., Kaneko, Y., Amagasa, T., & Inazawa, J. (2004). Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphobastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Science*, *95*(6), 503–507. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03240.x

Zakaria, Z., Othman, N., Ismail, A., & Kamaluddin, N. (2017). Whole-Exome Sequencing of ETV6 / RUNX1 in Four Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia Cases. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *18*(April), 1169–1175. https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.4.1169

Zapata, M., Sánchez, J., & Angeles, T. (2017). Identification of molecular disorders in pediatric patients with diagnosis of acute leukemia. *Rev Hematol Mex*, *18*(2), 47–57.