

**Instituto Mexicano del Seguro Social  
UMAE CMN La Raza  
Unidad de Investigación Biomédica  
U. N. A. M.**

**Estandarización del gen MLL-AF4  
por RT-PCR en Tiempo Real  
No. de registro: R-2008-3506-1**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado académico en:**

**Especialista en Patología Clínica**

**P R E S E N T A**

**Dra. Milagros Hernández Serrano**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez  
ASESOR DE TESIS: Dr. César Raúl González Bonilla  
ASESOR DE TESIS: Dra. Laura Espinosa Hernández**

**México, D. F.    Noviembre    2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Autorización de Tesis**

### **Directora de Tesis**

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

Investigadora Asociada en la Unidad de Investigación Biomédica en  
Inmunología e Infectología  
Hospital de Infectología  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

### **Asesores**

Dr. César Raúl González Bonilla

Jefe de la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología  
Hospital de Infectología  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Laura Espinosa Hernández

Jefe del servicio de Hematología Pediátrica  
Hospital General  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

## **Directores de Enseñanza**

Dr. Miguel Matamoros Tapia

Jefe de la Dirección en Educación e Investigación en Salud  
Hospital General  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Verónica Gaona Flores

Jefe de la Dirección en Educación e Investigación en Salud  
Hospital de Infectología  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. Jesús Salvador Valencia Sánchez

Jefe de la Dirección de Investigación y Educación en Salud  
Hospital de Cardiología  
Centro Médico Nacional Siglo XXI  
Instituto Mexicano del Seguro Social

## **Profesor Titular de la Especialidad en Patología Clínica**

Dra. Noemí Patricia Castillo Torres

Jefe de la División de Auxiliares Diagnósticos  
Hospital de Cardiología CMN SXXI

## **Lugar donde se realizó el estudio**

Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología  
Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández"  
U.M.A.E.  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

## **Créditos**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología, del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, y en la Unidad de Investigación en Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, bajo la dirección de la Dra. Vilma Carolina Bekker y la asesoría del Dr. César Raúl González Bonilla Jefe de la Unidad de Investigación, la Dra. Laura Espinosa Hernández Jefa del Servicio de Hematología del Hospital General Centro Médico Nacional La Raza, y en colaboración con el M. en C. Carlos Cruz profesor adscrito a la Unidad de Investigación de Genética y Biología Molecular CINVESTAV. El proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación en Salud 3506, el día 22 de Mayo de 2008, con número de registro institucional R-2008-3506-1 ( I.P. 11114452). El alumno fue becario del IMSS con matrícula No. 99364519.

## **Agradecimientos**

- ❖ Mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré Jefe del Servicio de Epidemiología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI por sus valiosas observaciones.
- ❖ Al Dr. Miguel Márquez Quezada, Jefe del Servicio de Genética del Hospital General del CMN La Raza, por su apoyo en el enlace a la Unidad de Genética y Biología Molecular CINVESTAV
- ❖ Al M. en C. Carlos Cruz Investigador de la Unidad de Genética y Biología Molecular CINVESTAV, gracias por la ciencia básica.
- ❖ A la Dra. Laura Espinosa Hernández Jefa del Servicio de Hematología del Hospital General CMN La Raza Instituto Mexicano del Seguro Social, por el apoyo desde mi formación como residente.
- ❖ Al Dr. Miguel Matamoros Tapia Jefe de la Dirección en Educación e Investigación en Salud del Hospital General CMN La Raza, por el apoyo al tomar las riendas de la especialidad en Patología Clínica en momentos difíciles, pero sobre todo por ser justo. Gracias.
- ❖ A la Dra. Verónica Gaona Jefe de la Dirección en Educación e Investigación en Salud Hospital de Infectología CMN La Raza, por su orientación en la gestión del presente protocolo.
- ❖ Al Dr. Jesús Salvador Valencia Sánchez Jefe de la Dirección de Investigación y Educación en Salud del Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, gracias por su atención.
- ❖ Al Dr. Ángel Guerra Márquez Jefe del Área Clínica del Banco de Sangre del CMN La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, por la donación de muestras de sangre de cordón umbilical aportadas para la realización de este estudio, en especial, gracias a Elizabeth.
- ❖ A todos los alumnos y maestros de la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología, del Hospital de Infectología del CMN La Raza, en especial a Alice.
- ❖ Al Dr. César Raúl González Bonilla, y a la Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez por su apoyo para la realización y conclusión del presente protocolo. Promesa cumplida. Gracias.

## **Dedicatorias**

*A mi padre, madre y hermanos incluidos los nuevos integrantes de la familia,  
mis sobrinos Ivonne Fernanda, Paul Eduardo y Jázmin.*

*A mi Yillo*

*A Ricardo*

*A todos los niños del servicio de Hematología Pediátrica con leucemia, que  
dentro de su difícil situación comprendieron la importancia de compartir un  
poco de ellos para ayudar a otros. El valor para enfrentar la vida y lo que les  
espera de ella son ejemplo a seguir.*

## Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de blastos con traslocación t(4;11)(q21;23)	14
Figura 2. Estadios madurativos del linfocito B	16
Figura 3. Origen de las traslocaciones en la infancia	18
Figura 4. Esquema del gen MLL-AF4	19
Figura 5. Proceso leucémico asociado al gen MLL-AF4	20
Figura 6. Esquema del gen MLL	21
Figura 8. Esquema del gen AF4	22
Figura 9. Algoritmo metodológico	28
Figura 10. Integridad de RNA	30
Figura 11. Integridad de cDNA	32
Figura 12. Gradiente de temperaturas	36
Figura 13. RT-PCR pacientes	37
Figura 14. Curva de disociación positiva al gen MLL-AF4	38
Figura 15. Curva de disociación negativa al gen MLL-AF4	49
Figura 16. Curva de disociación del gen GAPDH	40
Figura 17. Confirmación de amplicones en gel de azarosa	41
Figura 18. Amplificación en Tiempo Real de pacientes	42
Figura 19. Curva de disociación paciente negativo	44
Figura 20. Estandarización de cDNA	45
Figura 21. Comparación de curvas de disociación	46
Figura 22. Amplificación control interno RT-PCR en Tiempo Real	47
Figura 23. Presencia del gen MLL-AF4 por grupos de edad	49

## Índice de Tablas

Tabla 1. Principales subtipos biológicos de las leucemias	15
Tabla 2. Descripción de reactivos	31
Tabla 3. Especificaciones mezcla	33
Tabla 4. Especificaciones de primers	34
Tabla 5. Kit 2X Quantitec Syber Green PCR Master Mix	35
Tabla 6. Cuadro de 2x2	43

## Resumen estructurado

**Objetivo:** Estandarizar y evaluar la utilidad de la detección del gen de fusión MLL-AF4 por medio de RT-PCR en Tiempo Real.

**Diseño del estudio:** Estudio de evaluación de prueba diagnóstica fase I-II, transversal, descriptivo.

**Marco de referencia:** La detección del gen de fusión MLL-AF4 durante el curso clínico de las leucemias agudas linfoblásticas tiene una implicación pronóstica, por lo que es necesario implementar pruebas diagnósticas que presenten mayores beneficios en relación a los estándares conocidos. Actualmente la detección de los genes de fusión se realiza a través de RT-PCR convencional conocida como la prueba estándar de referencia, sin embargo ante el actual y cada vez mayor conocimiento del comportamiento molecular de las leucemias, se hace necesario contar con pruebas orientadas a eficientar la identificación de los eventos moleculares de interés clínico, lo que puede lograrse a través de RT-PCR en Tiempo Real siendo necesario valorar su utilidad a través de procesos de estandarización y validación que puedan ser aplicados en la práctica clínica estratificando grupos de riesgo susceptibles.

**Material y Métodos:** Se realizó la estandarización de la detección del gen MLL-AF4 y el gen GAPDH como control interno de la integridad del DNA complementario (cDNA), a través de RT-PCR tiempo real con Syber Green I utilizando la línea celular RS4 positiva a la traslocación, y la línea celular HL60 negativa a la traslocación. Estandarizadas las condiciones óptimas para la detección de la traslocación de interés, se procedió a procesar 30 muestras de sangre periférica - 20 criopreservadas - provenientes de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda en cualquier estadio de la enfermedad y 30 muestras de sangre de cordón umbilical.

**Resultados:** Mediante curvas de disociación se realizó la identificación del gen MLL-AF4 y el gen GAPDH siendo reproducibles y específicos, confirmadas mediante RT-PCR convencional, actual prueba estándar. Catorce muestras del grupo de pacientes y dos muestras de cordón umbilical fueron positivas al gen MLL-AF4. La sensibilidad y la especificidad fueron calculadas mediante teorema de Bayes siendo de 100% y 93% respectivamente, con in IC del 95% y valor alfa de 0.05%. Una de las muestras negativas pertenecía a un paciente con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica positivo al gen MLL-AF4, actualmente en vigilancia, y una de las pruebas positivas correspondía a una paciente con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica sin respuesta al tratamiento, actualmente en protocolo de trasplante.

**Conclusiones:** Se estandarizó y validó un ensayo de identificación de expresión de genes de fusión por medio de RT-PCR-Tiempo Real monocromático, que permite la identificación de amplicones específicos basados en sus características de punto de fusión visualizadas por medio de curvas de disociación. RT-PCR en Tiempo Real tiene la ventaja de otorgar un valor a cada muestra amplificada, es más rápida, y aunque presenta la misma sensibilidad que la prueba estándar, la identificación del gen MLL-AF4 por RT-PCR en tiempo real tiene como propósito la cuantificación de los transcritos que puede ser utilizado para calcular dosificación génica y establecer terapia ajustada al riesgo pronóstico.

## Structured abstract

**Objective:** The main aim of this work was to detect, optimize and evaluate the utility of detecting the MLL-AF4 fusion gene by Real Time-PCR technique.

**Experimental Design:** Evaluation and diagnose for phase I-II test, transverse, descriptive.

**Introduction:** The detection of MLL-AF4 fusion gene during clinical outcome of the acute lymphoblastic leukemias have a pronostic implication, therefore is necessary to optimize and standarize diagnostic test that probe to be a improbe test then the technique currently in use. At present the detection of fusion genes is performed by convencional Real Time PCR know as the Standard test referente. However, on the onset of major improvement in molecular technology for the detection of leucemias, its necessary to implement new and improved assays that Hill help detect clinical events of relevante. This can be achieved by using Real time PCR, the evaluation and performance of this test applied by using laboratory and clinical routine, can be of major in the stratification of susceptible gropus at risk.

**Methods and Materials:** Thirty simple from patientes with acute lymphoblastic leukemia and thirthy umbilical cord blood donor simples were tested for the MLL-AF4 fusion gene. Real Time-PCR Syber Green I was optimize and standardize for the detection of MLL-AF4 fusion gene. GAPDH gene was used as a internal control for the DNA integrity. RS4 and HL60 cell line were used as a positive and negative control respectively. The amplification plots obtained were further analyzed for positive and negative detection.

**Result.** Dissociation curves were analyzed for the identification of the GAPDH control, gene and MLL-AF4 fusion gene, this were also confirmed by conventional PCR and run in a 1% agarose gel for confirmation. Fourteen (46%) simples from the patient group and two (6%) from the umbilical cord blood were positive positive to the MLL-AF4 fusion gene. The specificity and sensitivity were calculated according to the Bayes theorem, were 100% and 93% respectively, IC of 955 and alpha value of 0.05%. One of the simples negative to the MLL-AF4 fusion gene was from a patient diagnose with acute lymphoblastic leucemia Vich showed no response to the treatment is now awaiting transplant.

**Conclusion:** Assay for detection was standarize and valited for the expresion of MLL-AF4 fusion gene by Real Time PCR, this tecnique helps to amplify the specific amplicons based on their characteristic fusion points and can be observed and analyze in dissociation curves. Real Time-PCR has advantage of showing a value for each individual simple amplify and is a master technique when compare to convencional PCR. Ever thoug both assays showed the same sensibility, the gene product can be cuantified and gene dosification can be calculated. This approach is usefull were therapy adjustment is need and can be applied for pronostic risk groups.

## Introducción

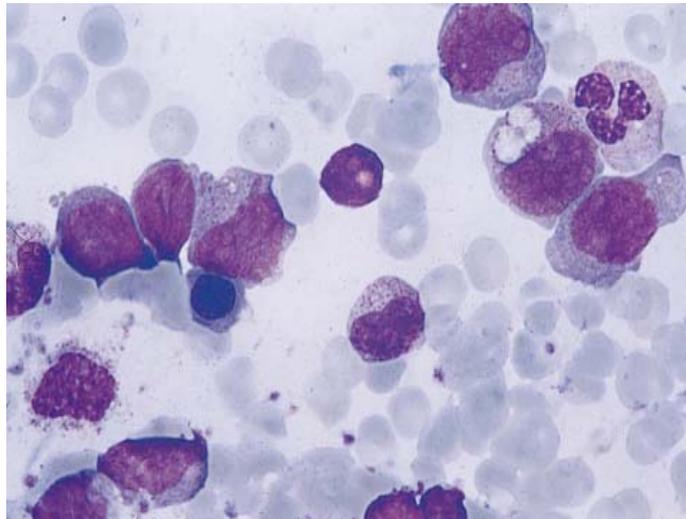
La detección de genes de fusión involucrados en el desarrollo de las leucemias tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas dentro de los actuales protocolos de tratamiento, lo que hace necesario el contar con pruebas diagnósticas rápidas, sensibles y específicas que otorguen un resultado confiable para el propósito mencionado. El análisis de la expresión de genes de fusión se basa en el diseño de primers colocados en los sitios opuestos a las regiones del punto de ruptura con el objetivo de que el producto de PCR contenga la secuencia de fusión específica. Debido a que el punto de ruptura tiene una amplitud de 10 Kb o más, es difícil cubrirlo por DNA PCR de rutina ya que esto implicaría que el sitio preciso de la recombinación a nivel de DNA tenga que ser determinado de forma individual para cada paciente con el objetivo de realizar un análisis sensible por PCR. Sin embargo en la mayoría de las leucemias, el gen fusionado es transcrito en un RNAm el cual sirve como blanco antes de la transcripción reversa (RT) a cDNA. Tal es el caso del gen de fusión MLL-AF4 el cual es considerado un oncogén funcional durante la historia natural de las leucemias, cuya identificación a cualquier edad - independientemente de otros factores involucrados-, es considerada de mal pronóstico (1). Su utilidad clínica se basa en su condición de factor pronóstico, y en la detección de enfermedad mínima residual en leucemia aguda linfoblástica. La monitorización de los niveles de expresión del gen MLL-AF4 durante y después del tratamiento es con la finalidad de identificar la presencia de remanentes de células leucémicas y ha demostrado tener una mayor significancia en relación a la efectividad de la terapéutica empleada.

Tradicionalmente la presencia o ausencia de las traslocaciones se realiza a través de estudios citogenéticos, y la monitorización del tratamiento y enfermedad mínima residual por medio del inmunofenotipo. Sin embargo en la última década el advenimiento e integración de pruebas de biología molecular ha eficientado el análisis de expresión de genes a través de su amplificación por medio de Retrotranscripción de la Polimerasa Reversa (RT-PCR) y últimamente por PCR en Tiempo Real (TR-PCR) que ofrece la mayor sensibilidad, especificidad, rapidez y reproducibilidad de resultados (2)

Debido a que existen diversos factores que tienen influencia en el resultado, es necesario establecer criterios de normalización, control de calidad y un adecuado proceso de estandarización que se describen en el presente protocolo con el objetivo final de otorgar un beneficio máximo al paciente y aportar un elemento diagnóstico al médico tratante.

## Leucemias

Las leucemias son consideradas tumores líquidos de origen hematopoyético, caracterizadas por presentar proliferación neoplásica debidas a mutaciones somáticas de cualquier célula del tejido sanguíneo y cuya clasificación está en relación a la célula de la cual se origina la enfermedad. Se presenta con acumulación de células anormalmente inmaduras denominadas blastos (3) (ver figura 1) en sangre periférica y médula ósea, que conservan intacta la capacidad de división y proliferación pero que han perdido la capacidad para diferenciarse en células hematopoyéticas maduras (4). Etiológicamente se asocian a la exposición a radiaciones, benceno, inhibidores de la topoisomerasa II, solventes orgánicos, productos derivados del petróleo, pesticidas, herbicidas y alcoholismo materno entre otros. La mutación que las origina, resulta de una translocación en más del 80% de los casos con disrupción en la transcripción proteica alterando la secuencia regulatoria que controla la diferenciación, tasa de crecimiento y sobrevivencia de las células progenitoras. Los signos y síntomas más frecuentes son secundarios a la infiltración medular y a otros órganos. Los diagnósticos diferenciales de la leucemia linfoblástica aguda incluyen a la leucemia mieloblástica aguda, mononucleosis infecciosa, infiltración de médula por tumores no hematopoyéticos de células redondas pequeñas y a tosferina.



**Figura 1. Morfología de blastos con translocación t(4;11)(q21;23).** Se presenta la morfología de blastos correspondientes a LMA-M4, en un paciente positivo a la translocación t(4;11)(q21;q23). Tomado de Johansson B., Moorman AV., y cols., Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23) – a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. *Leukemia*. 1998. 12:779-789.

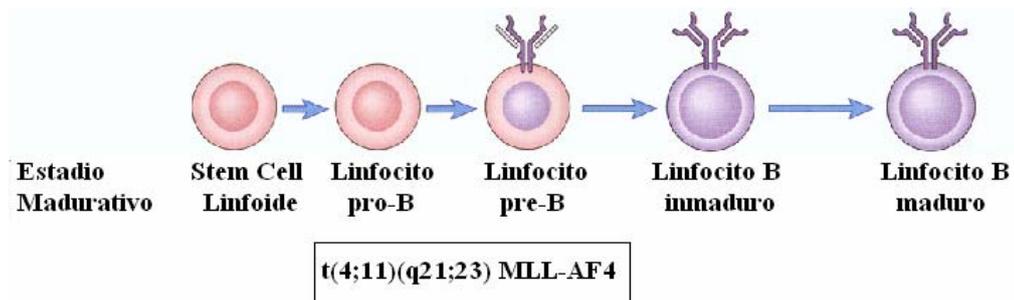
Existen dos variantes: leucemia mieloide y leucemia linfóide, que pueden presentarse de forma aguda o crónica. De la leucemia linfóide existen tres

categorías morfológicas, con varios subtipos determinados por técnicas inmunológicas, citoquímicas, citogenéticas y moleculares, lo que condiciona que el diagnóstico sea multidisciplinario ya que requiere no solamente identificar estirpe celular, sino también grado de diferenciación y traslocación cromosómica asociada (ver tabla 1) ya que de lo anterior depende el pronóstico y tratamiento.

Subtipo	Tipo celular involucrado	Anomalia cromosómica	Lesión Molecular	Frecuencia %	Producto Funcional
Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)	Precursor Monocítico de célula B (infantes)	Traslocación 11q23	MLL-AF4 MLL-ENL	85% infantes 5 % de total de LAL	Factor modificador de la transcripción
	Precursor de células B	Hiperdiploidia	Incremento de la dosificación génica	35%	Desconocido
		t(12;21)(p12;q22)	Fusión de TEL-AML	20%	Factor Transcripcional quimérico
		t(1;19)(q23;q13)	Fusión E2A-PBX	5%	Factor Transcripcional Quimérico
		t(9;22)(q34;q11)	Fusión de BCR-ABL	5%	Activador de cinasas
	Precursor de células T	Delección 1q t(1;14)(p32;q11)	Fusión SIL-SCL	25% de LAL con precursor de células T	Factor disregulador de la transcripción (SCL/TAL1)
Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM)	En Infantes	Traslocación 11q23	Fusión de MLL-AF6, AF9, AF10	50% de infantes con LAM	Factor modificador de la transcripción
		t(8;21)(q22;q22)	AML-ETO	15% del total de LAM	Factor transcripcional quimérico

**Tabla 1. Principales subtipos biológicos de las leucemias.** Descripción de genes de fusión asociados a leucemias y su frecuencia. Modificado de Greave M.F., Wiemels J., Origins of chromosome translocation in childhood leukemia. Nature Review Cancer. 2003. 3(9):1-11

El principal tipo de leucemia en la infancia es la leucemia linfoblástica aguda (83.3% de los casos). En menores de 2 años una proporción elevada de pacientes manifiestan la  $t(4;11)(q21;q23)$  generando el gen de fusión MLL-AF4 que codifica para un oncogén el cual incrementa la expresión de los genes HOX con un fenotipo pro-B/con componente monocítico (4). Se ha reportado la presencia del gen MLL-AF4 en aproximadamente 85% de niños menores de un año, y del 2 al 5% en niños mayores de 1 año, con diagnóstico de leucemia L1, L2 o pre-B (6) (ver figura 2).



**Figura 2. Estadios madurativos del linfocito B.** Las células con estadio madurativo pre-B se caracterizan por un bloqueo en la maduración caracterizado por la expresión citoplasmática de las cadenas pesadas  $\mu$ , con ausencia de la expresión de las mismas en la superficie. Datos de Bagg A., The Molecular Genetics of Hematologic Malignancies. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 1995. 2(3):255-262

En los últimos años ha existido un gran avance en su tratamiento, con supervivencias libres de evento a cinco años en aproximadamente 70% de los casos. Sin embargo el 30% restante fallece por falta de respuesta con actividad leucémica a pesar del uso de esquemas similares a los de los pacientes con éxito terapéutico. Estas diferencias han llevado al reconocimiento de ciertos factores pronósticos independientes: edad mayor de un año o menor de 10, cuenta leucocitaria mayor a 50,000  $\text{mm}^3$ , infiltración inicial a SNC, género masculino y alteraciones moleculares como las anteriormente mencionadas. Las traslocaciones  $t(9;22)$  y  $t(4;11)$  se identifican en el 10% de todos los pacientes con leucemia aguda linfoblástica, de tal manera que todos ellos deben estratificarse como de alto riesgo independientemente de la edad y la cuenta de leucocitos al diagnóstico (9, 10, 11).

## **Panorama epidemiológico**

A nivel mundial, las enfermedades neoplásicas se encuentran entre las primeras causas de muerte en la población pediátrica, siendo las más frecuentes las de origen hematológico: las leucemias agudas linfoblásticas (12, 13, 14, 15). En Europa, Canadá y Estados Unidos, la principal causa de muerte por cáncer es compartida por las leucemias agudas, linfomas y tumores del sistema nervioso central, e incluso solamente en la población estadounidense de 1 a 19 años de edad, es la segunda causa de muerte, sólo superada por los accidentes (12, 15)

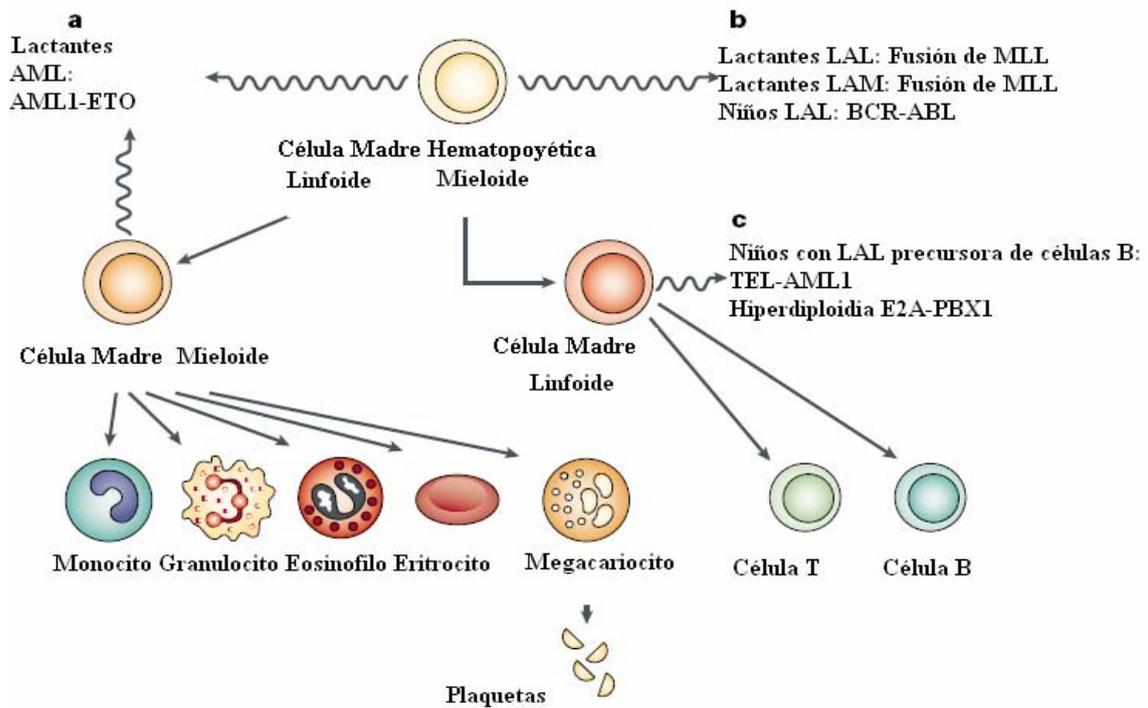
El panorama no es tan diferente en América Latina ya que la primera causa de muerte por cáncer corresponde a las leucemias, seguida por los linfomas y tumores del sistema nervioso central, con una doble tasa de mortalidad comprada con la reportada por países desarrollados (12, 15)

En México, el cáncer en niños pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2000, y en informes recientes se describe a las leucemias agudas como la primera causa de morbimortalidad por cáncer (14). La ciudad de México presenta una de las más altas incidencias a nivel mundial en niños menores de 11 años (15)

A nivel institucional se han reportado 784 casos nuevos en seis años, siendo el Centro Médico Nacional La Raza el que mayor incidencia de casos nuevos presenta con un promedio de 70 casos nuevos al año (16).

## Análisis molecular del proceso leucémico

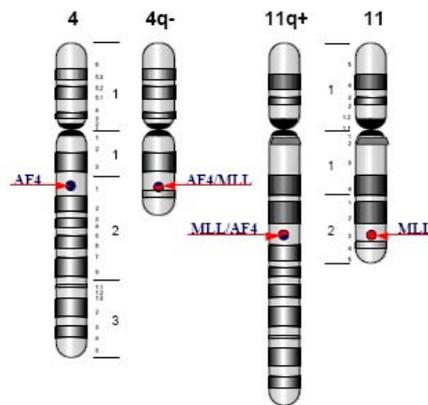
Las traslocaciones cromosómicas son consideradas el primer cambio genético de la oncogénesis, así como marcadores tumorales en el curso clínico de la enfermedad. Se han identificado más de 200 genes involucrados en traslocaciones cromosómicas que se asocian a leucemia en niños, las que incluyen el gen MLL, TEL y AML – ver figura 1 – (17). De estos tres genes el primero se puede fusionar con múltiples genes alternativos originando una proteína híbrida que altera la regulación transcripcional cuyo análisis molecular es de ayuda en la detección y caracterización de los protooncogenes involucrados – ver figura 3 –. El rearrreglo cromosómico más frecuente en la leucemia aguda linfoblástica en niños es la traslocación  $t(4;11)(q21;23)$ , la cual genera la fusión del gen MLL con el AF4, representa el 40% de todas las traslocaciones probables de MLL, incluyendo la mayoría de las leucemias en menores de un año de edad, es considerado un oncogén funcional que confiere resistencia al tratamiento y por lo tanto un pronóstico pobre (18, 19).



**Figura 3. Origen de las traslocaciones en la infancia.** Diagrama que ejemplifica el nivel de desarrollo celular al cual los diferentes subtipos de leucemia pediátrica pueden originarse. Modificado de Greave M.F., Wiemels J. Origins of chromosome translocation in childhood leukemia. Nature Review Cancer. 2003. 3(9):1-11.

## Gen de fusión MLL-AF4

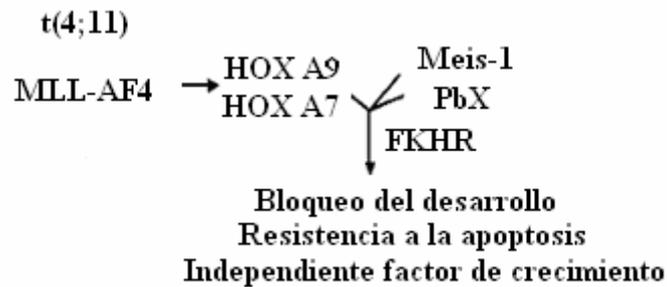
Las primeras descripciones de la presencia de la traslocación  $t(4;11)(q21;q23)$  se dio en las leucemias linfoblásticas agudas a finales de 1970 por Oshimura y Van den Berghe (20). Se origina a partir del gen MLL, ubicado en 11q23, y el gen AF4, localizado en 4q21, generando el gen quimérico MLL-AF4 (ver figura 4), y genera transcritos de RNAm quiméricos que pueden ser detectados por RT-PCR incluso en aquellos casos con reporte citogenético negativo a la traslocación (21, 22).



**Figura 4. Esquema de los genes que representa la localización del gen MLL-AF4.** Existen dos variantes de fusión, y aunque la variante MLL-AF4 es la más frecuente en las leucemias agudas linfoblásticas, la variante AF4-MLL es más agresiva. Tomado de Marschalek R., Identification of Target Genes of the Nuclear Oncoprotein AF4 Involved in  $t(4;11)$  High Risk Acute Leukemia Disease-oriented Genome Networks Cancer Network: Combating Cancer through Integrated Functional Genomic Research.

Este gen preserva los dominios AT-Hook y metiltransferasa de MLL así como los sitios de unión a GTP y la localización nuclear de AF4. La proteína que expresa está involucrada en la inhibición de la progresión del ciclo celular y regulación de la apoptosis (23). La oncoproteína que genera participa directamente en los mecanismos de la génesis de las leucemias, suprimiendo

la expresión de las vías genéticas necesarias para la expresión de las cadenas ligeras y subsecuentemente realizar el arresto celular en el estadio pre-B durante el desarrollo celular (24).



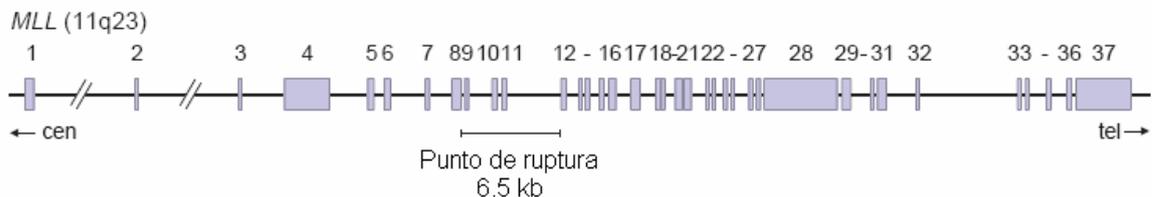
**Figura 5. Mecanismo del proceso leucémico asociado al gen MLL-AF4.**

Modelo propuesto para la participación del gen MLL-AF4 en el que se aprecia la participación de otros factores en el proceso leucémico. Adaptado de Bertrand F.E., Spengeman J.D., Shah N., LeBien T.W., B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia*. 2003. 17: 2454-2459.

## Gen MLL

Se conforma de 37 exones los cuales se expanden en una región menor a 1MB, produce un RNAm de 12 Kb y codifica una proteína de 3969 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 430 KDa (24) que tiene la capacidad de reprimir la transcripción y es un componente de complejos de regulación transcripcional y de remodelación de la cromatina (25).

Sus siglas en inglés corresponden a Mixed Lineage Leukaemia - leucemia de linaje mixto – ya que cuando se realizó su clonación se identificó tanto en células linfoides como mieloides, también conocido como ALL-1, HRX, y HTRX (26). Presenta una significativa, pero limitante homología al gen *D. melanogaster trithorax* de *Drosophila* (HTRX). Es un regulador positivo de la expresión de genes durante el desarrollo (27). Codifica una histona H3 lisina 4 específica a metiltransferasa que regula la expresión de los genes *Hox*, las cuales están directamente implicadas en los procesos de remodelación y modificación de cromatina como componentes clave de la reparación de DNA. No es requerido para la iniciación de la actividad genética pero mantiene estados transcripcionales durante el desarrollo. La alteración en su recombinación genera fusión de proteínas originando la transformación leucémica (28).



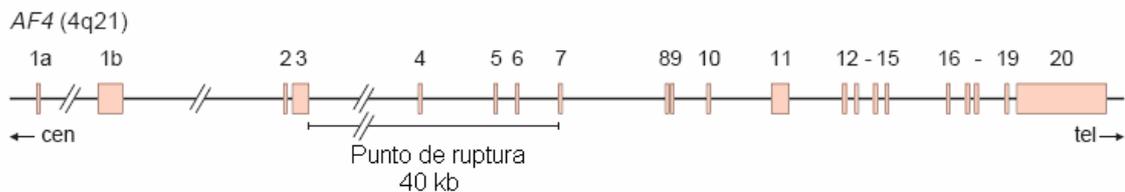
**Figura 6. Esquema del gen MLL.** Modificado de Dongen JJM., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglios G., Gottardi E., Rambaldi A., Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999. 13: 1901-1928.

## Gen AF4

Conocido como FEL, LTG4, y MLLT2. Se localiza en el núcleo celular, participa en el control de la transcripción génica y funciona como activador transcripcional. El RNA de AF4 se expresa en células hematopoyéticas normales y en tejido humano normal, y cuando se encuentra sobre expresado es una potente oncoproteína que lleva a trastornos de la proliferación. Se compone de 20 exones y la mayoría de los puntos de ruptura se encuentran localizados en una región genómica de 52 kb de extensión, entre el exón 3 y el 7 (24, 29).

Codifica para la formación de una proteína rica en serina-prolina que participa en las vías de señalización nuclear y un dominio de unión a guanosin trifosfato (GTP).

En ratones carentes del gen AF4, se presenta una inhibición del desarrollo de células T y una leve alteración en el desarrollo de células T.



**Figura 8. Esquema del gen AF4.** Modificado de Dongen JJM., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglios G., Gottardi E., Rambaldi A., Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999. 13: 1901-1928.

## **Relevancia clínica de la expresión de genes de fusión en las leucemias.**

Recientes investigaciones en pacientes con leucemia aguda linfoblástica con rearrreglos del gen MLL indican que son altamente curables con un corto periodo de quimioterapia intensiva (59). Una recaída temprana más las excesivas complicaciones por toxicidad de la quimioterapia son la principal causa de la evolución no satisfactoria del paciente ya que la edad de los niños los predispone a sufrir los efectos posteriores de la terapia. En la actualidad uno de los objetivos fundamentales en muchos de los centros de referencia oncológica es establecer con precisión grupos de riesgo que nos permitan identificar aquellos pacientes que tienen criterios de buen pronóstico y no ameritan sobretratamiento y aquellos otros en los que se requiere de una quimioterapia más intensiva e incluso del manejo con trasplante de progenitores hematopoyéticos (30, 31, 32).

Adicionalmente la relevancia clínica de la identificación del gen MLL-AF4 es que puede ser útil como marcador diagnóstico, pronóstico, de respuesta al tratamiento, de enfermedad mínima residual y por último como diana terapéutica.

## **PCR de transcripción inversa (RT-PCR)**

Algunos procedimientos de diagnóstico hematológico molecular requieren del aislamiento y estudio a nivel de RNAm para poder detectarse. Debido a que la traducción del RNAm produce proteínas, las secuencias modificadas de ribonucleótidos en el RNAm generarán una proteína modificada. Como ejemplo, el gen de fusión MLL-AF4 el cual proviene de la fusión del gen MLL, ubicado en 11q23, y el gen AF4, localizado en 4q21, generando el gen quimérico MLL-AF4.

La transcripción de este gen fusionado produce un RNAm quimérico con secuencias MLL y AF4. La traducción de este RNAm quimérico origina una proteína de fusión que puede modificar el control del ciclo celular, lo que provoca en última instancia neoplasias malignas. El procedimiento llamado transcripción reversa-PCR (RT-PCR reverse transcription-PCR) detecta la presencia de este RNAm quimérico.

La RT produce DNA complementario (cDNA) a partir del RNAm presente en la muestra de RNA total obtenida a partir de células del paciente. La PCR amplifica el número de estas moléculas de cDNA. El RNAm quimérico producido a partir de la transcripción de los genes MLL-AF4 sirve como templado para la producción de cDNA. La RT-PCR requiere de un cebador oligo (dT) específico o aleatorio, la transcriptasa inversa, desoxirribonucleotidos, cebadores y una DNA polimerasa como la Taq polimerasa.

El primer paso es la producción de un híbrido RNA-cDNA utilizando la enzima transcriptasa inversa y un cebador. El cebador llamado oligo (dT) está formado por muchos nucleótidos de timina. La mayor parte del RNAm posee una serie

de nucleótidos de adenina en el extremo 3' llamada cola de poli A. El cebador oligo (dT) templa la cola de poli A en todo el RNAm presente. La transcriptasa inversa reconoce el grupo hidroxilo en el último nucleótido del cebador y lee la cadena templada de RNAm, y luego liga el desoxirribonucleótido complementario correspondiente. La transcriptasa inversa sigue la cadena templada de RNAm y agrega los desoxirribonucleótidos complementarios a la cadena en desarrollo de cDNA para formar el híbrido RNAm-cDNA. La desnaturalización por calor rompe las uniones hidrógeno entre el híbrido RNAm-cDNA, y separa las dos cadenas. El próximo paso es la amplificación del cDNA MLL-AF4 de cadena simple con el uso de cebadores específicos para una secuencia blanco en el gen MLL y el gen AF4. La DNA polimerasa elonga los cebadores y forma un cDNA de doble cadena a partir del gen quimérico MLL-AF4. El ciclo continua con la desnaturalización del cDNA de doble cadena, el templado de los cebadores de MLL-AF4 y la elongación de los cebadores con DNA polimerasa, y origina millones de copias de cDNA que representan el gen quimérico MLL-AF4 (33).

### **RT-PCR en tiempo real**

Durante el proceso se realizan dos pasos simultáneamente: la amplificación y la detección de la secuencia blanco. Los resultados se emiten al tiempo que se realiza el proceso de PCR, y se evidencian a través de una variedad de diferentes fluorocromos que correlacionan el resultado de PCR con la intensidad de la fluorescencia por medio de un sistema de detección láser comparado con la visualización convencional en gel. Produce resultados cuantitativos con un rango de 7 a 8 logaritmos y no requiere manipulación postamplificación, puede detectar desde una copia del transcrito específico, discrimina entre RNAm con secuencias casi idénticas en un menor templado de RNA que otros métodos de análisis de expresión de genes. Su principal desventaja es el equipo y reactivos de alto costo que aunado a su muy alta sensibilidad hace imperativo un conocimiento más profundo de técnicas de normalización para obtener resultados más precisos. Aún con todo lo anterior, este es el método con mayor capacidad de detección de los disponibles para la medida de la expresión génica. Su utilidad se basa en el análisis de transcritos de genes expresados en grado mínimo, detectando y cuantificando genes de fusión leucémicos generados por traslocaciones específicas, además de su utilidad en la detección de la enfermedad mínima residual monitorizando la progresión de cualquier recaída potencial (2, 34, 35, 36)

## **Planteamiento del Problema**

Actualmente la identificación del gen de fusión MLL-AF4 se realiza principalmente a través de RT-PCR convencional, sin embargo existen técnicas más rápidas, sensibles y específicas. RT-PCR en Tiempo Real tiene la ventaja de identificar niveles mucho más bajos de genes transcritos que RT-PCR convencional. La principal ventaja de tiempo real radica en que otorga un valor de los transcritos amplificados basado en la intensidad de fluorescencia durante el proceso de PCR, siendo una prueba cuantitativa, diferente a PCR convencional que se basa en la intensidad de luminosidad emitida durante la visualización de los productos de PCR amplificados en gel de agarosa o acrilamida, siendo una prueba cualitativa. Otra ventaja de RT-PCR en Tiempo Real, es su capacidad de detectar niveles de transcritos mucho más bajos que los necesarios para RT-PCR convencional. Tiempo Real identifica una molécula entre 100.000 y RT-PCR convencional identifica una molécula entre 10.000. Además, PCR en Tiempo Real puede ser utilizada como prueba diagnóstica y pronóstica en pacientes con leucemia aguda linfoblástica. Por lo anterior proponemos la realización de la estandarización de la detección del gen de fusión MLL-AF4 por medio de RT-PCR en tiempo real.

## **Pregunta de Investigación**

¿Cuál es la utilidad de RT-PCR en Tiempo Real para la detección del gen MLL-AF4 comparado con RT-PCR convencional?

## **Justificación**

En México la segunda causa de muerte en niños es debida a neoplasias, y de esta la primera causa son las leucemias que actualmente son consideradas junto con el cáncer y los linfomas, enfermedades hemato-onco genéticas. La forma actual de diagnóstico y clasificación se basa en la citomorfología del aspirado de médula ósea, inmunohistoquímica, citometría de flujo, y estudios citogenéticos para detectar traslocaciones que confieran pronóstico al padecimiento. Más del 80% de las leucemias agudas linfoblásticas en menores de un año, y entre el 5 a 10 % en mayores de un año de edad, se encuentran asociadas a la presencia del gen de fusión MLL-AF4 el cual confiere resistencia al tratamiento. Actualmente es necesario para evaluar una terapia relacionada al riesgo que puede ser alto o bajo, en relación a la presencia o ausencia del gen. Ahora bien, para determinar la presencia del gen MLL-AF4 es necesario realizar estudios moleculares. Una forma es a través de RT-PCR conocida como la prueba estándar de referencia, sin embargo ante el actual y cada vez mayor conocimiento del comportamiento molecular de la enfermedad, se hace necesario contar con pruebas orientadas a eficientar la identificación de los eventos moleculares de interés clínico. RT-PCR en Tiempo Real tiene las mismas ventajas que RT-PCR ambas punto final, pero su principal utilidad radica en la cuantificación de RNAm, esto es, la dosificación génica. Es una prueba altamente sensible, específica, rápida y reproducible. Su aplicación como herramienta diagnóstica en la práctica clínica puede influir de manera positiva en los casos en los cuales el estudio citogenético no pueda realizarse para detectar presencia o ausencia de la traslocación, o en aquellos casos en los cuales el inmunofenotipo no sea concluyente, clasificando grupos de riesgo susceptibles mediante la determinación molecular específica de los rearrreglos génicos en cualquier momento de la enfermedad incidiendo favorablemente en el diagnóstico, inicio oportuno de tratamiento, la estancia hospitalaria, relación costo-tratamiento, determinación de enfermedad mínima residual y sobrevida libre de enfermedad.

## **Objetivo General**

- Estandarizar la prueba diagnóstica para la detección del gen MLL-AF4 por medio de RT-PCR en tiempo real

## **Objetivos Particulares**

- Evaluar la utilidad de RT-PCR en Tiempo Real para la detección del gen MLL-AF4 comparado con RT-PCR convencional.

## **Hipótesis**

- RT-PCR en tiempo real es una técnica de mayor resolución y utilidad para la detección del gen MLL-AF4 comparada con RT-PCR convencional

### **Criterios de Inclusión**

- Muestras de sangre periférica provenientes de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda en cualquier estadio de la enfermedad provenientes del Hospital General CMN La Raza
- Muestras de sangre de cordón umbilical provenientes de banco de sangre de cordón umbilical CMN La Raza

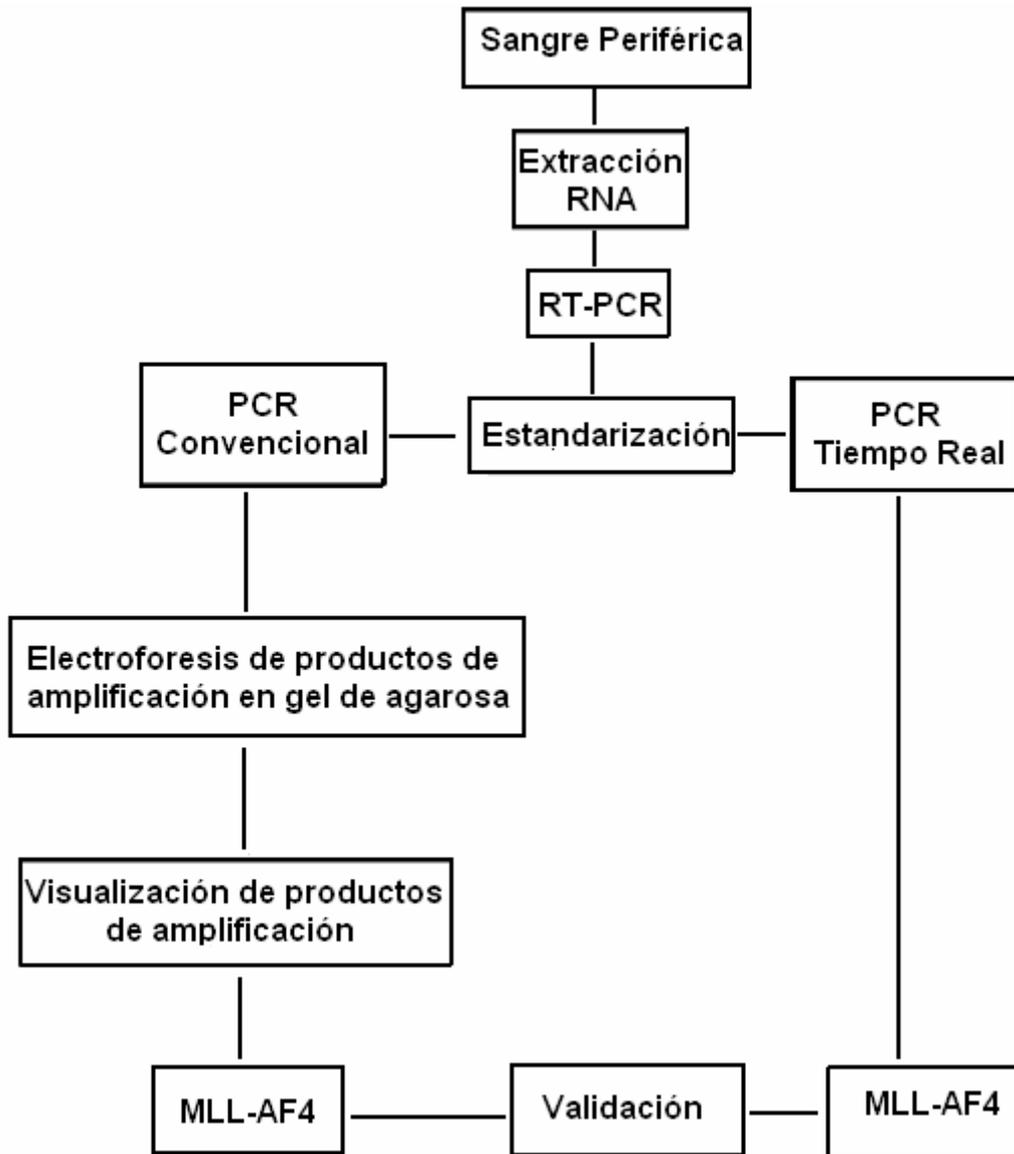
### **Criterios de exclusión**

- Cuando el material biológico no se encuentre adecuadamente preservado
- Cuando no exista suficiente muestra para realizar la detección

### **Diseño Experimental**

- Estudio de evaluación de prueba diagnóstica fase I-II, transversal, descriptivo.

## Algoritmo Metodológico



**Figura 9. Algoritmo metodológico.** Diagrama que ejemplifica los puntos clave en el proceso de estandarización y validación de RT-PCR en tiempo real.

## **Material y Métodos**

### **Muestras de estudio**

Se incluyeron 30 muestras provenientes de sangre periférica criopreservada correspondiente a pacientes con diagnóstico de leucemia aguda en cualquier estadio de la enfermedad, tratados y no tratados, provenientes del servicio de Hematología del CMN La Raza, y treinta muestras de sangre de cordón umbilical. Las muestras utilizadas para la estandarización fueron obtenidas del laboratorio del Hospital General CMN La Raza. Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron donadas por el Banco de Células de Cordón Umbilical CMN La Raza. El número de participantes es el necesario para establecer un intervalo de confianza del 95% con valor alfa de 0.05%, calculado mediante estimación de proporciones.

### **Líneas celulares**

Con el objetivo de estandarizar con líneas celulares positivas y negativas y utilizarlos como controles, se utilizaron las líneas celulares RS4 como control positivo donada por la Dra. María de la Luz Sierra del laboratorio Basic Research Laboratory Center for Cancer Research NCI NIH, Bethesda Maryland con número de ATCC CRL-1873, y HL60 como control negativo Donada por el Dr. Eduardo García Zepeda Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigaciones Biomédicas, UNAM con número de ATCC CCL-240.

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino y antibióticos con la siguiente metodología: se extrae alicuota la cual se encuentra a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se descongela a temperatura ambiente y se realiza lavado con PBS para disminuir toxicidad DMSO, posteriormente se realiza dos lavado con RPMI y se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos, se decanta y el botón celular es resuspendido en medio RPMI suplementado ( L-glutamina y HEPES, SFB al 10%, antibióticos: penicilina/estreptomicina y anfotericina B, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales) se colocaron en cajas de cultivo y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . Una vez lograda la expansión celular se realizó cálculo de viabilidad a través de azul tripano y se hicieron diluciones para uso posterior.

## Extracción de RNA

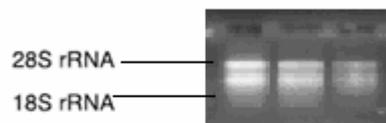
Se partió de sangre periférica con EDTA la cual se agrego lentamente por las paredes de un tubo de Falcon de 15 mL el cual contenía Ficoll-Hypaque al 1%, se centrifugó 20 minutos a 1,500 rpm a temperatura ambiente. Se retiró la fase de células mononucleares (anillo blanquecino) y se lavó con PBS 1x volumen a volumen, posteriormente se centrifugo a 2500 rpm x 5 minutos a 0°C y se decantó.

## Método de Trizol

Se resuspendió el botón celular en 1 mL de trizol y se agregaron 200 µL de cloroformo, posteriormente se realizo centrifugación a 12000 rpm x 15 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa y se agrego 200 µL de alcohol isopropílico se centrifugo a 12000 rpm por 15 minutos, se decanto y se agrego etanol al 75%, con última centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos. Al final se decanto y se procedió a obtener pastilla de RNA con baño seco a 60°C, posteriormente se resuspendió en 30 µL de solución RNA Ambión en termoblock por 10 minutos, se almacenó a -70°C para su uso posterior.

## Evaluación de la integridad de RNA

Se realizó un gel de agarosa al 1% con solución TAE al 1% teñido con bromuro de etidio, se tomaron 3 µL de RNA resuspendidos en 2 µL de Load Dye, se colocaron en el gel de agarosa al 1%, se realizó electroforesis a 80 mV por 20 minutos para su visualización posterior en transiluminador de rayos UV.



**Figura 10. Integridad de RNA.** Aislamiento de RNA proveniente de sangre total en gel de agarosa al 1% corrimiento a 80 mV por 20 minutos. Cada línea contiene aproximadamente 2 µg de RNA.

## Evaluación de la concentración RNA

La concentración y pureza de RNA fue evaluada a través de la medición de la densidad óptica a 260 nm.

Concentración de RNA en la muestra ( $\mu\text{g/ml}$ )= $A_{260}$ x factor de dilución x 40/1000

Concentración de DNA en la muestra ( $\mu\text{g/mL}$ )= $A_{260}$ x factor de dilución x 50/1000

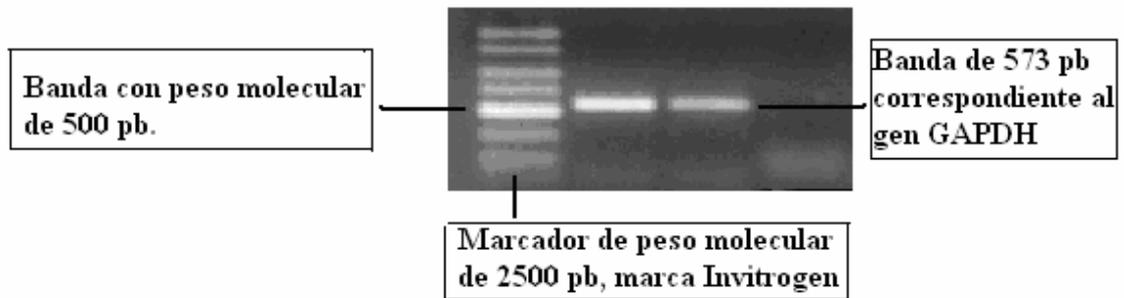
## Retrotranscripción

En un tubo ependorf de 0.5 mL se preparó una reacción con un volumen final de 20 $\mu\text{L}$  que contenía 3 $\mu\text{g}$  RNA, random primers y dNTP's, posteriormente se agregó buffer 5x, DTT, M-MLV RT, RNase out y agua libre de nucleasas.

Random Primers	Invitrogen
dNTP's	Invitrogen
5X FSBuffer	Invitrogen/Lote 1308398
DTT	Invitrogen/Lote 135541
M-MLV-RT	Invitrogen/Lote 1374257
Nuclease free water	Invitrogen/Lote 22768201
RNase out	Invitrogen/

**Tabla 2. Descripción de reactivos.** Se anexa marca y número de lote de material utilizado durante el desarrollo de la estandarización del gen MLL-AF4.

Para evaluar la integridad de cDNA se realizó amplificación del gen GAPDH, obteniendo una banda de 573 pb.



**Imagen 11. Integridad de cDNA.** Separación electroforética de productos de PCR correspondiente al gen housekeeping GAPDH con el propósito de comprobar integridad de cDNA e identificar tamaño de banda esperado.

## PCR

Se realizó una mezcla con 12.5 Master Mix, .5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los primers sentido y antisentido del gen constitutivo y del gen diana, 1  $\mu\text{g}$  de cDNA, y agua para una reacción final de 25  $\mu\text{L}$ . Ambos genes se amplificaron a las mismas condiciones, se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y se realizó electroforesis por 45 minutos a 80 mV, posteriormente se visualizaron en transiluminador rayos UV.

	Condiciones de Mezcla	Condiciones de Amplificación
Random Primers	1 $\mu\text{L}$	cDNA1 65°C x 15 minutos 4°C x 5 minutos
RNA	Variable: llevar a concentración de 3 $\mu\text{g}$	
DNTPs	1 $\mu\text{L}$	
Retirar muestras de termociclador y llevar a campana de flujo laminar transportadas en congelante, agregar lo siguiente:		
First Strand Buffer	4 $\mu\text{L}$	cDNA 2  25°C x 15 minutos 55°C x 60 minutos 70°C x 15 minutos
DTT a .1 molar	1 $\mu\text{L}$	
RNAse out	1 $\mu\text{L}$	
RT	1 $\mu\text{L}$	
H2O	Ajustar a un total de 20 $\mu\text{L}$	
Para la realización de PCR múltiple amplificación de gen diana y constitutivo		
Master Mix	12.5 $\mu\text{L}$	*95° C x 1 minuto 95° C x 40 segundos 57 a.C. x 40 segundos 72° C x 1 minuto 72° C por 10 minutos  x 40 ciclos *Para RT-PCR-TR iniciar con 10 min. a 90°C.
Primer 5' GAPDH	.5 $\mu\text{L}$	
Primer 3' GAPDH	.5 $\mu\text{L}$	
Primer 5' MLL	.5 $\mu\text{L}$	
Primer 3' AF4	.5 $\mu\text{L}$	
cDNA	Ajustar a concentración de 1 $\mu\text{g}$	
H2O	Ajustar a un total de 25 $\mu\text{L}$	
Cargar en gel de agarosa al 1.5%, realizar electroforesis y visualizar productos de amplificación por luz UV.		

**Tabla 3. Estandarización para RT-PCR convencional y tiempo real.**

Traslocación cromosómica	t (4;11)
Fusión de genes	MLL (11q23) AF4 (4p21)
Oligonucleotidos	
MLL exón 8 al 9 sentido	5' aga atc agg tcc aga gca gag c 3'
AF4 exón 5 al 6 antisentido	5' atg ctg aga gtc ctt tgt agg g 3'
Producto de PCR	358 pb
Línea celular positiva	RS4
Línea celular negativa	HL60
Gen constitutivo	GAPDH
Oligonucleotidos	
sentido	5' atc acc atc ttc cag gag cg 3'
antisentido	5' cct gct tca cca cct tct tg 3'
Producto de PCR	573 pb

**Tabla 4. Especificaciones de primers y líneas celulares utilizadas.** Los primers utilizados fueron elegidos para amplificar la mayoría de los puntos de ruptura del gen de fusión. Tomado de: Siraj A.K., Ozbek U., y cols., Preclinical Validation of a Monochrome Real-Time Multiplex Assay for translocations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2002. 8(12): 3832-3840 (40).

## Procedimiento

Obtenida alícuota con cDNA se procederá a la realización de PCR en tiempo real en dos pasos siguiendo las instrucciones del Kit 2X Quantitec SYBR Green PCR Master Mix. Las condiciones de amplificación fueron idénticas que las utilizadas para RT-PCR convencional. Al finalizar la amplificación se realizó un gel de agarosa al 1.5% para visualizar los productos de amplificación de RT-PCR-TR y comprobar resultados.

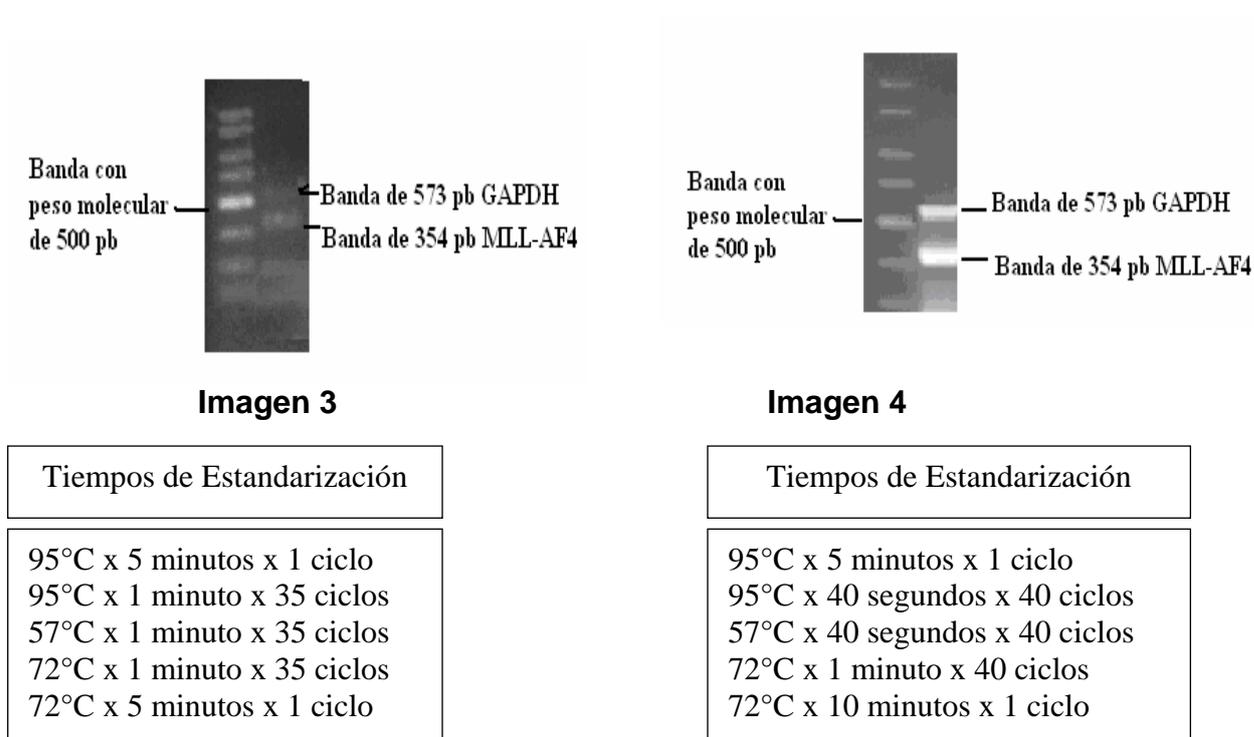
Componente	Volumen/reacción	Concentración final
2x QuantiTec SYBR Green PCR	25 $\mu$ L	1x
10x Primer de ensayo QuantiTect	5 $\mu$ L	1x
RNasa libre de agua	Variable	-
Opcional: Uracil-N-glycosylase	Variable	0.5 unidades/reacción
Templado de cDNA	5 $\mu$ L	100 ng/reaction
Volumen total	50 $\mu$ L	-

**Tabla 5. Características del Kit 2X Quantitec Syber Green PCR Master Mix**

## RESULTADOS

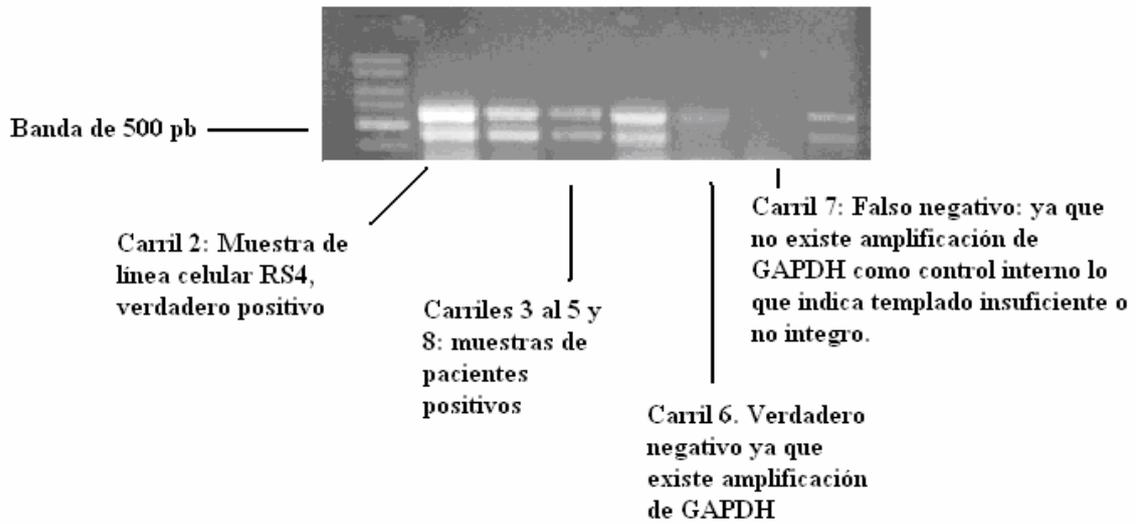
### Identificación de la traslocación por RT-PCR Tiempo Real

Para la detección de la traslocación previamente se realizó un gradiente de temperaturas de amplificación que identificara la temperatura de fusión a la cual tanto el gen diana como el constitutivo fueran amplificados y que fuera útil tanto en RT-PCR convencional y RT-PCR-Tiempo Real ambas punto final (ver figura 12).



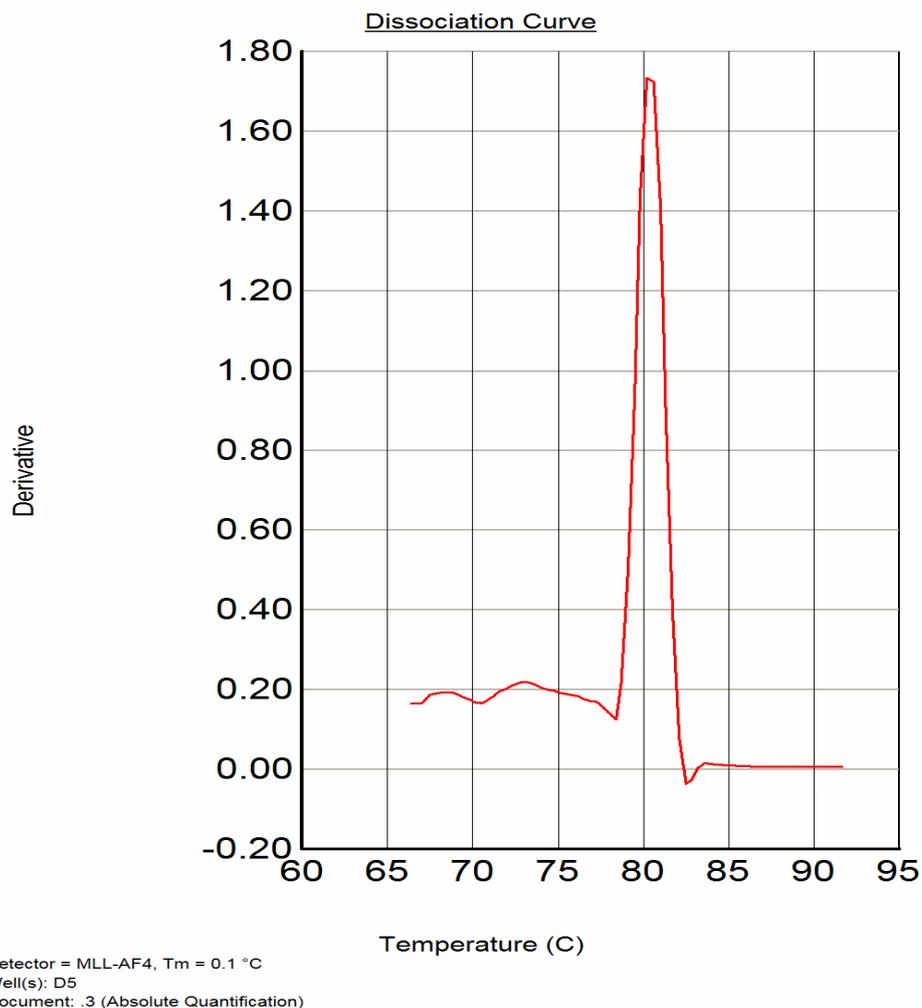
**Figura 12. Gradiente de temperaturas.** Coamplificación tanto para el gen MLL-AF4 de 358 pb como para GAPDH de 573 pb misma temperatura de fusión. La primera imagen corresponde al primer gradiente en el cual se obtiene amplificación a 57°C, la segunda imagen corresponde a la amplificación de los mismos genes con modificaciones en los tiempos de extensión y alineación, así como en el número de ciclos, utilizada para RT-PCR convencional y RT-PCR Tiempo Real.

Posteriormente se realizó coamplificación de productos de PCR para la detección del gen MLL-AF4 y GAPDH en muestras de pacientes.



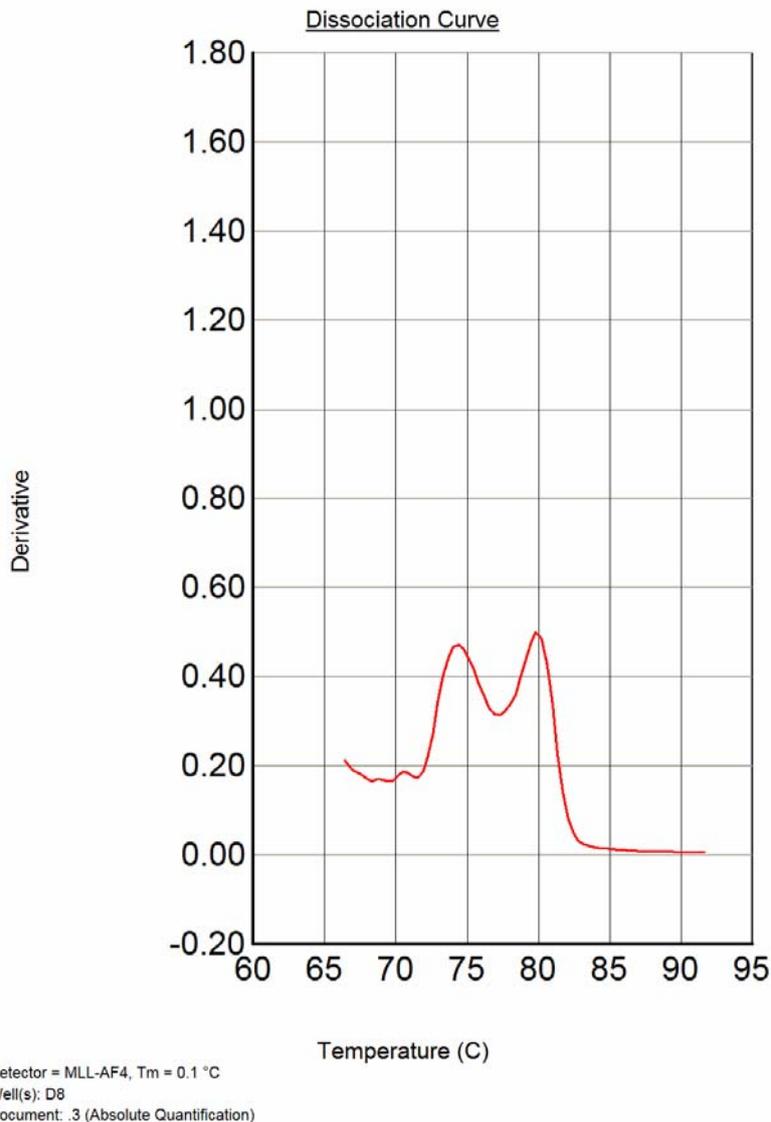
**Figura 13. RT-PCR pacientes.** Aplicación de RT-PCR convencional estandarizada en la detección del gen MLL-AF4 en muestras de pacientes.

Estandarizada la prueba en RT-PCR convencional, se procedió a la estandarización por RT-PCR en Tiempo Real en el equipo de Applied Biosystems 7300 utilizando 2X Quantitec Sybr Green PCR Master Mix. Inicialmente se utilizó la línea celular RS4 positiva al gen MLL-AF4, obteniéndose un amplicon con perfil único detectable y reproducible (ver figura 14).



**Figura 14. Curva de disociación positiva al gen MLL-AF4.** Proveniente de línea celular RS4, positiva a la traslocación t(4;11)(q21;23). Análisis de la figura: en el eje de las X –derivativa-, indica el grado de fluorescencia, el eje de las Y indica la temperatura a la cual amplifica el gen específico. La imagen confirma el producto de PCR específico para el gen de fusión. Identificación del gen MLL-AF4 por medio de curvas de disociación.

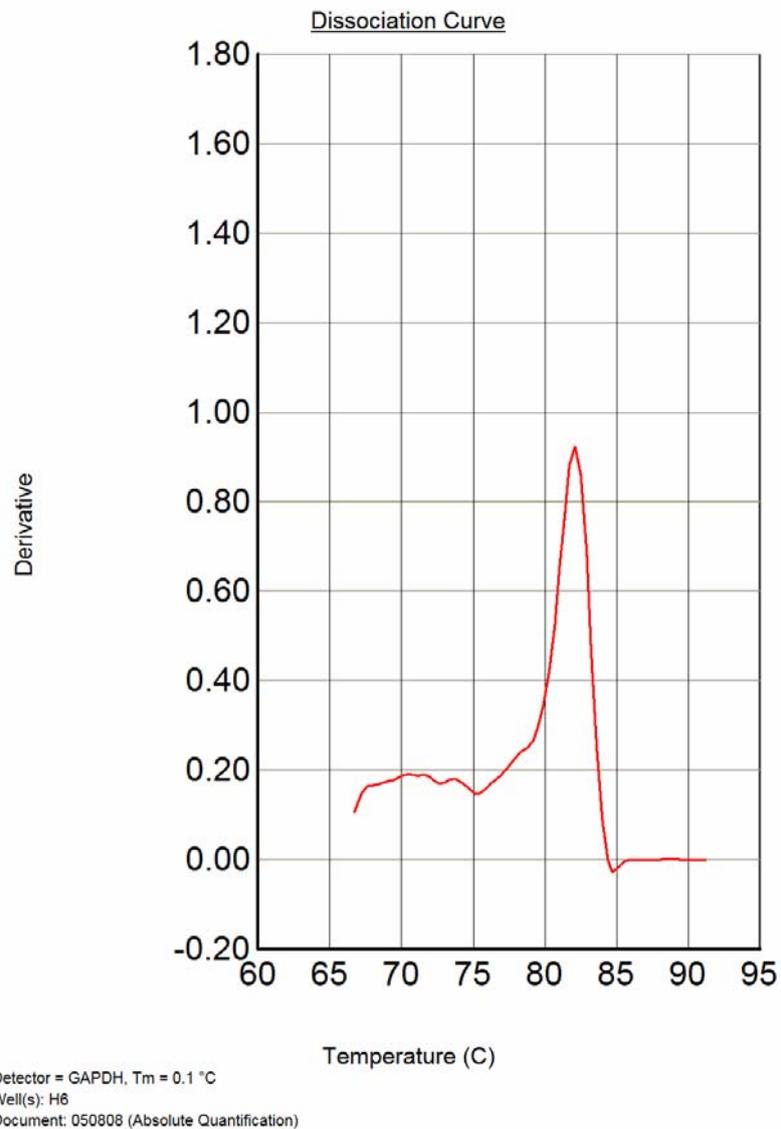
Los controles negativos provenientes de la línea celular HL60, presentaron doble señal a diferente punto de fusión de la línea celular positiva, indicando la ausencia de falsos positivos (ver figura 15).



**Figura 15. Curva de disociación negativa al gen MLL-AF4.** Proveniente de línea celular HL60, se aprecian dos puntos de disociación a diferentes Tm, nunca coincidente con control positivo, ya que la imagen fue constante en controles negativos y pacientes.

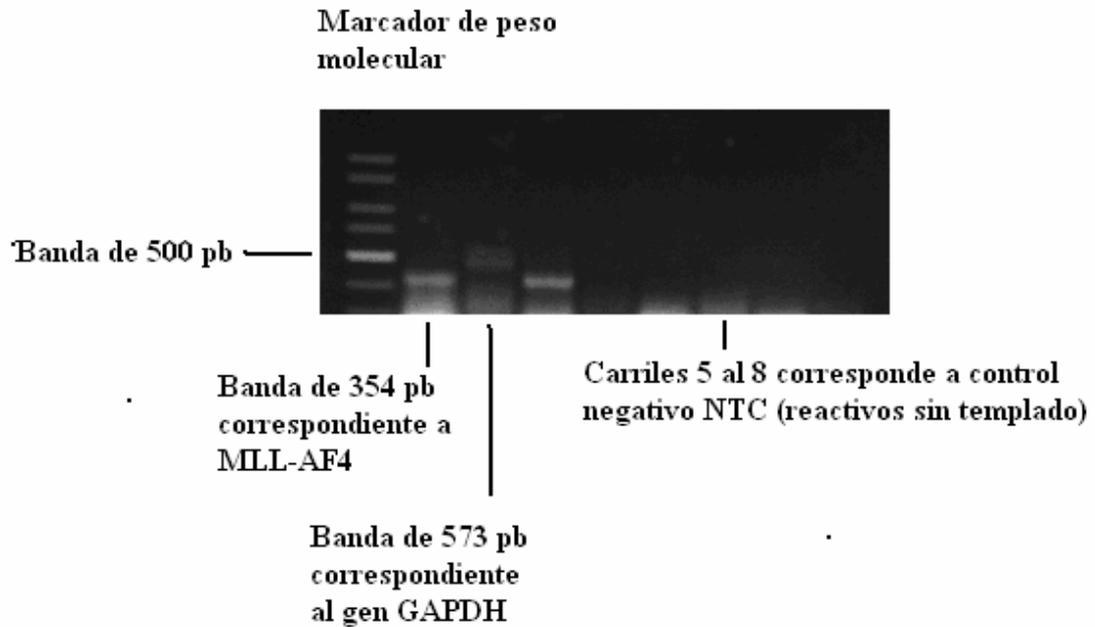
La especificidad del punto de fusión para la línea celular positiva fue reproducible y comparable al resultado obtenido por RT-PCR convencional. Las muestras sin templado no mostraron ninguna señal de amplificación descartando contaminación. Con el objeto de garantizar la integridad de cDNA, y disminuir falsos negativos, se incluyó el gen constitutivo GAPDH como control interno de amplificación a cada muestra el cual presento un punto de fusión específico (ver figura16). Para activar Hot Star Taq Polimerasa contenida en el

Kit de Sybr Green, se agregaron 10 minutos a 90°C como paso inicial, resto de condiciones de amplificación fueron idénticas a RT-PCR convencional.



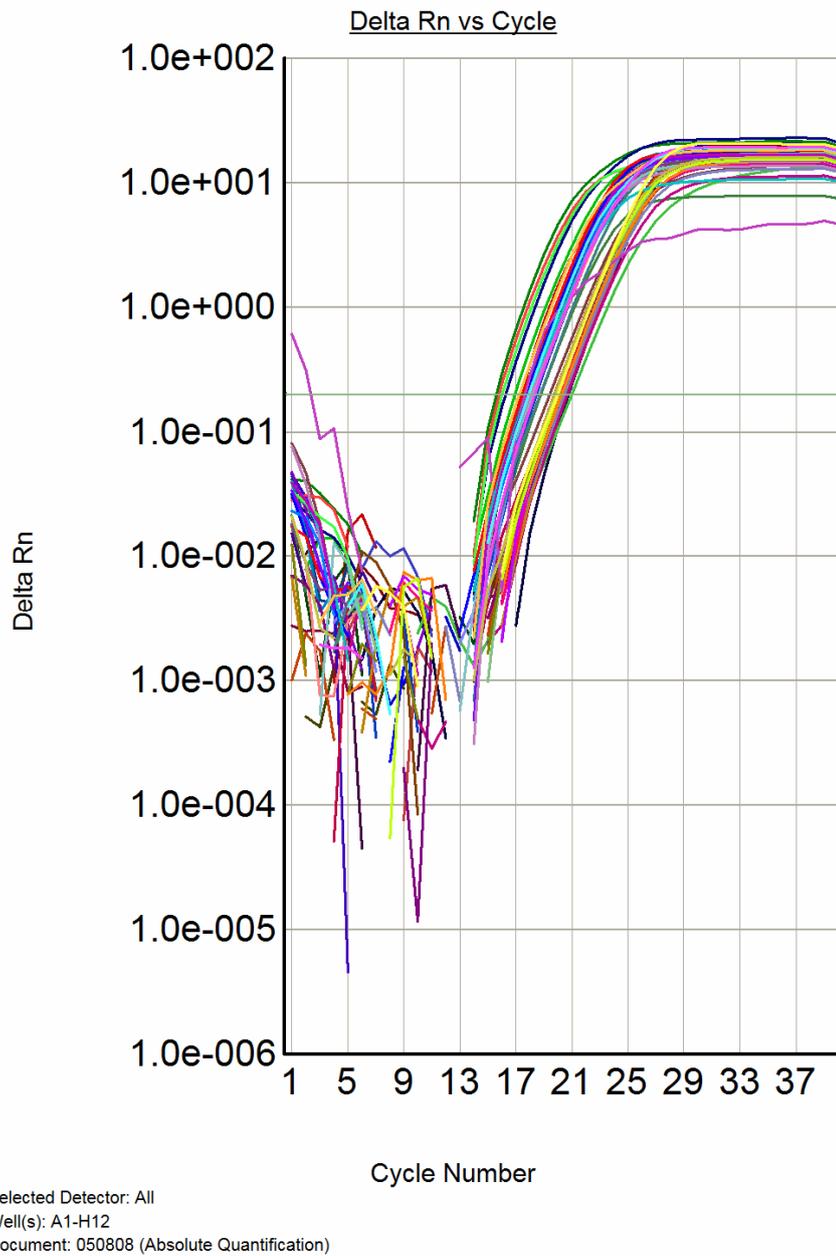
**Figura 16. Curva de disociación del gen GAPDH.** Presenta punto de fusión de 82°C.

La identidad de cada amplicón se confirmó por gel agarosa posterior a RT-PCR Tiempo Real (ver figura 17)



**Figura 17. Confirmación de amplicones en gel de agarosa.** Separación electroforética de productos de RT-PCR en Tiempo Real, corrimiento en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, a 80 mV por 30 minutos.

Una vez estandarizado el procedimiento, se procesaron las muestras. Seis muestras de los pacientes fueron eliminadas ya que el RNA se degradó durante el proceso, y nueve muestras de los casos controles igualmente fueron eliminadas por las mismas circunstancias. Dos de las muestras control procesadas fueron positivas al gen MLL-AF4, y en el grupo de los casos 14 fueron positivas al gen MLL-AF4 (ver figura 18).



**Figura 18. Amplificación en Tiempo Real de muestras de pacientes.** Todas las muestras amplifican ya sean positivas o negativas, debido a que MLL-AF4 y GAPDH presentan similar temperatura de fusión. Para descartar positivos de negativos, es necesaria la lectura de curvas de disociación.

La sensibilidad y especificidad se calcularon mediante el teorema de Bayes (ver tabla 7). Para valorar la reproducibilidad del estudio, todas las muestras se procesaron por duplicado tanto para MLL-AF4, como para el gen GAPDH. En

la misma reacción se incluyeron muestras sin templado, un control positivo y un control negativo. La comparación del resultado de RT-PCR en Tiempo Real se hizo contra RT-PCR convencional ya que esta última es considerada como estándar para el análisis de genes de expresión.

Sensibilidad:  $a/(a+c) = 14/14+0 = 14/14 = 100\%$

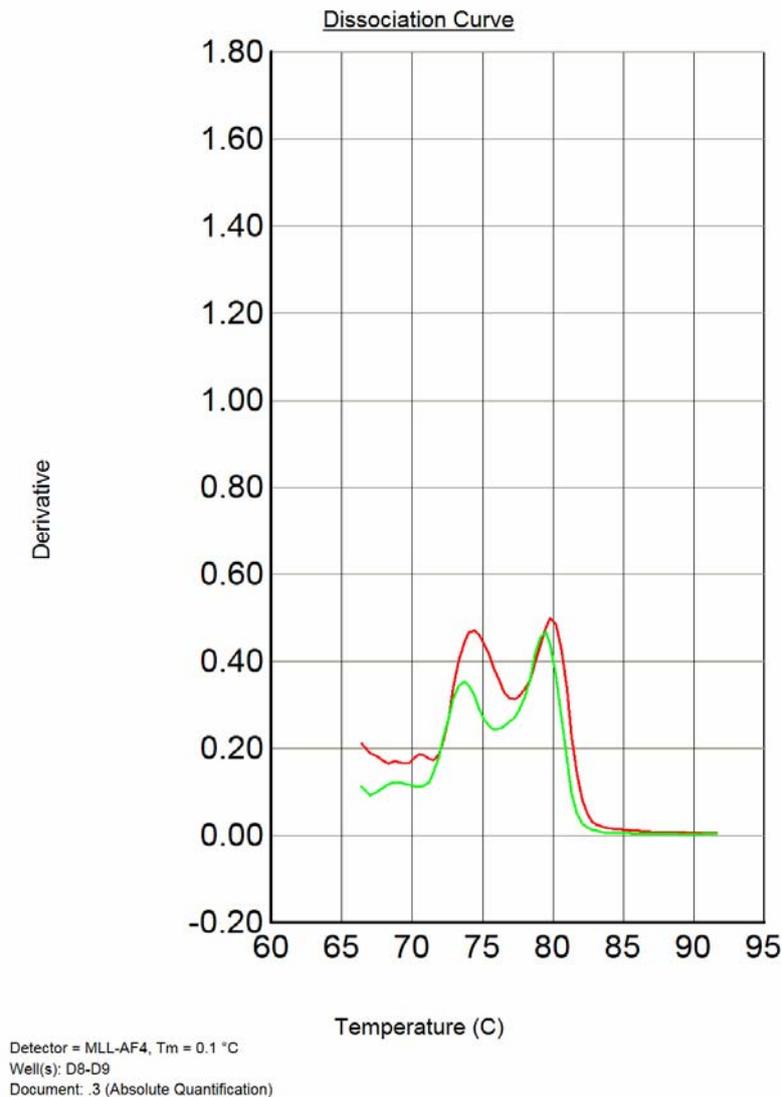
Especificidad:  $d/(b+d) = 29/2+29 = 29/31 = 0.93 = 93\%$

		El paciente tiene la enfermedad	El paciente no tiene la enfermedad	
Resultado de la prueba	Positivo	Verdaderos Positivos 14	Falsos Positivos 2	16
	Negativo	Falsos Negativos 0	Verdaderos Negativos 29	29
		14	31	45

**Tabla 6. Cuadro de 2x2.** Comparación de la prueba diagnóstica a estandarizar correspondiente a RT-PCR en Tiempo Real, contra la prueba estándar ideal correspondiente a RT-PCR convencional así como el cálculo de sensibilidad y especificidad:

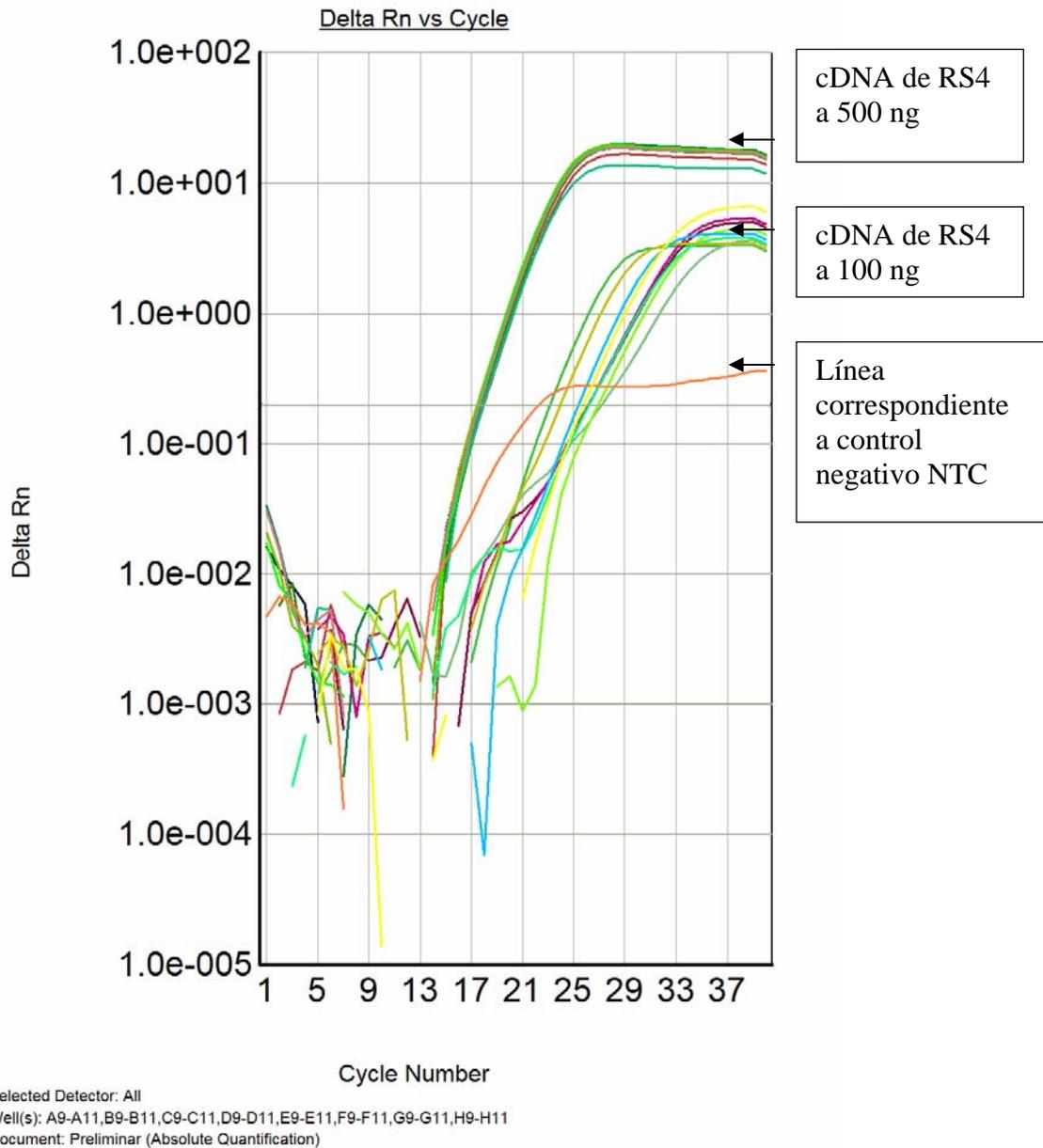
## Discusión

La estandarización de la detección del gen de fusión MLL-AF4, implicó en un principio determinar una única condición de amplificación tanto para el gen MLL-AF4 como para el gen GAPDH utilizado como control interno, funcionando perfectamente para RT-PCR convencional, sin embargo al realizar RT-PCR-TR se obtenía amplificación de los controles negativos a dos puntos de fusión (ver figura 19).



**Figura 19. Curva de disociación paciente negativo.** Utilizando como control negativo la línea celular HL60 en rojo, y en verde curva de disociación de paciente negativo a la traslocación confirmado por secuenciación.

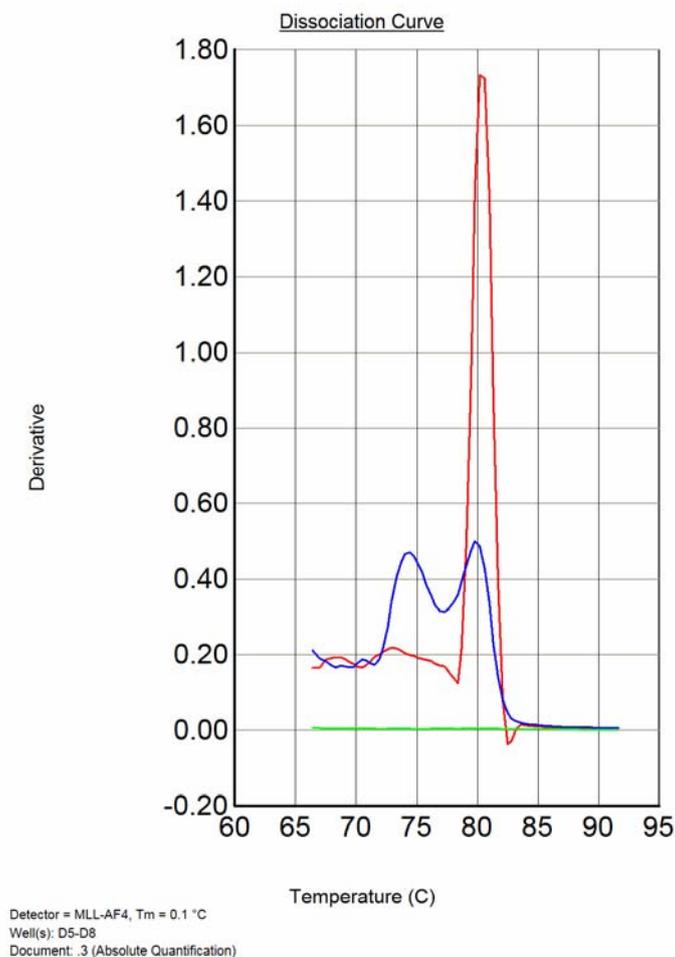
Por lo que se realizaron modificaciones consistentes en la utilización de primers específicos, dilución de la concentración inicial de primers (36) y dNTPs y normalización a 100 ng de cDNA (ver figura 20).



**Figura 20. Estandarización de concentraciones óptimas de cDNA.** Para evaluar la cantidad de cDNA a utilizar, se realizaron diluciones de cDNA a diferentes concentraciones.

Sin embargo, aún así se generaba una señal de amplificación en las muestras conocidas como negativas, generando una curva de disociación diferente a MLL-AF4 y GAPDH, identificada únicamente en las células HL60 utilizadas

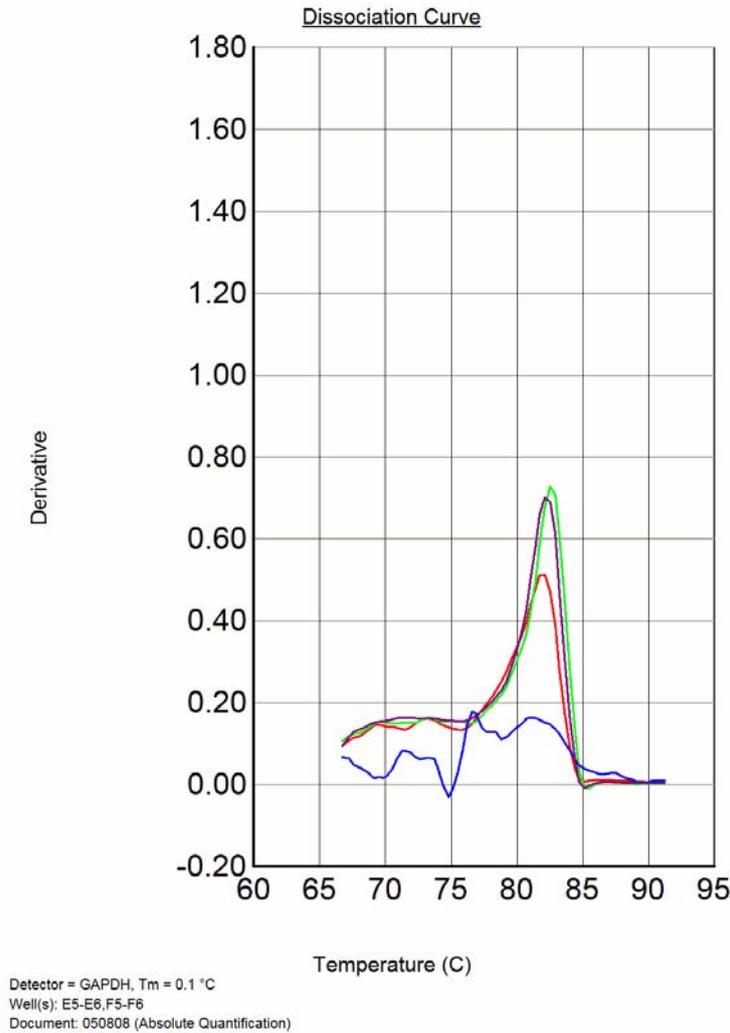
como control negativo, así como en los casos previamente conocidos como negativos por secuenciación ( ver figura 21 ), los cuales al identificarse en gel de agarosa postamplificación, no mostraban banda positiva a MLL-AF4, tan solo la banda correspondiente al gen GAPDH. Lo anterior se atribuye principalmente a la presencia de sales, dNTPs y exceso de primers que pudieran ser depurados por medio de columnas de purificación. Sin embargo, debido a que el primer utilizado detecta el 85% de los puntos de ruptura conocidos para la traslocación en estudio, se decidió que todas las muestras que presentaran esta señal probadas contra el control negativo y positivo, fueran verdaderas negativas, evitando así el uso de sondas TaqMan.



**Figura 21. Comparación de curvas de disociación positivo y negativo.** En azul, amplificación de control negativo con dos picos de amplificación el primero mayor de 4°C de diferencia al control positivo, en rojo amplificación de control positivo y en verde reactivo sin templado (NTC) que indica ausencia de contaminación.

El control interno de amplificación se realizó con el gen GAPDH tanto para RT-PCR convencional como RT-PCR en Tiempo Real se realizó con el propósito de evidenciar amplificación y por lo tanto en caso de un resultado negativo, se pudiera atribuir a un verdadero negativo ya que este resultado no era por falta de templado (ver figura 22). Por regla general debe ser coamplificable a las mismas condiciones que el gen diana garantizando que cada reacción tenga un parámetro estable de referencia, lo que la hace específica del gen, sin embargo

al correr el gel postamplificación la banda obtenida para GAPDH presentaba menor intensidad que la banda para el gen MLL-AF4, lo anterior probablemente a la diferencia de peso molecular entre ambos.



**Figura 22. Amplificación control interno RT-PCR en Tiempo Real.** En rojo, imagen de control positivo RS4 con cDNA integro, en verde muestra de paciente con cDNA integro y en azul muestra de paciente con insuficiente cDNA, por lo que no hay amplificación y se descarta un verdadero negativo. En cuanto al proceso de automatización de RT-PCR, la ventaja de utilizar el equipo ABI 7300 radica en la lámpara de halogeno-tungsteno la cual provee una excitación uniforme en un amplio rango de amplitud de ondas, lo que es particularmente importante cuando se considera realizar múltiples reacciones que requieran la elección de un espectro específico basado en fluoroforos monocromáticos para minimizar interferencias entre las mismas.

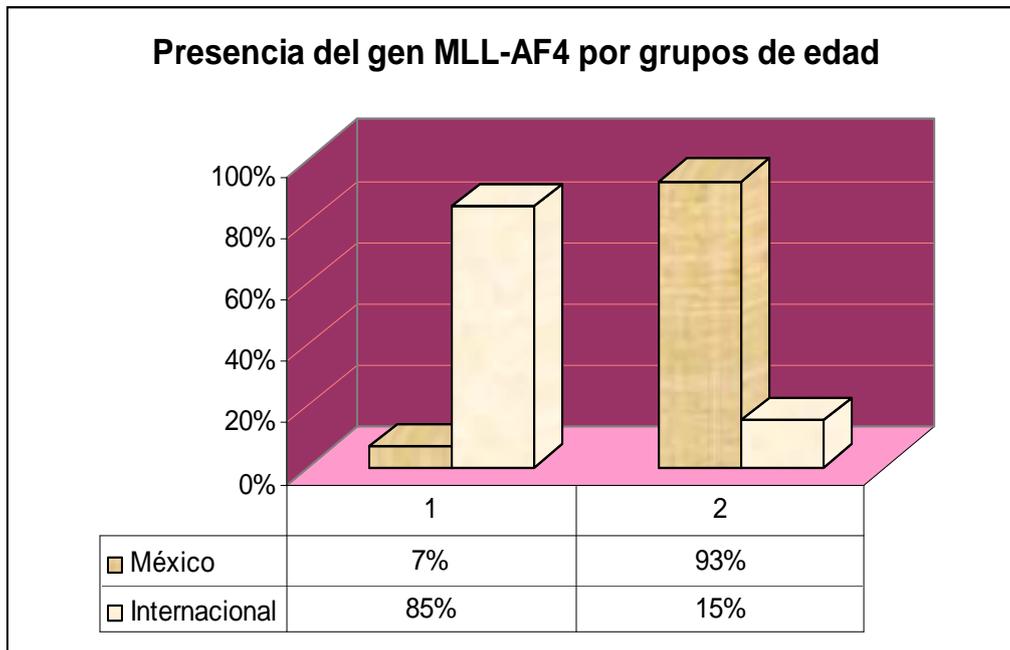
Aunque RT-PCR en Tiempo Real fue igual de sensible que RT-PCR convencional, los ensayos en RT-PCR en Tiempo Real tienen ventajas significativas (36). La forma de medir la cantidad de transcrito en RT-

PCR convencional se basa en la intensidad de la tinción del gel de agarosa o acrilamida con bromuro de etidio, - medición cualitativa -, este reactivo es altamente cancerígeno, hay mayor tiempo de consumo en la elaboración del gel, así como en la electroforesis y visualización del gel en cámara de rayos UV, y tiene mayor posibilidad de manipulación o contaminación de los productos de amplificación.

RT-PCR en tiempo Real no sólo detecta la presencia o ausencia del gen a identificar, principalmente cuantifica y en un sólo paso realiza detección, amplificación y cuantificación visualizada en el monitor en cada ciclo de PCR. Otro punto importante es que RT-PCR convencional puede detectar una célula entre 10.000 en tanto que RT-PCR tiempo Real detecta una célula entre 100.000 lo que la hace particularmente útil en la detección de transcritos que pueden variar de acuerdo al momento del proceso leucémico.

Al igual que cualquier ensayo de diagnóstico clínico, RT-PCR en Tiempo Real debe ser adecuadamente estandarizado y validado (41). El proceso de estandarización es principalmente para conocer la metodología necesaria para que en cualquier laboratorio pueda ser aplicada la prueba y junto con la validación, aplicarlo en la práctica clínica. Para lo anterior, se demostró que el gen control amplifica con igual eficiencia y llega a la fase de meseta con el gen diana. Esto es muy importante en caso de requerir una cuantificación, ya que por medio de diluciones se puede calcular la concentración del control interno para establecerlo como un control interno válido para la cuantificación relativa. En este protocolo se logro la coamplificación del gen control interno GAPDH y el gen diana MLL-AF4.

Las ventajas sobre otras pruebas que miden la expresión de genes están basadas en que los ensayos de PCR en tiempo real son de 10,000- a 100,000-veces más sensibles que los ensayos RNases (43), 1000 veces más sensibles que la hibridación do-blot, puede discriminar entre RNA mensajeros con casi la misma secuencia que la investigada, requiere mucho menos templado de RNA. En la práctica médica, la utilidad de la prueba se basa en la detección de marcadores específicos de enfermedad - particularmente útil en la detección de genes de fusión -, ya que hay estudios en tiempo real que pueden detectar todos los puntos de ruptura de un particular gen fusionado a partir de muestras de sangre periférica. En el presente protocolo, los primers utilizados detectan el 85% de los puntos de fusión, siendo uno de ellos el más frecuente, lo que es importante para el análisis de los resultados obtenidos, ya que de las muestras procesadas 14 del grupo de pacientes resulto positiva al gen MLL-AF4, correspondiendo al 46% del total, de los cuales 3 pacientes fueron menores de 1 año correspondiendo al 7% y el resto mayores de 1 año 93%. Estos resultados no están de acuerdo con la literatura internacional ya que la presencia del gen MLL-AF4 en menores de 1 año oscila entre el 70-85% y en mayores de un año entre el 2 al 5 %,y en otros reportes hasta el 15%.



**Figura 23. Presencia del gen MLL-AF4 por grupos de edad.** En color tierra corresponde a lactantes y el color marfil a niños mayores de un año. Gráfica que ilustra una alta presencia del gen MLL-AF4 en población mexicana pediátrica en comparación a reportes internacionales.

Diversos estudios indican que existen significantes diferencias en la distribución de los puntos de ruptura, lo que sugiere que existen mecanismos asociados a la edad y el proceso de desarrollo en sí que influyen en la expresión del gen (49), otros más apuntan a que existe un segundo evento molecular - posterior a la expresión del gen - que inicia el proceso leucémico -, y probablemente nuestra población pediátrica esté expuesta a ese segundo evento (50, 51).

Por lo tanto nuestros resultados pudieran estar en razón del primer utilizado el cual detecta el 85% de los puntos de ruptura y uno de ellos es el más frecuente, si en otros estudios sólo se utilizó el primer para detectar el punto de ruptura más frecuente reportado en lactantes, entonces tal vez el resto de los puntos de ruptura aquí detectados son propios - por así decirlo - de la población estudiada y se encuentran en mayor proporción. La otra posibilidad radica en que la mayoría de los autores coinciden en la posibilidad de un segundo evento genético que posibilite la expresión del gen MLL-AF4 y por lo tanto nuestra población pediátrica esté expuesta a ello, ya que aunque existe evidencia del desarrollo in útero de este gen, la manifestación del proceso leucémico en nuestra población se da en pacientes mayores de un año

coincidiendo con el periodo de latencia que varios autores han indicado, aunque también en esto no hay consenso, ya que según Ukun y cols., los genes fusionados a MLL presentan un desarrollo muy rápido de la leucemia es por eso que su frecuencia es mayor en lactantes, y según últimos estudios, el gen fusionado puede presentar hasta 40 años de latencia antes de que un segundo - probable - evento genético origine el desarrollo de la leucemia con expresión del gen MLL-AF4.

La posibilidad de falsos positivos se descarta debido a que se integró un control interno (GAPDH) en una reacción múltiple con el gen MLL-AF4, además todos los casos positivos fueron confirmados por secuenciación génica, que es un requisito para confirmar el resultado (58), así como la confirmación por otros investigadores, segundo requisito cumplido.

Ahora bien, existe evidencia que indica que la identificación de este gen de fusión antes del inicio de la quimioterapia puede modificar el tratamiento (52, 59) lo que quedó claramente demostrado en el caso de un paciente al cual hace 2 años se le diagnosticó con leucemia linfoblástica aguda positivo al gen MLL-AF4. Se procesó la muestra criopreservada de hace dos años y se corroboró la traslocación. Se obtuvo una actual muestra de sangre periférica, la cual se procesó tanto en RT-PCR convencional como en RT-PCR Tiempo Real y en ambos fue negativa. Actualmente el paciente se encuentra en vigilancia. Este caso plasma la utilidad de la detección del gen MLL-AF4 ya que se realizó modificación del tratamiento y el paciente evolucionó satisfactoriamente. Por otra parte, el paciente actualmente se encuentra en vigilancia y al aplicar nuevamente la prueba diagnóstica con reporte negativo, se contribuye a descartar una recaída. Otro caso, una paciente de 9 años incluida en este protocolo la cual fue diagnosticada con leucemia linfoblástica aguda, sin mejoría durante su tratamiento, se realizó la aplicación de la prueba para la detección del gen de fusión MLL-AF4 el cual resultó positiva, ante lo cual se planteó la posibilidad de trasplante.

Dos muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia aguda mieloblástica y con inmunofenotipo bifenotípico fueron positivas al gen MLL-AF4 y aunque se acepta que la traslocación MLL-AF4 es casi siempre exclusiva de leucemia linfoblástica aguda, en tanto que la traslocación MLL-AF9 se encuentra predominantemente en leucemia mieloide aguda (57), existe un reporte previo de Johansson y cols., (3) que indica que la traslocación  $t(4;11)(q21;23)$  se encuentra involucrada en aproximadamente el 95% de los casos con leucemia linfoblástica aguda y en 3% de los casos con leucemia mieloblástica aguda, la mayoría M4 o M5. Aquí lo importante es que los hallazgos del grupo de Johansson y cols.,- y de hecho en todos los reportes publicados que asocian a la  $t(4;11)(q21;23)$  con leucemia mieloblástica aguda -, se realizaron en muestras de pacientes con presencia de la traslocación  $t(4;11)$  secundaria al tratamiento, y, en el presente estudio se reportan dos muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloblástica aguda de novo, sin tratamiento, que presentan la traslocación  $t(4;11)$  con un inmunofenotipo bifenotípico.

En cuanto a las dos muestras de sangre de cordón umbilical criopreservadas, existen diversos reportes que difieren entre sí, dividiéndose en tres grupos: Los que niegan la existencia del gen MLL-AF4 en sangre de cordón umbilical, los que afirman que si está presente pero que clínicamente no existe una repercusión y los que afirman si existen repercusiones clínicas. El primer grupo se integra por Trka y cols., que analizaron 103 cordones umbilicales y no encontraron evidencia del gen en ninguno de ellos, aún así sugieren el screening de las células de cordón umbilical antes del trasplante. El segundo grupo es representado por Uckun y cols quienes afirman haber identificado el gen en sangre de cordón umbilical pero que debido a que también se identificó en médula ósea de un niño sano y en 25% de médula ósea fetal normal, concluye que la presencia del gen no es suficiente para la transformación leucémica y cuestionan la veracidad de los reportes de Trka, originando una guerra de cartas al editor que los coloca en bandos opuestos. Una vez polarizado el tema, avanza la ciencia al igual que los trasplantes de cordón umbilical, se hacen los primeros reportes a largo plazo de estos trasplantes tanto en niños como en adultos, y hasta el momento no se conoce un solo caso de leucemia linfoblástica aguda asociada al gen MLL-AF4 de origen en las células de cordón umbilical transplantada. Las causas son diversas, la primera es que no se realiza el screening dirigido al gen MLL-AF4 a las células de cordón umbilical y por lo tanto en realidad no hay forma de saber cuantas de esas unidades a transplantar en realidad tienen el gen, y en segundo lugar no se realiza un seguimiento dirigido a la detección del gen MLL-AF4 en los pacientes transplantados. Aunque algo es cierto, no existen diferencias significativas al compararse con el trasplante de médula ósea, lo que podría servir como un punto de referencia (60). Hasta el momento sólo se conoce un caso de un niño de un año de edad el cual falleció posterior al trasplante de células de cordón umbilical con diagnóstico de leucemia secundaria a células de donador (DCL) complicación muy rara (61). Estos últimos comprenden el tercer grupo.

Para concluir, existe evidencia directa del origen prenatal de la leucemia linfoblástica aguda demostrado en 1997 por Gale y cols., quienes detectaron al gen MLL-AF4 en sangre de neonatos quienes desarrollaron leucemia linfoblástica aguda a la edad de 5 meses a 2 años. Estudios en modelos animales revelan que células portadoras del gen de fusión MLL-AF4 transplantadas en ratones con síndrome de inmunodeficiencia combinada - escenario de pacientes en protocolo de trasplante - injertan muy eficientemente y dan inicio a una muy rápida y agresiva leucemia (54). Los anteriores datos, aunados a la alta incidencia de la leucemia linfoblástica aguda en México, y sobre todo a la alta frecuencia de la presencia del gen MLL-AF4 en población pediátrica mexicana, debe ser tomado en cuenta en los programa de trasplantes de células progenitoras de cordón umbilical, sobre todo en aquellos casos de trasplante autólogo.

## Conclusiones

1. Se estandarizó un ensayo de identificación de expresión de genes de fusión por medio de RT-PCR en Tiempo Real, monocromático, que permite la identificación de amplicones específicos basados en sus características de punto de fusión visualizadas por medio de curvas de disociación.
2. Se realizó la validación de RT-PCR en Tiempo Real para la identificación del gen MLL-AF4.
3. RT-PCR en Tiempo Real tiene la ventaja de otorgar un valor a cada muestra amplificada, que puede ser utilizado para calcular dosificación génica por medio del cálculo de Ct, contribuyendo en la estratificación de los pacientes al inicio del tratamiento no sólo como positivos y negativos, sino también como método preventivo al identificar pacientes con posibles recaídas, y en los casos negativos, para evitar la exposición prolongada a la toxicidad del tratamiento.
4. Aunque ambas pruebas presentan la misma sensibilidad y especificidad en la identificación del gen MLL-AF4, RT-PCR en tiempo real ofrece las siguientes ventajas: no requiere la separación electroforética de los productos de PCR lo que disminuye la posibilidad de contaminación, y de forma indirecta evita el contacto con bromuro de etidio - sustancia cancerígena - por el operador, es más rápida y reproducible. Otra ventaja es que se pueden adaptar diferentes fluorocromos para realizar detecciones múltiples.
5. Dos muestras de los casos control fueron positivas en ausencia de la enfermedad, estos dos casos corresponden a muestras de sangre de cordón umbilical, lo que se traduce en lo siguiente: la posibilidad de que una persona sin diagnóstico de la enfermedad resulte positiva es del 0.05%.
6. La probabilidad de que la prueba identifique correctamente a una persona positiva al gen MLL-AF4 es de 100% y negativa al gen MLL-AF4 es del 93% tanto en RT-PCR convencional como en RT-PCR tiempo real.
7. Estos resultados son aplicables a la población de pacientes semejantes a los estudiados, si se utilizan las mismas técnicas, y pueden ser realizadas por personal médico especializado en una unidad de atención que cuente con el equipo necesario con la capacidad de procesar hasta 92 muestras de pacientes por placa en 2 horas.

## **Perspectivas**

Se pretende montar una prueba de PCR en tiempo real donde se estandarice un multiplex que detecta al menos cuatro de las traslocaciones más comunes en la población Mexicana.

Debido a la alta incidencia y frecuencia del gen MLL-AF4 en la población pediátrica mexicana, es imperativo profundizar en el conocimiento del comportamiento del gen tanto en células normales como en aquellas alteradas con función cancerosa, completar la identificación de todos los puntos de ruptura puede guiarnos en ese trabajo.

Un resultado positivo al gen MLL-AF4 esta asociado con un pronostico no favorable; sin embargo la significancia pronostica de los diferentes puntos de ruptura transcritos no ha sido determinada, por lo tanto sería trascendente la identificación de los mismos, evaluar su frecuencia y relación a tratamiento o supervivencia o incluso en los casos positivos ausentes de enfermedad identificar el punto de ruptura asociado.

Al realizar la identificación oportuna del gen MLL-AF4 se puede mejorar la clasificación pronóstica de los pacientes y disminuir la cantidad de pacientes que recaen. Lo anterior traerá una mejor supervivencia y una disminución de los costos de la atención médica de estos pacientes.

Se pretende reportar al Banco de Células de Cordón Umbilical el resultado de las dos unidades criopreservadas positivas al gen MLL-AF4, en primera instancia para conocer si ya han sido transplantadas y de ser así realizar el seguimiento, y en caso de no haber sido transplantadas, solicitar muestra de ambas unidades para que el resultado sea confirmado o no por secuenciación génica. De confirmarse el resultado la sugerencia será valorar el screening de las muestras a criopreservar dada la alta evidencia que sugiere el desarrollo del gen MLL-AF4 in útero, así como la alta incidencia y frecuencia de la leucemia linfoblástica aguda asociada a este gen en población pediátrica mexicana.

## Lista de Abreviaturas

cDNA	Acido Desoxirribonucleico complementario
DNA	Acido Desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato deshidrogenasa
LLA	Leucemia Aguda Linfoblástica
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
ML	Mixed Lineage Leukaemia
µL	Microlitros
mL	Mililitros
mV	Milivolts
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Retrotranscripción de la polimerasa
T <sub>m</sub>	Punto de fusión
TR	Tiempo Real

## Bibliografía

1. Luque J., Herráez A., *Biología Molecular e Ingeniería Genética*, 2000.
2. Wong M.L., Medrano J.F., Real time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005. 39(1).
3. Johansson B., Moorman AV., y cols., Hematologic malignancies with t (4; 11) (q21; q23) – a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical estudy of 183 cases. *Leukemia*. 1998. 12:779-789
4. Bagg A., *The Molecular Genetics of Hematologic Malignancies. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1995. 2(6):255-262
5. Bertrand F.E., Spengeman J.D., and cols., B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia*. 2003. 17:2454–2459
6. Greave M.F., Wiemels J., Origins of chromosome translocation in childhood leukemia. *Nature Review Cancer*. 2003. 3(9):1-11
7. Gale K.B., For A.M., Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences*. 1997. 92(12):13950-13954.
8. Krzystof y cols., Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews* 2004.18, 115–136
9. Ferris J.T., García J.G., y cols., Factores de Riesgo para las leucemias agudas infantiles. *An Esp Ped*. 2004. 50: 439-446.
10. Correa-González, L., Mandeville P.B. y cols., Valor pronóstico del inmunofenotipo en la respuesta temprana de la leucemia aguda linfoblástica pre-B en niños *Gac Méd Méx* Vol.141 No. 6, 2005.
11. Lassaletta A.A., Leucemias. *Leucemia Linfoblástica Aguda. Pediatr Integral*. 2004. 8((5)):435-442
12. Rivera L.R., La importancia de los factores pronósticos en leucemia aguda linfoblástica (LAL) de la población pediátrica en un país en vías de desarrollo *Revista del Instituto Nacional de Cancerología. Artículo de Revisión*. 2000.46 (4): 260-266.
13. Miller R.W., Young J.L., Childhood cancer. *Cancer*. 1995.75:395
14. Shu X.O., Epidemiology of childhood leukemia. *Curr Opin Hematol*. 1997. 4:227.
15. Mejía A.J., Ortega A.M. y cols., Tendencia de seis principales causas de mortalidad en niños mexicanos durante el periodo de 1971-2000. La transición epidemiológica en los niños. *Rev Med IMSS*. 2005. 43 (4): 323-333.
16. Mejía-Aranguré J.M., Bonilla M., Lorenzana R., Juárez Ocaña S., Reyes G., Pérez Saldivar M.L., González-Miranda G., Bernáldez-Ríos R., Ortíz-Fernández A., Ortega-Alvarez M., Martínez-García M.C., Fajardo-Gutierrez A., Incidence of leukemias in children from El Salvador and México City between 1996 and 2000. Population-based data. *BMC*. 2005. 5:33
17. Juárez-Ocaña S., González-Miranda G., Mejía Aranguré J.M., Rendon-Macías M.E., Martínez García M.C., Fajardo Gutierrez A., Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996–2001). *BMC* . 2004. 4:50

18. Lightfoot TJ, Roman E., Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol App Pharm.* 2004. . 199:104-117. 2004
19. Aplan P.D., Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends in Genetics. Review.* 2006. 22(1).
20. Huret J.L., Dessen P., Bernheim., An Atlas on Chromosomes in Hematological Malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia.* 2001. 12:987-999.
21. Tomohiko T., Masafumi T., Chromosomal translocations in cancer and their relevance for therapy. *Current Opinion in Oncology.* 2006. 18:62–68.
22. Marschalek R., Identification of Target Genes of the Nuclear Oncoprotein AF4 Involved in t(4;11) High Risk Acute Leukemia Disease-oriented Genome Networks Cancer Network: Combating Cancer through Integrated Functional Genomic Research
23. Rowley J.D., Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia.* 2000. 14:513-517 Bergh A.V., Gargallo P., Prijck B.D., Vranck., Marschalek R., Larripa I., Kluin Ph., Cryptic t(4;11) encoding MLL-AF4 due insertion of 5´MLL sequences in chromosome 4. *Leukemia.* 2001. 15: 595-600.
24. Bertrand F.E., Spengeman J.D., Shah N., LeBien T.W., B.cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceed in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia.* 2003. 17:2454-2459.
25. Bertrand E.F., y cols., Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/AF4 fusion protein. 2001 98: 3398-3405
26. Domer P.H., Fakharzadeh S., Chein-Shing C., Jockel J., Johansen L., Silverman G.A., Kersey J.H., Korsmeyer S.J., Acute mixed-lineage leukemia t(4;11) (q21;q23) generates and MLL-AF4 fusion product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993 .90 (8): 7884-7888
27. Dongen JJM., Macintyre E.A., Gabert J.A., Delabesse E., Rossi V., Saglios G., Gottardi E., Rambaldi A., Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease *Leukemia.* 1999. 13: 1901-1928
28. Hendrich B., Chromatin Structure and Modification: Defects. *Encyclopedia of life sciences.* 2005. [www.els.net](http://www.els.net)
29. Mirault M.E., Boucher P., Trenblay A., Nucleotide-Resolution Mapping of Topoisomerase-Mediated and Apoptotic DNA Strand Scissions at or near an *MLL* Translocation Hotspot. *The American Journal of Human Genetics.* 2006. 79(11)
30. Rugarli E.I., Disease-related Genes: Functional Analysis. *Encyclopedia of life sciences. TIGEM.* 2005 [www.els.net](http://www.els.net)
31. Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G et al. The t (4; 11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 1992; 71(4):701-708.
32. Morrissey J, Tkachuk DC, Milatovich A, Francke U, Link M, Cleary ML. A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t (4; 11) acute leukemias. *Blood* 1993; 81(5):1124-1131

33. Levon H.R., y cols. Reordenamiento del gen MLL en pacientes pediátricos con leucemia aguda. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter.* 2001. 17(2):108-114
34. Nizet Y, Mariat P, Vaerman JL et al. Follow up of residual disease (MDR) in B lineage acute leukaemias using a simplified PCR strategy: Evolution of MDR rather than its detection is correlated with clinical outcome. *Br J Haematol.* 1991. 79: 205-10
35. By Fatih M. Uckun, Kim Herman-Hatten, Uckun F.M., Herman-Hatten., Clinical Significance of *MLL-AF4* Fusion Transcript Expression in the Absence of a Cytogenetically Detectable t(4;11)(q21;q23) Chromosomal Translocation *Blood*, 1998. 92(3) August 1: 810-821
36. Jiménez C.E., *Manual de Técnicas de Biología Molecular Básica.* Ed. Prado. 2004.
37. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcripción PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2002. 29:23-39
38. Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M., A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Research.* 1996.6:995-1001
39. Mocellin S., Rossi R., Pierlui P., Nitti D., Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. 2003. *Trends in Molecular Medicina.* 9(5):189-195
40. Argimon P.J., Jiménez V.J., *Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica.* Tercera Edición. Elsevier. 2000
41. Londoño J.L., *Metodología de la investigación epidemiológica.* 3ª. ed. Ed. Manual Moderno. 2004
42. Craig L.P., Jacques C., Cellular machineries for chromosoma DNA repair. *GENES & DEVELOPMENT.* 2004.18:602–616
43. Siraj A.K., Ozbek U., Preclinical Validation of a Monochrome Real Time Multiplex Assay for translocation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research.* 2002. 8(12): 2832-3840
44. Bustin S.A., Mueller R., Real Time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science.* 2005. 109:365–379
45. Curry J.D., McHale C., Factors Influencing Real-Time RT-PCR Results: Application of Real-Time RT-PCR for the Detection of Leukemia Translocations. *Molecular Biology Today.* 2002. 3:79-84
46. Hochhaus, A., Reiter, A., Skladny, H., Reichert, A., Saussele, S. and Hehlmann, R. (1998) Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results Cancer Res.* 144, 36–45
47. Faderl, S., Talpaz, M., Kantarjian, H. M. and Estrov, Z., Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making? *Blood.* 1999. 93:2755–2759
48. Gabert, J., Detection of recurrent translocations using real time PCR; assessment of the technique for diagnosis and detection of minimal residual disease. *Haematologica* 1999. 84:107–109

49. Reichel M., Gillert E., Angermuller S., Hensel J.P., Heidel F., Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infant versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene*. 2001. 20:2900-2907.
50. Gué M., Jian-Sheng S., Boudier T., Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL gene interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited. *BMC Cancer*. 2006. 6:20
51. Maia A.T., Ford A.M., Jalali R., Harrison C.J., Taylor G.M., Eden O.B., Greavez M.F., Molecular Tracking of leukemogenesis in a triplet pregnancy. 2001. 98 (2): 478-482
52. Cario G., Stanulla M., Fine B.M., Teuffel O., Neuhoff N., Schrauder A., Flohr T., y cols., Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2005. 105 (8):821-826
53. By Fatih M. Uckun, Kim Herman-Hatten, Uckun F.M., Herman-Hatten., Clinical Significance of *MLL-AF4* Fusion Transcript Expression in the Absence of a Cytogenetically Detectable t(4;11)(q21;q23) Chromosomal Translocation *Blood*, 1998. 92(3) August 1: 810-821
54. Thomas M., Gewbner A., Hans-Peter V., Hadwiger P., Greil J., Hewindenreich O., Targetin MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood*. 2005. 106 (07):3559-3566
55. Metzler M., Forster A., Pannell R., Arends M.J., Daser A., Lobato., Rabbits TH., A conditional model of MLL.AF4 B-cell tumorigenesis using invertebrate technology. *Oncogene*. 2006. 3093-3103
56. Kersey J.H., Wang D., Oberto M., Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia*. 1998. 12: 1561-1564
57. Salamanca-Gómez F., *Genómica y Cáncer*. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Gaceta Médica de México*. 2007. 143(5)
58. Trka J., Zuna J., Hrusák O., Michalova K., Muzikova K., Kalinova M., Stary J., No evidence for MLL-Af4 expression in Normal Cord Blood Samples. *Blood*. 1999. 93:1106-1107.
59. Ching-Hon P., Two tales of infant leukemia. *Blood*. 2006. 107: 4576-4577
60. Rocha V., Transplants of Umbilical-Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Acute Leukemia. *N Engl J Med* 2004. 351:2276-2285.
61. Frase C.J., y cols., First report of donor cell-derived acute leukemia as a complication of umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005. 106: 4377-4380