



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETECCIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES DE FUSIÓN
TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4 Y BCR-ABL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS
CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN EL HOSPITAL EDGARDO

REBAGLIATI-2016

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Trabajo Académico para optar el Título de
Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular

Autor (a):

Tantaleán Bazán, Norma Carolina

Asesor (a):

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, María Elena

Velarde Vilchez, Mónica Margarita

Mayanga Herrera, Ana Lucía

Lima - Perú

2021

Referencia:

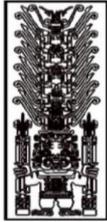
Tantaleán Bazán, N. (2021). *Detección mediante PCR en tiempo real de los genes de fusión TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4 Y BCR-ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda en el Hospital Edgardo Rebagliati-2016*. [Trabajo Académico de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5446>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**DETECCIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES DE
FUSIÓN TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4 Y BCR-ABL EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EN EL
HOSPITAL EDGARDO REBAGLIATI-2016**

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Trabajo Académico para optar el Título de

Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular

Autora:

Tantaleán Bazán, Norma Carolina

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, María Elena

Velarde Vilchez, Mónica Margarita

Mayanga Herrera, Ana Lucía

**Lima – Perú
2021**

INDICE

	Pág.
Resumen	3
Summary	4
I Introducción	5
II Metodología	15
Viabilidad del Proyecto	23
III Resultados	24
IV Conclusiones	37
V Recomendaciones	38
VI Referencias	39

Resumen

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es un trastorno maligno del tejido hematopoyético que se caracteriza principalmente por el aumento en la producción de células linfoides inmaduras o blastos, y es más frecuente en niños. Los esfuerzos para el estudio de las leucemias se enfocan en la búsqueda de biomarcadores pronósticos de respuesta al tratamiento. El presente estudio fue del tipo observacional, descriptivo, prospectivo y de corte transversal; cuyo objetivo principal fue detectar los principales marcadores moleculares pronósticos en la leucemia linfoblástica aguda mediante PCR en tiempo real como son los genes de fusión *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4* y *BCR-ABL* en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins durante el año 2016. Se obtuvieron 45 muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA del hospital Edgardo Rebagliati Martins, se realizó la extracción de ARN utilizando el kit de extracción comercial Ambion Ribopure RNA purification; para detectar los transcritos de los genes de fusión se realizó una PCR en tiempo real de un solo paso utilizando el kit comercial marca Entrogen. Se detectó la presencia de algún gen de fusión en 9 pacientes (20%), de los cuales el gen *TEL/AML1* fue el más frecuente (15.6%).

PALABRAS CLAVE: PCR en tiempo real, genes de fusión, leucemia linfoblástica aguda.

Abstract

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is a malignant disorder of hematopoietic tissue and is mainly characterized by increased production of immature lymphoid cells, it is more common in children. Efforts to study leukemias focus on the search of prognostic biomarkers of response to treatment. The present study was observational, descriptive, prospective and cross-sectional; whose main objective was to detect the main prognostic molecular markers in acute lymphoblastic leukemia by real time PCR such as *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4* and *BCR-ABL* fusion genes in pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in the Edgardo Rebagliati Martins National Hospital during the year 2016. It had 45 bone marrow or peripheral blood samples were collected from pediatric patients with ALL at the Edgardo Rebagliati Martins hospital, RNA extraction was performed using Ambion Ribopure RNA purification commercial kit; to detect fusion gene transcripts real time PCR one step it was performed using Entrogen commercial kit. The presence of a fusion gene was detected in 9 patients (20%), of whom TEL/AML1 gene was the most frequent (15.6%).

KEY WORDS: real time PCR, molecular, fusion genes, acute lymphoblastic leukemia.

I. INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) es el tipo de cáncer infantil más común, también puede afectar a adultos, pero esto sólo representa aproximadamente la tercera parte de todos los casos. Se da al transformarse de forma maligna un progenitor hematopoyético debido a un cambio en su material genético, lo que provoca una diferenciación anormal, proliferación no controlada y supervivencia prolongada, lo que conlleva a un alto número de blastos circulantes, reemplazo de las células de la médula ósea normal por células malignas y una probable diseminación hacia otros órganos.

El tratamiento para la LLA, por lo general abarca quimioterapia combinada para inducción, quimioterapia de consolidación, puede haber trasplante de células madre hematopoyéticas y quimioterapia de mantenimiento durante hasta 3 años; pero, para poder determinar el protocolo de tratamiento existen factores pronósticos favorables y desfavorables, entre los cuales tenemos, al cariotipo, inmunofenotipo y presencia o ausencia de marcadores moleculares: genes de fusión.

La PCR en tiempo real es la técnica de elección por su gran sensibilidad para poder detectar la presencia de algún gen de fusión, y poder estratificar a los pacientes según riesgo.

1.1. Descripción del problema

El cáncer infantil (menores de 15 años) es la segunda causa de muerte (4-5%) en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo es menos del 1% debido a que las causas infecciosas son las más frecuentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que, la incidencia es de 140 casos por millón de habitantes en países desarrollados. En algunos países en desarrollo, donde la población pediátrica comprende el 40 a 50% de la población, la proporción de cáncer infantil representa el 3-10%. Mundialmente los tipos de cáncer infantil más frecuentes son las leucemias, los linfomas y los tumores en el sistema nervioso central. (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2019)

La leucemia linfoblástica aguda (en adelante LLA) representa un grupo heterogéneo de neoplasias hematológicas, definida por la proliferación clonal de las células linfoides y es la más frecuente en pediatría (menores de 15 años). Las distintas alteraciones genético-moleculares le confieren a esta entidad diferentes formas de presentación y respuesta al tratamiento, que reflejan su diversidad biológica. La probabilidad de supervivencia libre de eventos en LLA pediátrica se encuentra alrededor del 70 a 80%, dependiendo de diferentes factores pronósticos, tales como los rearrreglos moleculares que originan genes de fusión, los más frecuentes en esta patología son *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL* y *MLL-AF4*.

La Biología molecular presenta la información clave para el diagnóstico, pronóstico y entorno de la terapia. Dado que la mayoría de las características clínicas de todos son consecuencias de las anormalidades cromosómicas presentes en las células de leucemia, la PCR tiempo real es la tecnología molecular que se ha convertido en una herramienta indispensable para una detección precisa de tales marcadores.

En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) ha surgido como una metodología robusta y es utilizada ampliamente en investigación biológica y en la patología clínica. Su importancia radica en la rápida y precisa valoración de cambios en la expresión de genes como resultado de la fisiopatología.

La técnica de qPCR es altamente sensible y específica, no requiere de manipulación post PCR, los resultados son presentados en tiempo real en la computadora y la cuantificación es posible gracias a las tecnologías de fluorescencia y detección continua.

En nuestro país, el acceder a estas determinaciones es muy limitado, existen estudios en otros países donde se ha determinado la frecuencia de cada uno de ellos y su valor pronóstico, en el nuestro existe ausencia de información sobre éstos.

Para caracterizar mejor a los pacientes pediátricos con LLA se requiere de estudios adicionales como las pruebas moleculares para poder estratificar a los pacientes en alto o bajo riesgo y darles así diferentes enfoques de tratamiento para llevarlos a un mejor resultado del tratamiento con mejores tasas de supervivencia, se propuso así, realizar la implementación de la detección molecular mediante PCR en tiempo real de los cinco genes de fusión más frecuentes en los pacientes pediátricos con Leucemia Linfocítica Aguda.

1.1.1. Formulación del problema

¿Se puede detectar los genes de fusión *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4* y *BCR-ABL* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins durante el año 2016?

1.2. Antecedentes

Ajuba y colaboradores (2016) realizaron un estudio transversal en 40 pacientes entre 9 meses y 54 años recién diagnosticados con LLA en Nigeria; cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de los transcritos de los genes de fusión *ETV6-RUNX1(TEL-AML1)*, *BCR-ABL* y *MLL-AF4* y su efecto en el patrón de presentación de LLA, encontraron las siguientes frecuencias: *BCR-ABL* mayor en el 12.5%, *ETV6-RUNX1* en 5% y 0% para *MLL-AF4*. Demostraron que la presencia de estos genes de fusión no tiene algún impacto clínico ni de laboratorio en la presentación de la LLA. (Ajuba et al., 2016)

Guerra y colaboradores (2016) estudiaron las alteraciones moleculares: *TEL-AML1*, *MLL-AF4*, *BCR-ABL* menor y *E2A-PBX1* en muestras de médula ósea de 91 pacientes pediátricos con LLA del 2012 al 2013 y detectaron las siguientes frecuencias: *TEL-AML1* con 7.21%, *E2A-PBX1* con 5.15% y no detectaron ni *MLL-AF4*, ni *BCR-ABL* menor. Concluyeron que las frecuencias encontradas eran consistentes con las obtenidas en la literatura y que *E2A-PBX1* es encontrada en alta frecuencia en países en desarrollo. (Guerra et al, 2016)

Kadhom y colaboradores (2015) estudiaron la expresión de los genes de fusión *TEL-AML1* y *E2A-PBX1* en pacientes pediátricos con LLA en Irak en un estudio caso-control donde analizaron la expresión de estos genes en 48 aspirados de médula ósea de pacientes con LLA y 46 sujetos control. El screening molecular detectó transcritos de *TEL-AML1* en el 20.8% de pacientes con LLA, mientras que el transcrito *E2A-PBX1* se detectó en el 16.7% de los mismos pacientes. Concluyeron que la prevalencia molecular de los genes de fusión *TEL-AML1* y *E2A-PBX1* en niños iraquíes con LLA es similar a reportes previos en otros lugares del mundo. (kadhom et al., 2015)

Ivanov y colaboradores (2011), buscaron identificar la ocurrencia de cuatro genes de fusión en LLA-B en 105 pacientes hospitalizados entre el 2009 y 2013 en Rumanía, a los cuales se les hizo el inmunofenotipo y análisis molecular al diagnosticarlos con LLA-B. Demostraron que no había asociación entre el inmunofenotipo y la presencia de algún tipo de gen de fusión evaluado, siendo ambos métodos en combinación con un pre-requisito para mejorar la subclasificación de malignidades hematológicas, decisión terapéutica y evaluación de la respuesta al tratamiento. (Ivanov et al., 2011)

Pakakasama y colaboradores (2008), desarrollaron métodos RT-PCR simples para identificar transcritos de fusión comunes en Leucemia Aguda recién diagnosticada en niños en Bangkok-Tailandia, incluyeron 83 niños diagnosticados con LLA y 20 con leucemia aguda no linfoblástica; a todos se les extrajo ARN de aspirado medular y se les corrió dos paneles multiplex, el panel A(LLA) incluyó primers para *TEL-AML1*, *E2A-PBX*, *MLL-AF4* y *BCR-ABL(p190)*, mientras que el panel B (Leucemia Aguda no linfoblástica) incluyó primers para *AML-ETO*, *PML-RARA* y *CBFB-MYH11*. Obtuvieron las siguientes frecuencias en los pacientes con LLA: *TEL-AML1* de 25.4%, para *E2A-PBX* un 4.8%, para *MLL-AF4* 1.6% y para

BCR-ABL un 1.6%; mientras que para las muestras con las que se hizo el panel B encontraron un 20% para *AML1-ETO* y un 5% para *PML-RARA*. Demostraron que su RT-PCR multiplex simple para detección de transcritos de fusión en Leucemia Aguda pediátrica resultó ser un método rápido, certero y efectivo. (Pakasama et al., 2008)

Alonso y colaboradores (2006), buscaron detectar la presencia de los rearrreglos *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *BCR-ABL* y *MLL-AF4* en pacientes con LLA en Argentina. Estudiaron el ARN de 151 niños con diagnóstico de LLA; de ellos, 136 fueron mayores y 15 menores de un año de edad. La búsqueda por RT-PCR de los 4 rearrreglos mencionados se realizó en 129/151 pacientes (85,4%). Los resultados fueron los siguientes: *TEL-AML1*: 15(11,6%); *E2A-PBX1*: 5(3,9%); *MLL-AF4*: 11(8,5%); *BCR-ABL*: 2(1,6%); negativo para los 4 rearrreglos: 92(71,3%); positivo para otros rearrreglos: 4(3,1%). Entre las características de inmunofenotipo, encontraron que el estadio B común fue el predominante (61.1%), seguido del Pre-b (32.8%), Pro-B (6.1%); y de otra estirpe 11.4% representaron los de precursor T y 3.8% de los pacientes tuvieron un inmunofenotipo ambiguo. El estudio molecular confirmó la caracterización citogenética convencional (CC) en 11 casos y la amplió en otros 22: 15 *TEL-AML1*, 1 *E2A-PBX1*, 5 *MLL-AF4* y 1 *BCR-ABL*. Concluyeron que el diagnóstico molecular de LLA aumenta la detección de anomalías contribuyendo a una mejor caracterización de las leucemias. Su incorporación y estandarización en el ámbito público son fundamentales para optimizar la estratificación de los pacientes de acuerdo al grupo de riesgo con la consiguiente adecuación del tratamiento. (Alonso et al., 2006)

En un estudio realizado por Artigas y colaboradores (2006) en Chile, el objetivo fue estudiar la frecuencia de los genes de fusión *TEL/AML1* y *BCR/ABL* en niños con LLA; analizaron muestras de médula ósea en 56 niños con LLA mediante RT-PCR nested para ambos

genes de fusión. Detectaron el gen de fusión *TEL/AML1* en el 23% y el gen de fusión *BCR/ABL* en 4% de los niños, los pacientes positivos para *BCR/ABL* tuvieron una sobrevida más baja en comparación con el resto. Concluyeron que la frecuencia de estos genes de fusión en niños chilenos con LLA es similar a los descritos por otros autores. (Artigas et al., 2006)

Mora y colaboradores (2011) determinaron la frecuencia de las principales fusiones génicas en la leucemia linfática en 23 pacientes menores de 15 años del INEN - Perú, hallando lo siguiente: *ETV6/RUNX1* (17.4%), *BCR/ABL* variante p190 (8.7%), *BCR/ABL* variante p210 (8.7%), *E2A/PBX1* (8.7%), *MLL/AF4* (4.3%). Demostraron que esta metodología de estudio de los cinco genes de fusión, debe considerarse como herramienta de apoyo al diagnóstico y monitoreo en uso de terapias blanco en todos los casos de la LLA-B pediátricas. (Mora et al., 2011)

El estudio de la frecuencia de estos genes de fusión en pacientes con LLA han demostrado ser de vital importancia en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo del tratamiento en los casos de Leucemia Linfoblástica Aguda pediátricas. La detección de estos genes de fusión ayuda no sólo a determinar la frecuencia de los mismos, sino que ayuda a asignar protocolos de tratamientos para cada paciente, así como a determinar el pronóstico clasificando las leucemias en bajo y alto riesgo.

1.3. Objetivos

1.3.1. *Objetivo General*

Detectar los genes de fusión *TEL-AML1*, *E2A-PBX1*, *MLL-AF4* y *BCR-ABL* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins en el año 2016.

1.3.2. *Objetivos Específicos*

Detectar el gen de fusión *TEL-AML1* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Detectar el gen de fusión *E2A-PBX1* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Detectar el gen de fusión *MLL-AF4* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Detectar el gen de fusión *BCR-ABL* mediante PCR en tiempo real en pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

Determinar la frecuencia de pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins según sexo y edad.

Determinar la frecuencia de pacientes pediátricos diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins según características hematológicas e inmunofenotípicas.

1.4. Justificación

1.4.1. Justificación teórica de la investigación

Antes, la clasificación de riesgo de las leucemias sólo se centraba en parámetros clínicos y en la respuesta clínica al tratamiento, con el conocimiento de la biología molecular, la detección de genes de fusión presentes en la LLA permite estratificar de manera precisa a los pacientes para asignar protocolos de tratamiento para cada paciente, así como a determinar el pronóstico de los mismos clasificando la leucemia en bajo y alto riesgo. Existe información de trabajos realizados en otros países donde se estudia la detección molecular de los genes de fusión en la LLA, pues se ha demostrado la importancia del estudio de estas fusiones génicas en el pronóstico y monitoreo en los casos de LLA pediátrica. Con esta investigación se puede afianzar los conocimientos sobre la técnica de PCR en tiempo real para poder detectar molecularmente estos genes de fusión en nuestro país y en la actualidad y así corroborar lo encontrado en otros estudios como el realizado en el INEN en el año 2011 con 23 pacientes.

1.4.2. Justificación práctica

La detección de estos genes de fusión mediante una metodología estandarizada como es la PCR en tiempo real en el Laboratorio de Biología Molecular del HNERM permitirá dar al paciente un adecuado tratamiento según la presencia o ausencia de determinado gen de fusión. Los pacientes con o sospecha de LLA serán los mayores beneficiados pues la detección molecular de estos genes de fusión, será de gran utilidad para su diagnóstico, pronóstico, seguimiento y, por tanto, de ayuda en las decisiones clínicas para el pronóstico de su enfermedad.

1.5. Impactos esperados del Proyecto

1.5.1. Impacto Económico

Al hacer una mejor estratificación de los pacientes por grupo de riesgo, ya no se realizarán procedimientos sofisticados, caros y que además necesitan de mayor tiempo de hospitalización como el trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes que presenten genes de fusión de buen pronóstico.

1.5.2. Impacto Metodológico

Las técnicas moleculares como la PCR en tiempo real son muy sensibles y específicas, el cariotipo es una excelente técnica para detectar reordenamientos, pero PCR en tiempo real tiene una sensibilidad 100 veces mayor a ésta; es así que nuestra técnica puede detectar una célula tumoral en 100 000 células normales.

1.5.3. Impacto Social

Los pacientes pediátricos con Leucemia Linfática Aguda podrán recibir un tratamiento más adecuado según el grupo de riesgo en el cual se le coloque, teniendo una mejor oportunidad a un trasplante si se requiere, por lo cual será un gran beneficio en su salud, reconfortando a sus familiares y acortando los tiempos en el hospital, dando oportunidad a otros pacientes que están en espera.

II. METODOLOGÍA

2.1. PCR en tiempo real (qPCR)

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN y ARN). Está basada en el principio del método de la PCR desarrollado por Kary Mullis en los 80 en la cual se amplifican pequeñas cantidades de ácidos nucleicos hasta más de un billón de veces; y además se combina la amplificación y detección en un solo paso, correlacionando el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. La PCR en tiempo real muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de la PCR a medida que ocurre. Así, posee importantes características como su alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto puesto que no necesita realizar una electroforesis al terminar. (Aguilera et al., 2014)

La tecnología de la qPCR se basa en la detección de una señal fluorescente que es producida proporcionalmente durante la amplificación de la muestra blanco. Esta prueba determina el punto en el tiempo durante el ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Esto se determina identificando el número de ciclo en el cual la intensidad en la emisión de fluorescencia se levanta sobre el ruido de fondo. A este número de ciclo se le denomina como ciclo umbral o “threshold cycle” (Ct); el Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de

copias del blanco; entonces, cuanto más alto es el número de copias iniciales del blanco, más pronto se observará un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

2.1.1. Transcripción reversa en la PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La PCR en tiempo real tiene como limitante que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Para superar este problema es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) del ARN antes de que se aplique la PCR en tiempo real; en este caso se conoce como retrotranscripción o RT acoplada a la PCR, la cual se puede realizar en dos pasos o en el mejor de los casos, en uno solo. Para tal fin, se usa la enzima transcriptasa inversa para generar ADNc a partir de una plantilla de ARN, existen varias transcriptasas inversas utilizadas comúnmente, entre ellas tenemos la transcriptasa inversa del virus aviar de mioblastosis y la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina; también es posible usar mezclas de transcriptasas inversas, para una mejor eficiencia de la transcripción inversa. (Vinueza-Burgos, 2009)

Es por ello que la PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) se ha convertido en el método de elección para realizar un examen rápido y cuantitativo de la expresión de genes específicos, lo cual no sería posible con anteriores metodologías. Es importante mencionar que, dado que la PCR en tiempo real y la transcripción reversa se utilizan en combinación, la señal final obtenida en RT-PCR en tiempo real dependerá de la eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa. (Vinueza-Burgos, 2009)

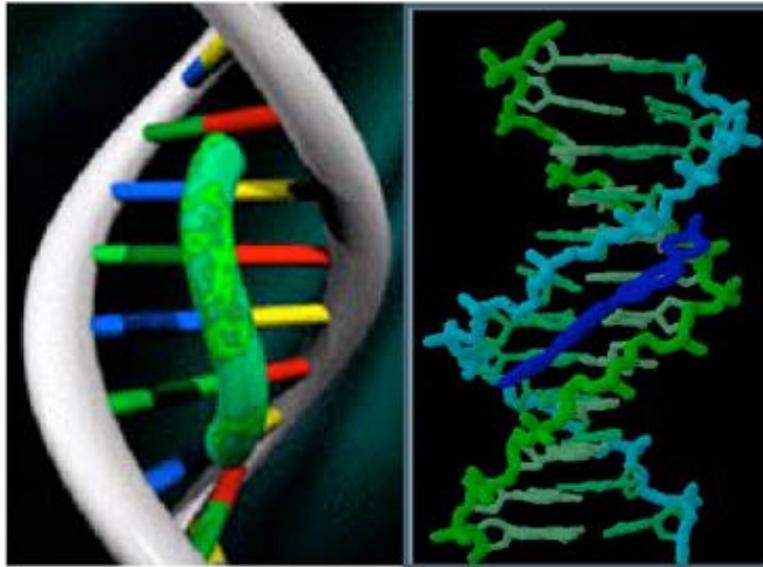
2.1.2. Sistemas de detección usados en la PCR en tiempo real

Los fluoróforos utilizados en la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés o blanco. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

2.1.2.1. Fluoróforos con afinidad por el ADN. También llamados agentes intercalantes, emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Inicialmente, se utilizaba bromuro de etidio, pero no es muy recomendable porque no discrimina de manera eficiente entre ADN de cadena doble o sencilla, además que, al ser un agente que se intercala en el ADN, se ha reportado que interfiere con la polimerización. También, existen otros como BEBO, YOYO-1 y TOTO-1 pero no son usados cotidianamente. El compuesto más utilizado es SYBR *Green*, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena halla en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR *Green* (Figura 1). Una ventaja importante en este tipo de fluoróforos es que el diseño y ajuste del ensayo es directo y los costos son bajos; sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples o *multiplex*, además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN. Por lo anterior, para un uso correcto del SYBR *Green* en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación. La estandarización para obtener un solo producto de amplificación, en algunos casos, consume mucho tiempo y reactivos. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

Figura 1

Representación de la interacción de SYBR Green I con el ADN de doble cadena.



2.1.2.2. Sondas específicas. Se pueden dividir a su vez en tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla. Todas se basan en el principio FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer*), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o *quencher*), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero; mientras que cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector. (Aguilera et al., 2014)

A. Sondas de hidrólisis. Las más conocidas y utilizadas son las sondas *TaqMan* o sondas 5' nucleasas (ya que utilizan la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa). Este sistema utiliza una sola sonda, es decir, un oligonucleótido específico (~20 bases) para la secuencia del gen de interés marcado con dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y

un apagador en el extremo 3'. La longitud de la sonda es la distancia entre los dos fluoróforos, de este modo la fluorescencia del reportero está apagada por el fenómeno FRET. La actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa corta los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, los fluoróforos se separan y se observa la señal de fluorescencia, provocando un incremento en la señal del reportero la cual aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón. Entre estos fluoróforos reporteros tenemos FAM, VIC y NED, entre los apagadores se encuentran TAMRA, DABCYL y BHQ.

B. Sondas de hibridación. Este sistema utiliza dos sondas específicas que hibridan con la secuencia de ADN de interés. Una de ellas está marcada con un donador y la otra con un aceptor. La señal del fluoróforo aceptor es monitoreada por el sistema de detección conforme se da la amplificación del ADN, así la cantidad de oligonucleótidos unidos será mayor por lo que se incrementará la intensidad de la fluorescencia. Este sistema sigue la señal del fluoróforo aceptor de forma opuesta a la sonda de hidrólisis, que siguen la señal del reportero o donador.

C. Sondas de horquilla. Este tipo de sondas está marcada en su extremo 5' con un reportero y el 3' con un apagador, se encuentra formando una horquilla, así se los mantiene cercanos para poder llevar a cabo la transferencia de energía y mantener al reportero apagado. Al unirse a la secuencia de interés, la horquilla se extiende, aumentando la distancia entre el apagador y el reportero, permitiendo detectar la fluorescencia de este último. Estas sondas son altamente específicas. Ejemplo de estas sondas son: los *molecular beacons*, los *scorpions*, los *sunrise primers* así como los *LUX primers*. (Aguilera et al., 2014)

2.1.3. Instrumentación para PCR en tiempo real

Para poder realizar la PCR en tiempo real es necesario el uso de una instrumentación capaz de detectar la señal fluorescente y grabar el proceso de la reacción de PCR, estos instrumentos deben emitir y detectar longitudes de onda específicas simultáneamente. Existen tres formas principales para dar energía de excitación para los fluoróforos: mediante lámparas (por ejemplo, AB 7500, Mx4000, iCycler iQ), diodos emisores de luz o LED (QuantStudio 5, LightCycler, Rotor-Gene) o mediante láser (ABI Prism 7900HT).

Para la colección de datos, la energía de emisión de los fluoróforos debe ser detectada también en longitudes de onda específicas; estos fotodetectores pueden ser cámaras acopladas a dispositivos de carga, tubos fotomultiplicadores u otro tipo de fotodetectores. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

Otra parte importante de la instrumentación es un termociclador para llevar a cabo las reacciones de PCR, éstos pueden ser por un bloque de calentamiento (peltier o por resistencia) o el calentamiento por aire, o una combinación de ambos. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

Y, por último, es necesario un hardware de computación y un software de análisis de datos apropiado donde se pueda visualizar y analizar las curvas de amplificación, para emitir los resultados. (Rodríguez y Rodríguez, 2006)

2.2. Protocolo para detección de genes de fusión para LLA

2.2.1. Obtención y procesamiento de la muestra

En la mayoría de los casos, el médico tratante realiza punción directa para recolectar 3 mL de médula ósea y en algunos casos se obtiene 6 mL de sangre periférica por punción venosa, dentro de las cuatro horas siguientes se centrifugan las muestras a 3000RPM por cinco minutos y se procede a la extracción de ARN.

2.2.2. Extracción de ARN

Se separó el buffy coat de las muestras centrifugadas y se procedió a la extracción de ARN con el kit RiboPure-Blood de ThermoFisher según las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ARN se determinó su concentración mediante la absorbancia a 280nm del ARN, teniendo como mínimo 80ng/uL y para determinar la pureza utilizamos el ratio entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm para determinar si había contaminación con proteínas, teniendo como valores de pureza aceptables en el rango de 1.8 a 2.0; tanto para la determinación de la concentración y de la pureza se utilizó un equipo de espectrofotometría (NanoDrop One, Thermo Scientific); luego de ello se almacenó a -80°C en caso no se realice la PCR en tiempo real en el momento.

2.2.3. PCR en tiempo real ENTROGEN.

Para realizar la PCR en tiempo real de las muestras se utilizó el kit comercial Entrogen, el cual es un kit IVD de un solo paso que detecta cuantitativamente de forma independiente cada uno de los genes de fusión para Leucemia Linfoblástica Aguda; además, viene con un control positivo que es una mezcla de secuencias de ARN del gen de fusión más el gen ABL.

El kit ENTROGEN utiliza sets de primer y sondas de hidrólisis marcadas con FAM para detectar y cuantificar la presencia del transcrito del gen de fusión específico. El mix de primer también contiene primer y una sonda marcada con VIC para detectar la amplificación del gen ABL como control interno, esto permite usar el método comparativo de Ct (método Pfaffl) para determinar los ratios entre el gen blanco y el de referencia sin la necesidad de correr curva de estándares con número de copias conocida. Este kit ha sido formulado para reproducir síntesis de cDNA y la subsecuente PCR en tiempo real en un solo tubo, por lo que es un PCR en tiempo real ONE STEP. Este ensayo puede detectar el gen de fusión en un rango de ARN total entre 200 a 800 ng y chequear que el valor de Ct del control interno sea ≤ 22 para cada reacción.

Se preparó el mastermix según las instrucciones del kit y se trabajaron las muestras por duplicado, en una placa o strip se colocaron 15 μ L del mastermix más 5 μ L del ARN extraído, del control positivo o del control negativo (agua grado molecular) según sea el caso. Se sellaron las placas con Parafilm, se centrifugaron brevemente y se llevaron al termociclador (en el presente trabajo se utilizó un modelo AB 7500 de Applied Biosystems, Thermofisher).

Para el análisis de datos se colocó el umbral según las instrucciones del fabricante, y para el cálculo del ratio de cada muestra se hizo uso de un archivo Excel para aplicar la fórmula suministrada por el fabricante.

2.3. Viabilidad del Proyecto

El proyecto es viable, pues se creó el código de las pruebas moleculares para los genes de fusión (panel molecular para LLA) en el cuadro de requerimientos en el IETSI (Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación) de EsSalud de las pruebas de detección. Además de las especificaciones técnicas para la misma, también se necesitó de un ambiente adecuado para este tipo de pruebas moleculares, por lo que también se hicieron los trámites necesarios para el requerimiento de mejora y adecuación de ambientes; y, por último, se solicitó más personal para el área de Banco de órganos y Biología Molecular del Hospital Edgardo Rebagliati.

Para que todo ello se realice, se necesitó aproximadamente dos años. Es así que, desde fines del año 2013 se empezaron a realizar la detección de algunos genes de fusión para LLA, y ya desde el año 2014 se está realizando el panel molecular completo para LLA que incluyen los cinco genes de fusión que se describen en este trabajo académico.

III. RESULTADOS

En el presente estudio se recolectaron datos de 45 pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) cuyo enfoque diagnóstico se dio con ayuda de análisis de la morfología sanguínea, citoquímica, inmunofenotipo, estudios de diagnóstico citogenético y molecular, estos pacientes fueron atendidos en el año 2016. Los datos incluyen: características demográficas (edad y género), características hematológicas y características a nivel molecular como la presencia o ausencia de marcadores moleculares de LLA (genes de fusión: *BCR-ABL P210*, *BCR-ABL P190*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX* y *MLL-AF4*) detectados mediante PCR en tiempo real.

3.1. Características Demográficas

Con respecto al género, 23 (51,1%) pacientes fueron de género masculino y 22 (48,9%) fueron de género femenino (Tabla 1 y figura 2), frecuencias similares a las reportadas en otros países como por ejemplo Guatemala, en la cual se determinó que, del total de pacientes analizados, el 60% correspondía al sexo masculino (Granados & Alvarado, 2013).

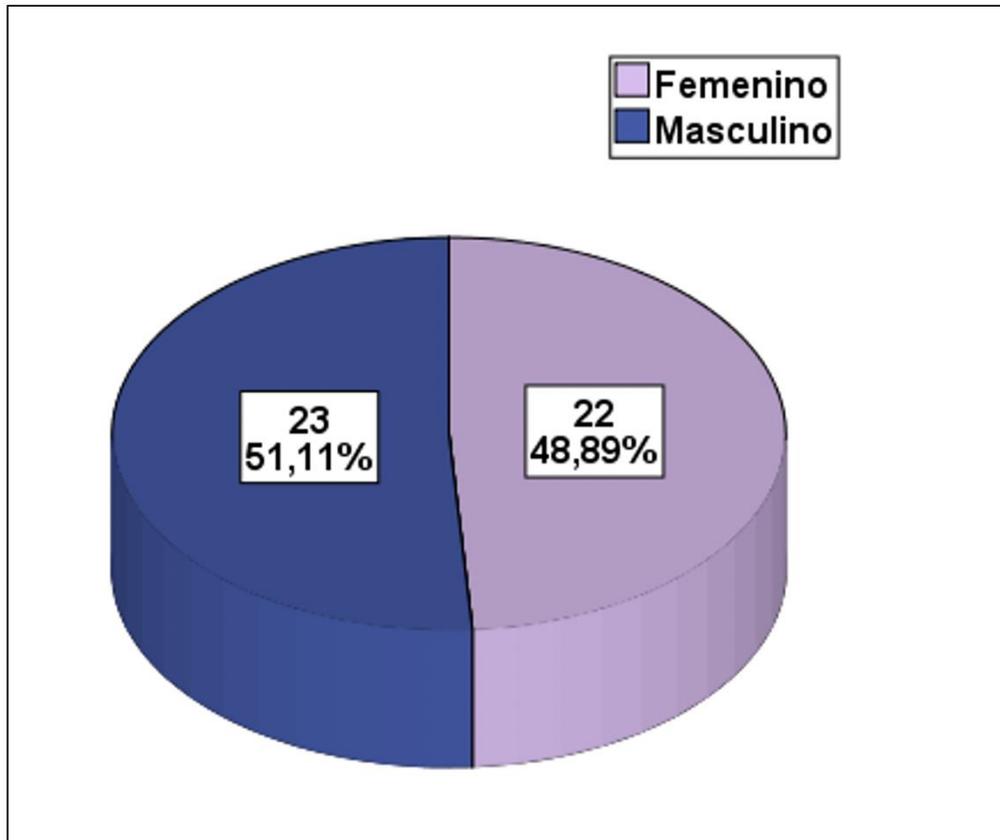
Tabla 1.

Pacientes evaluados según Género

	Género	Frecuencia	Porcentaje
Válido	Femenino	22	48,9
	Masculino	23	51,1
	Total	45	100

Figura 2

Pacientes evaluados según género.



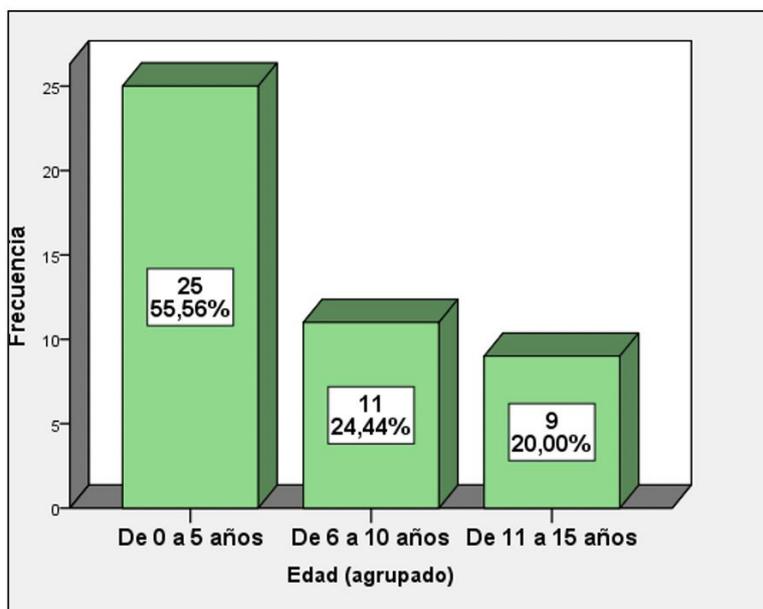
La edad de los pacientes tuvo un rango desde 6 meses hasta 15 años, la mediana de la edad de los pacientes fue de 5 años (tabla 2). Al estratificar la edad, el grupo de edad en que se observó la mayor cantidad de pacientes pediátricos con Leucemia Linfocítica aguda fue de 0 a 5 años (n=25, 55.6%, Tabla 3).

Tabla 2.*Estadígrafos de la edad de los pacientes*

Edad	Estadístico
Mediana	5
Mínimo	1
Máximo	15
Rango	14
Rango intercuartil	6
Asimetría	0,903
Curtosis	-0,363

Tabla 3.*Distribución de los pacientes según la edad*

Edad	Frecuencia	Porcentaje
De 0 a 5 años	25	55,6
De 6 a 10 años	11	24,4
De 11 a 15 años	9	20
Total	45	100

Figura 3.*Distribución de pacientes evaluados según edad.*

3.2. Característica Hematológicas e Inmunofenotipo

Con respecto a las características hematológicas de los pacientes, según la tabla 4, los blastos tuvieron una mediana de 42%, la mediana del número de leucocitos por uL de sangre periférica fue de 9375, la mediana de la hemoglobina fue 9.55 g/dL, tuvieron una mediana de hematocrito de 28.5% y una mediana de recuento plaquetario en sangre periférica de 48.5; asimismo estas variables no tuvieron una distribución normal ($p < 0.05$).

Tabla 4.

Estadígrafos de las características hematológicas de los pacientes

Características Hematológicas	Estadístico	Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)	
		Estadístico	Sig.
Blastos (%)	Mediana	42	0.846
	Mínimo	0	
	Máximo	100	
Leucocitos (por uL de sangre)	Mediana	9375	0.443
	Mínimo	1260	
	Máximo	564730	
Hb (g/dL)	Mediana	9,55	0.934
	Mínimo	3,3	
	Máximo	12,6	
Hto (%)	Mediana	28,5	0.924
	Mínimo	10,4	
	Máximo	36,2	
Plaquetas (K/uL)	Mediana	48,5	0.656
	Mínimo	3	
	Máximo	490	

En cuanto al inmunofenotipo de la Leucemia Linfocítica Aguda de células B de los pacientes participantes del estudio, según la tabla 5, se pudo determinar el estadio en 40 pacientes, de los cuales se encontró que la gran mayoría fueron del estadio común (n=37, 82.2%), seguido del estadio Pre-B (n=2, 4.4%) y sólo hubo un paciente (2.2%) con inmunofenotipo de la LLA en estadio Pro-B. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Alonso y colaboradores (2006) donde encontraron que el estadio B común fue el predominante (61.1%), seguido del Pre-b (32.8%), Pro-B (6.1%). Por otro lado, nuestros resultados contrastan con los obtenidos de Ivanov y colaboradores (2013) quienes hallaron en mayor porcentaje el estadio común (44.7%), seguido del Pre-B (40.9%) y por último el Pro-B (13.3%), sin embargo, es importante mencionar que en este estudio la población fue no sólo pediátrica sino también de adultos, razón por la que puede observarse algunas diferencias en los estadios de la LLA.

Tabla 5.

Distribución de los pacientes según inmunofenotipo

Inmunofenotipo	Frecuencia	Porcentaje
B común	37	82,2
Pre-B	2	4,4
Pro-B	1	2,2
No determinado	5	11,1
Total	45	100

3.3. Características Moleculares

Se analizaron un total de 45 pacientes pediátricos para detectar los cinco transcritos de los genes de fusión: *BCR-ABL p210*, *BCR-ABL p190*, *TEL-AML1*, *E2A-PBX* y *MLL-AF4*. De éstos, se observó que a 36 pacientes (80.0%) no se les detectó ningún gen de fusión, mientras que a 9 (20.0%) sí se le detectó alguno de estos cinco marcadores moleculares, (Tabla 4 y Figura 4). Estos datos corroboran los obtenidos en otros países, como el estudio de Alonso y colaboradores (2005) realizado en Argentina donde no se detectó ningún rearrreglo en el 71.3% de los pacientes estudiados.

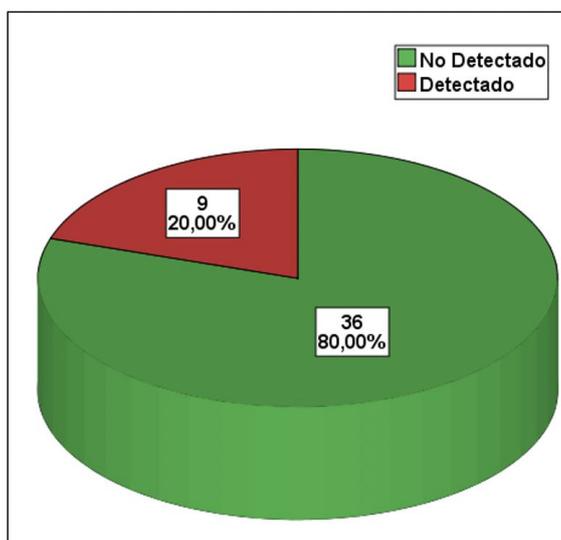
Tabla 4.

Pacientes según presencia de algún gen de fusión

Presencia de algún gen de fusión	Frecuencia	Porcentaje
No Detectado	36	80.0
Detectado	9	20.0
Total	45	100.0

Figura 4.

Presencia de genes de fusión en los pacientes estudiados.



Según la Tabla 5, la presencia del gen de fusión *TEL-AML1* fue el más frecuente (n=7, 15.6%), esto concuerda con resultados obtenidos en varios estudios, entre los que podemos citar al realizado por Alonso y colaboradores (2005) en Argentina, donde encontraron también a este gen de fusión como el más frecuente (11.6%). También otros resultados similares fueron obtenidos en un estudio realizado en Chile por Artigas y colaboradores (2006) en donde se encontró una frecuencia del 23% para la presencia de este gen de fusión y en el estudio realizado en nuestro país en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas por Mora y colaboradores (2011) quienes también encontraron al gen de fusión *TEL/AML1* como el más frecuente (17.4%), entre otros. Es importante indicar, que la presencia de este gen de fusión es de buen pronóstico para los pacientes.

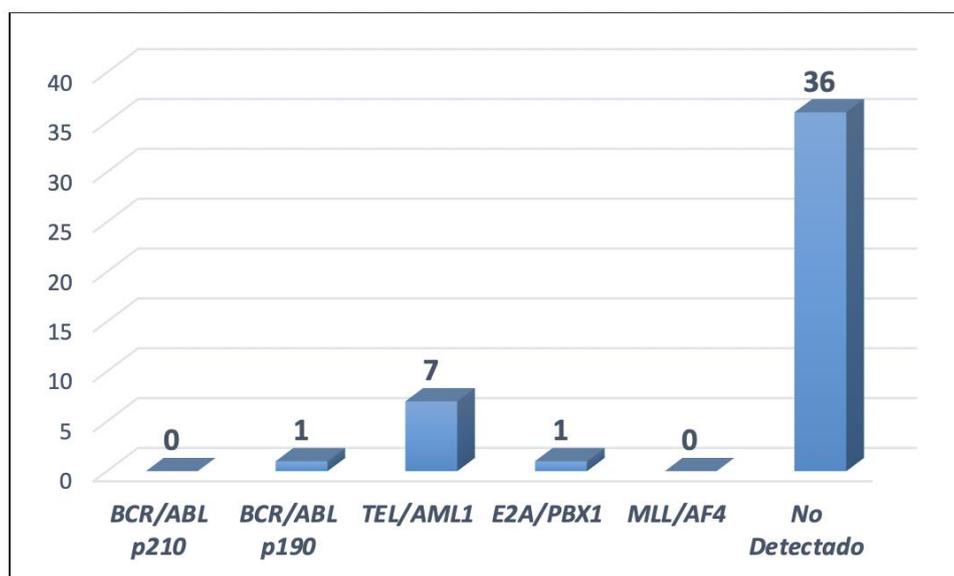
Tabla 5.

Pacientes evaluados según Gen de fusión

Gen de Fusión	Frecuencia	Porcentaje
<i>BCR/ABL p210</i>	0	0.0
<i>BCR/ABL p190</i>	1	2.2
<i>TEL/AML1</i>	7	15.6
<i>E2A/PBX1</i>	1	2.2
<i>MLL/AF4</i>	0	0.0
No Detectado	36	80.0
TOTAL	45	100.0

Figura 5.

Pacientes evaluados según gen de fusión.



El gen de fusión *BCR/ABL* fue detectado en sólo 1 paciente (2.2%), y correspondió a la variante p190, la variante p210 no fue detectado en ningún paciente (Figura 5); lo mismo ocurrió con el gen de fusión *MLL-AF4* que no fue detectado en ningún paciente (0%); estos resultados corroboran los resultados obtenidos por Guerra y col (2016), quienes, en una población pediátrica mexicana, donde no encontraron pacientes con presencia del gen *MLL-AF4*. Esto es importante para nuestro entorno, puesto que la presencia de estos genes de fusión es de mal pronóstico y tienen una frecuencia mundial del 2% aproximadamente.

Según la tabla 6 se observó que en los pacientes en los que no se detectó algún gen de fusión tuvieron un mayor porcentaje de blastos y una ligera menor cantidad de leucocitos en sangre periférica al compararlo con los pacientes en los que sí se les detectó algún gen de fusión; sin embargo, no existió una diferencia estadísticamente significativa (valor de “p” fue mayor a 0.05 en todos los casos) entre estos dos grupos para las características hematológicas, ni para la edad.

Tabla 6.

Características hematológicas y edad según presencia de algún gen de fusión

Características	Presencia de algún Gen de Fusión	Mediana	Mínimo	Máximo
Blastos (%)	No Detectado	42	0	100
	Detectado	30	0	92
Leucocitos (por uL de sangre)	No Detectado	9375	1260	564730
	Detectado	9620	2000	115940
Hb (g/dL)	No Detectado	9.45	3.30	12.60
	Detectado	9.95	7.40	12.30
Hto (%)	No Detectado	28.50	10.40	36.10
	Detectado	29.30	21.10	36.20
Plaquetas (K/uL)	No Detectado	47.50	3.00	490.00
	Detectado	49.00	9.00	136.00
Edad	No Detectado	6.0	1	15
	Detectado	3.5	1	15
Válidos	Total		45	

Tabla 7.

Estadísticos de prueba para Características hematológicas y edad según presencia de algún gen de fusión

	Blastos (%)	Leucocitos (por uL de sangre)	Hb (g/dL)	Hto (%)	Plaquetas (K/uL)	Edad
U de Mann-Whitney	117	149	132,5	141	157	105,5
Sig. asintótica (bilateral)	0,535	0,712	0,402	0,551	0,887	0,107

Según la tabla 8, el gen de fusión *BCR-ABL* p190 y *E2A-PBX* presentaron un mayor porcentaje en la cantidad de blastos (Figura 7) y leucocitos (Figura 8) en sangre periférica a diferencia de los otros genes de fusión o la no presencia de algún gen de fusión, sin embargo, no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$, Tabla 6), estos hallazgos corroboran con los encontrados por Alonso y colaboradores donde los pacientes con presencia de los genes de fusión *MLL-AF4*, *BCR-ABL* y *E2A-PBX* fueron los que tuvieron las mayores medianas en los recuentos leucocitarios al momento del diagnóstico (64700, 33100 y 25800, respectivamente); y, con los estudios de Artigas y colaboradores (2006) en Chile donde los pacientes con presencia del gen de fusión *BCR-ABL* tuvieron recuentos leucocitarios mayores que el resto (210 000/uL).

Tabla 8.

Características hematológicas y edad según Gen de Fusión

Característica		Gen de Fusión			
		<i>BCR-ABL</i> p190	<i>TEL-AML1</i>	<i>E2A-PBX</i>	No Detectado
Blastos (%)	Mediana	81	0	92	42
	(Min - Max)		(0 - 70)		(0 - 100)
Leucocitos (por uL de sangre)	Mediana	78310	6955	115940	9375
	(Min - Max)		(2000 - 13780)		(1260 - 564730)
Hb (g/dL)	Mediana	8.50	10.50	9.90	9.45
	(Min - Max)		(7.4 - 12.3)		(3.3 - 12.6)
Hto (%)	Mediana	26.80	29.50	30.70	28.50
	(Min - Max)		(21.1 - 36.2)		(10.4 - 36.1)
Plaquetas (K/uL)	Mediana	26.00	62.00	49.00	47.50
	(Min - Max)		(9 - 136)		(3 - 490)
Edad	Mediana	15	3.5	1	6
	(Min - Max)		(3 - 5)		(1 - 15)
Válidos	n	1	7	1	36

Figura 6.

Estadísticos de prueba para Características hematológicas y edad según Gen de Fusión

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Blastos (%) es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,150	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de Leucocitos (por uL de sangre) es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,108	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de Hb (g/dL) es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,603	Conserve la hipótesis nula.
4	La distribución de Hto (%) es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,747	Conserve la hipótesis nula.
5	La distribución de Plaquetas (K/uL) es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,681	Conserve la hipótesis nula.
6	La distribución de Edad es la misma entre las categorías de Gen de Fusión.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,047	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

De otro lado, los pacientes con presencia del gen de fusión TEL-AML1 tuvieron los recuentos leucocitarios más bajos (mediana=6955) y porcentajes de blastos en sangre periférica más bajos (mediana=0%) con respecto a la presencia de los otros genes (tabla 8). Sin embargo, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes según presencia o ausencia de este gen de fusión (figura 6).

Con respecto a la edad de los pacientes, los de mayor edad fueron los que tuvieron presencia del gen *BCR-ABL* (15 años, n=1), y los de menor edad fueron los que presentaron el gen de fusión *E2A-PBX* (1 año, n=1) y *TEL-AML1* (edad mediana=3.5). Estas diferencias entre grupos de edades sí fueron estadísticamente significativas ($p=0.047$, figura 6)

Figura 7.

Porcentaje de Blastos según Gen de Fusión

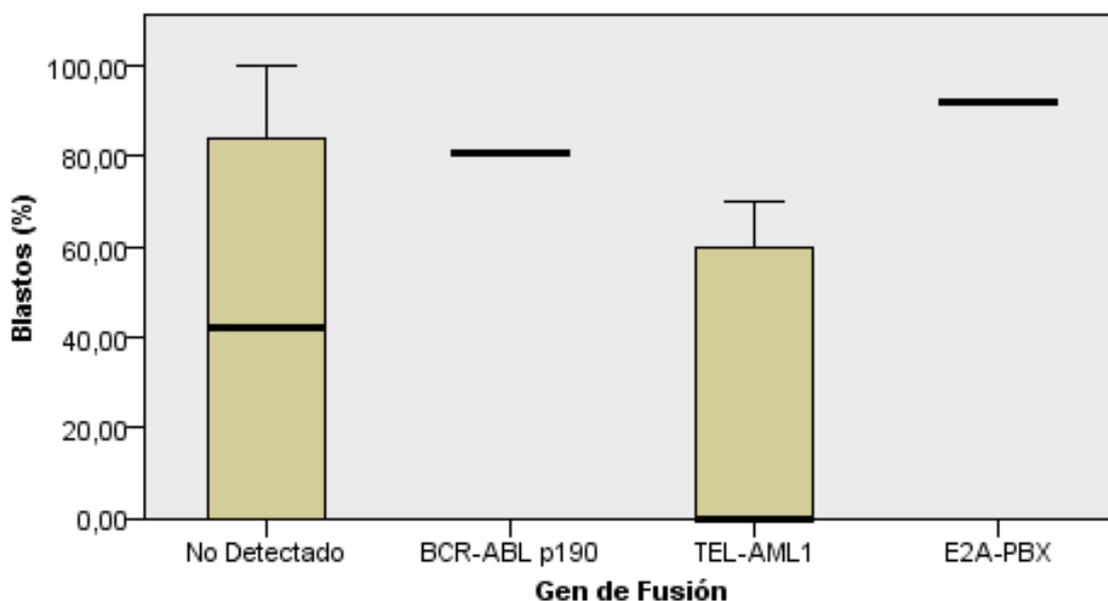
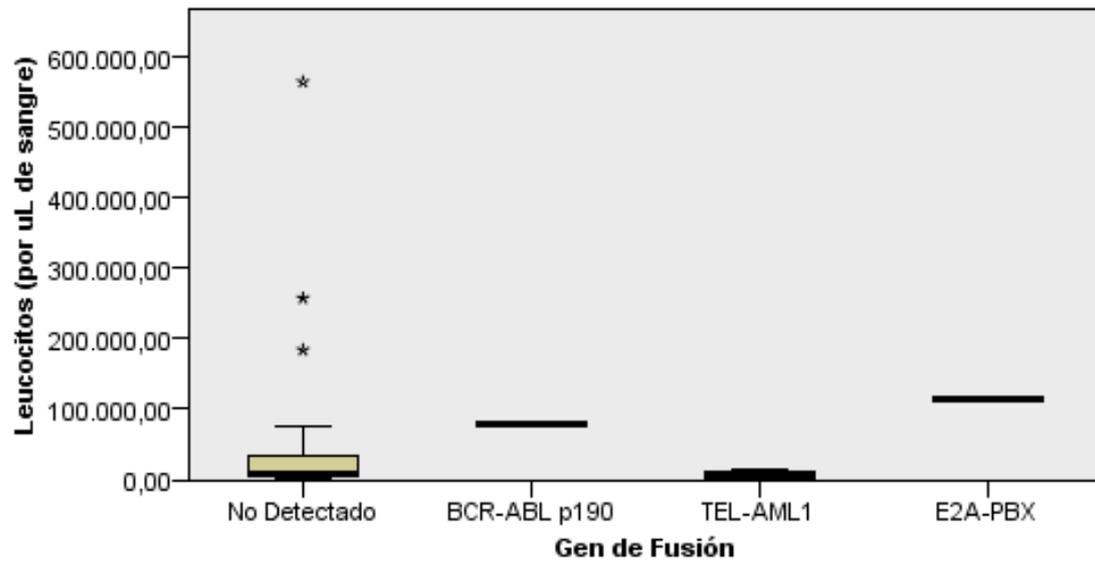


Figura 8.

Recuento de Leucocitos según Gen de Fusión



IV. CONCLUSIONES

De los 45 pacientes pediátricos del hospital Edgardo Rebagliati con LLA analizados, 9 pacientes presentaron algunos de los cinco genes de fusión analizados en este estudio, esto representó un 20.0%.

El gen de fusión más frecuente fue el TEL/AML1 con un 15.6%, que coincide con resultados encontrados en otros estudios tanto en nuestro país como en otros como Chile y Argentina.

En ningún paciente pediátrico con LLA se detectó el gen de fusión *BCR/ABL* variante p210, ni *MLL-AF4*.

V. RECOMENDACIONES

Para mejorar los resultados obtenidos, se recomienda el uso de calibradores para realizar una cuantificación absoluta de los genes de fusión, esto ayudaría al médico hematólogo tratante poder hacer el seguimiento como enfermedad mínima residual en el caso de aquellos pacientes que al debut se les detecta algún gen de fusión y poder evaluar el tratamiento que se le da.

Se recomienda implementar pruebas de secuenciamiento en plataformas *Next Generation* para las muestras de pacientes con leucemias y así poder encontrar otros genes de fusión también presentes en esta enfermedad y ampliar los estudios sobre la caracterización molecular de la enfermedad.

También se recomienda el uso de controles externos como UK-Neqas para el aseguramiento de la calidad de los procesos en el laboratorio. Esto en nuestro laboratorio ya se está haciendo desde el año 2016, pero no es para todos los genes de fusión, sólo es para el BCR-ABL. Se recomienda ampliar los controles externos para la detección de todos los genes de fusión que realizamos.

VI. REFERENCIAS

- ACS. (2016). *American Cancer Society*. Obtenido de <http://www.cancer.org/>
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2014). PCR en tiempo real. *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología*, 175-201.
- Ajuba, I., Madu, A., Okocha, C., Ibegbulam, O., Okpala, I., & Nna, E. (2016). Frequency and clinical impact of ETV6/RUNX1, AF4-MLL, and BCR/ABL fusion genes on features of acute lymphoblastic leukemia at presentation. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 237-241.
- Alonso, C., Gallego, M., Alfaro, E., Rossi, J., & Felice, M. (2006). Caracterización molecular en leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria. *Hematología*, 8-12.
- Artigas, C., Cabrera, M., Melo, A., Páez, E., Arriagada, M., Astete, C., Roa, J. (2006). Frecuencia de los genes de fusión TEL-AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista médica de Chile*, 1367-1376.
- Carranza, C. (2009). Detección por PCR-MULTIPLEX de los transcritos quiméricos BCR-ABL, E2A-PBX, MLL-AF4, ETV6-AML1; y su utilidad como factor pronóstico en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda. Guatemala.
- Granados, L., & Alvarado, E. (2013). Determinación de características clínicas, demográficas y moleculares de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda en Guatemala. Estudio retrospectivo. Guatemala.
- Guerra, F., Ramos, M., Rosel, C., Jiménez, E., & Bekker, V. (2016). Detección de translocaciones relevantes por PCR en pacientes pediátricos con Leucemia

- Linfoblástica Aguda. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, S302-S308.
- Ivanov, I., Grigore, G., Zlei, M., Jitaru, D., Dascalescu, A., Danaila, C., Carasevici, E. (2011). RT-PCR analysis of E2A-PBX1, TEL-AML1, BCR-ABL and MLL-AF4 fusion gene transcripts in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of genetics*, 21-26.
- Kadhom, A., Abdul-Majeed, B., AL-Hadad, S., & Day, P. (2015). Expression of TEL-AML1 and E2A-PBX1 by real-time PCR in pediatric ALL in Baghdad. *International Journal of Advanced Research*, 820-826.
- LLS, S. L. (2014). *Leucemia Linfoblástica Aguda*. New York: Amgen.
- Magalhaes, I., Pombo de Oliveira, M., Bennett, C., Cordoba, J., Dobbin, J., Ford, A., & Greaves, M. (2000). TEL-AML1 fusion gene frequency in paediatric acute lymphoblastic leukaemia in Brazil. *British Journal of Haematology*, 204-207.
- Mora, P., Dongo, K., Cruz, M., Mejía, R., Arias, A., & Sulcahuaman, Y. (2011). Genes de fusión en Leucemia Linfática Aguda. *Acta Cancerológica*, 46-47.
- NIH, I. N. (2016). Diccionario de cáncer. EE.UU.
- Oliva, R. (2004). *Genética médica*. Barcelona: Edicions Universitat.
- OMS. (2019). *who.int*. Recuperado el 30 de setiembre de 2019, de https://www.who.int/cancer/media/news/Childhood_cancer_day/es/
- Ortega, M., Osnaya, M., & Rosas, J. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de Mexico*, 26-33.
- Pakakasama, S., Kajanachumpol, S., Kanjanapongkul, S., Sirachainan, N., Meekaewkunchorn, A., Ningsanond, V., & Hongeng, S. (2008). Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion transcripts in childhood acute leukemia. *International journal of laboratory hematology*, 286-291.

Rodríguez, M., y Rodríguez, W. (2006). PCR en tiempo real. *Métodos físico-químicos en Biotecnología*, 1-55.

SAH, S. A. (2012). *Leucemia Linfoblástica Aguda*. Buenos Aires.

Sociedad Argentina de Hematología, S. (2012). *Leucemia Linfoblástica Aguda*. Buenos Aires.

Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1-13.