



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**Detección de Biomarcadores relevantes en niños
con Leucemia Linfoblástica Aguda**

QUE PRESENTA EL ALUMNO

José Ricardo Acosta Vázquez

Matricula: 2172030823

Asesor interno

Dra. Yolanda Margarita Sánchez Castilleja, Departamento de Producción Agrícola
y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Asesor Externo

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez, Unidad de Investigación biomédica CMN "la Raza"

Ciudad de México

Fecha 11/10/2022

RESUMEN

Para este reporte de investigación se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de adentrarse en el tema de interés, así como una inducción al laboratorio. Para la detección de biomarcadores de los reordenamientos genéticos se colectaron muestras de médula ósea de pacientes pediátricos que cumplieran con el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA), proporcionados por el servicio de Hematología Pediátrica (noveno piso) y Oncoferesis (planta baja), del Hospital General “Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”. Dichas muestras se registraron en una bitácora de acuerdo con el folio, el nombre del paciente, la clave de la unidad y la fecha. A continuación, las muestras se sometieron a un gradiente de centrifugación utilizando Ficoll Lymphoprep, para la separación de células mononucleares (botón). Posteriormente se extrajo el ARN de las muestras mediante el Kit Relia prep Viral TNA, miniprep, custom. Finalmente, se realizó una prueba de PCR-punto final y PCR-tiempo real. Los productos obtenidos de la PCR-punto final se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador ChemiDoc XRS+ System y en el software Image Lab. Para la PCR-tiempo real se utilizó el software StepOne and StepOneplus Real-Time PCR System v2.3. Las muestras positivas se repitieron para corroborar resultados.

Palabras clave: Leucemia, pediátricos, PCR, neoplasias.

Contenido

MARCO INSTITUCIONAL.....	4
INTRODUCCIÓN	5
1.ANTECEDENTES.....	5
2.UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....	6
3.OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO	6
4. ESPECIFICACIÓN Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS DE ACUERDO CON EL CALENDARIO PROPUESTO	7
4.1 Revisión del reglamento de la Unidad de Investigación. Procedimiento para medidas de bioseguridad en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología CMN “La Raza”.....	7
4.2 Revisión del libro: Detección de las translocaciones cromosómicas más comunes en Leucemia Pediátrica en México: Una actualización.	7
4.3 Revisión bibliográfica de antecedentes y fundamentos teórico-prácticos en el estudio de la LLA.....	8
4.4 Inducción al laboratorio (Uso adecuado de la micropipeta, uso de equipo de laboratorio, manejo de los reactivos.	8
4.5 Reclutamiento de muestras médula ósea.....	10
4.6 Separación de células mononucleares mediante Ficoll Lymphoprep.....	10
4.7 Extracción ARN, mediante el Kit Relia prep viral TNA, miniprep, custom.....	11
4.8 Retrotranscripción y eliminación de ADN genómico (cDNA).	13
4.9 Preparación de β -actina (Control positivo para PCR).	14
4.10 Preparación de geles de agarosa con bromuro de etidio.....	15
4.11 Electroforesis.....	15
4.12 PCR-Punto Final	16
4.13 PCR-Tiempo Real	18
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.CONCLUSIÓN	20
7.IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL.....	20
8.APRENDIZAJE Y HABILIDADES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DEL SERVICIO SOCIAL.	20
9.FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL.....	21
10.REFERENCIAS	22

MARCO INSTITUCIONAL

El Instituto Mexicano del Seguro Social, es una institución con gran presencia en la atención a la salud y en la protección social de los mexicanos. Para ello, combina la investigación y la práctica médica, para brindar tranquilidad y estabilidad a la población. La investigación en salud en el Instituto Mexicano del Seguro Social comenzó de forma natural como actividad simultánea al quehacer asistencial del personal médico. La inquietud natural de los médicos de unidades como el Hospital General La Raza despertó una corriente de interés por analizar las observaciones clínicas. En un ambiente favorable para la investigación, surgió también un grupo de investigadores en disciplinas básicas. Existen 44 unidades de investigación en el IMSS en toda la república, concentrándose en el siglo XXI, 20 de estas.

La Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología tiene como objetivo el estudio de las causas de la leucemia, junto a otros grupos de investigación, donde se han desarrollado redes y conexiones importantes en el país. Además, posee un interés en otras líneas de investigación, así como en la incursión de áreas relevantes como la diabetes, VIH y resistencias generadas por antirretrovirales utilizando tecnología de punta como la secuenciación masiva. También cuenta con líneas de investigación que abordan la posibilidad de la utilización de vectores que atraviesan barrera hematoencefálica que acarrean TPH2 a células serotoninérgicas. En definitiva, la Unidad de Investigación busca ser una unidad de vanguardia, siempre alerta a las diferentes necesidades del derechohabiente.

Las investigaciones que se realizan en el Instituto son equivalentes a las que desarrolla la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, ya que mediante la identificación y estudio de problemas relacionados con los procesos celulares fundamentales se puede desarrollar una crítica más amplia de interdisciplinariedad para enfatizar el proceso salud-enfermedad dentro del contexto social vigente.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias son un grupo de trastornos neoplásicos hematológicos caracterizados por un crecimiento autónomo y desmedido de formas inmaduras de leucocitos (blastos) provenientes de una clona maligna que tiene origen primario en la médula ósea. Las leucemias comprenden un grupo heterogéneo de trastornos que resultan de un proceso de múltiples pasos a través de la interacción de varias alteraciones genéticas adquiridas en una población específica de células hematopoyéticas madre/progenitoras. Las leucemias se clasifican en aguda y crónica y en función de su origen celular se subdividen en linfoides y mieloides (Mejía-Aranguré *et al.*, 2016).

En todo el mundo, entre los tipos de cáncer infantil, la leucemia es común en la mayoría de las poblaciones y corresponde al 25-35 % de los casos (Ries *et al.*, 2008). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la infancia, constituyendo el 80 % de todas las leucemias agudas de la edad pediátrica. La LLA predomina ligeramente en los varones, sobre todo en la edad puberal. Las diferencias geográficas son notables en esta enfermedad: mientras que, en los países menos desarrollados, como Norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las LLA de estirpe T, en los países industrializados, la LLA de estirpe B es con diferencia la más frecuente de las hemopatías malignas. Este hecho se ha relacionado con la mayor facilidad para la exposición a determinados agentes medioambientales “leucemógenos” en los países industrializados.

En la población de la Ciudad de México se ha informado que en niños la tasa de incidencia ajustada por edad (AAIR por las siglas en inglés de age-adjusted incidence rate) para LLA es sorprendentemente alta entre 49.5 y 57.6 casos por millón de habitantes (Mejía-Aranguré *et al.*, 2016; Pérez-Saldivar *et al.*, 2011) en comparación con otros países de Latinoamérica, además que esta incidencia parece estar aumentando. Existen diferentes factores que pueden llegar a condicionar la enfermedad, tal es el caso de las translocaciones cromosómicas. Por lo que el estudio de dichas alteraciones permite la identificación de los genes que forman parte en la génesis de las leucemias.

1. ANTECEDENTES

México tiene una de las incidencias más altas de leucemia infantil a nivel mundial y tasas de mortalidad significativamente más altas por esta enfermedad en comparación con otros países. Los factores relacionados para estos dos problemas en México no se entienden completamente. Sin embargo, se ha sugerido que un factor podría ser la alta prevalencia de reordenamientos genéticos asociados con la etiología o con un mal pronóstico de LLA-infantil (Bekker-Méndez *et al.*, 2014).

Desafortunadamente en México la detección de reordenamientos genéticos no se realiza de manera rutinaria. Por lo que el diagnóstico y la elección de un tratamiento quimioterápico se basan en características clínicas, pruebas de laboratorio y el

inmunofenotipo. En la Ciudad de México, se han realizado estudios que han reportado la frecuencia de los reordenamientos genéticos en pacientes pediátricos con LLA. Estos estudios han sido en hospitales basados en un pequeño número de pacientes. (Bekker-Méndez *et al.*, 2014).

Pérez-Vera *et al* (2008) En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría, con un total de 57 pacientes, reportaron baja frecuencia del reordenamiento del gen ETV6-RUNX1. Ese mismo año Jiménez-Morales *et al*, informaron una alta proporción de casos de TCF3-PX1 en 53 pacientes con LLA. Posteriormente Cravioto *et al* (2009), en uno de los hospitales del seguro social, con 26 pacientes reportaron una alta frecuencia de MLL-AF4. Bekker-Méndez *et al* (2014), realizaron un estudio en ocho hospitales diferentes para determinar la prevalencia de los cuatro reordenamientos genéticos más comunes ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1 Y MLL, a través de PCR-punto final. En este estudio se reportó una prevalencia particularmente alta del reordenamiento TCF3-PBX1 y una baja prevalencia del gen ETV6-RUNX1. Guerra-Castillo *et al* (2016), en un estudio que realizaron con 91 muestras del Hospital La Raza, reportaron una baja prevalencia de ETV6-RUNX1 y una alta prevalencia de TCF3-PBX1. Finalmente, Mata-Rocha *et al* (2022) corroboraron los datos reportados en 2014, y 2016 con 247 muestras disponibles, provenientes de ocho hospitales diferentes, principalmente del Hospital La Raza. Actualmente bajo el cargo de la Dra. Vilma Carolina Bekker en La Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología se realizan pruebas para la detección de estas translocaciones en pacientes pediátricos con LLA.

2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Geográficamente la Unidad de investigación biomédica CMN “La Raza, se encuentra situada en la Ciudad de México, Calzada Vallejo y Paseo de las Jacarandas S/N, colonia la Raza, alcaldía Azcapotzalco, C.P.02990. Ubicada entre los paralelos 19°27'56"N y los meridianos 99 °08'41"O.

3. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

- Estandarizar técnica de PCR en tiempo real para cada una de las translocaciones
- TEL/AML1;
- BCR/ABL MAYOR Y BCR/ABL MENOR;
- E2A-PBX1;
- MLL-AF4;
- FLT3;
- P2Ry8-CRL2
- IGH-CRFL2

4. ESPECIFICACIÓN Y FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS DE ACUERDO CON EL CALENDARIO PROPUESTO

4.1 Revisión del reglamento de la Unidad de Investigación. Procedimiento para medidas de bioseguridad en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología CMN “La Raza”.

Al inicio del servicio social, la primera actividad realizada consistió en leer un manual que dicta las normas, reglas y parámetros que rigen en La Unidad de Investigación Médica de Inmunología e Infectología (UIMII), con el propósito de reducir los niveles de riesgos biológicos, siendo uno de los requisitos fundamentales para el manejo apropiado de muestras dentro y fuera del laboratorio, donde se debe seguir de manera adecuada los procedimientos administrativos que establecen las especificaciones para la organización y funcionamiento del mismo, así como la prevención y control de infecciones que se trabajen dentro de este. Al conocer dichos parámetros se cumple con el objetivo de contribuir de forma responsable al tratamiento y seguimiento de muestras de pacientes, a través de un análisis que se ajusta a los estándares de calidad, utilizando los conocimientos, procedimientos e instrumentación actualizados. Cumpliendo con las disposiciones legales vigentes (Nom-007-SSA3-2011, NOM-010-SSA2-2010, NOM 017-STPS-2008, Nom-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

En caso de que ocurriera algún accidente dentro de las instalaciones se debe hacer una evaluación de riesgo, realizada por quienes mejor conozcan las características de los organismos involucrados, el tipo de muestras, equipo y los procedimientos a realizar (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015)

4.2 Revisión del libro: Detección de las translocaciones cromosómicas más comunes en Leucemia Pediátrica en México: Una actualización.

De la misma manera durante las primeras semanas dentro de La Unidad de Investigación se me otorgó un libro, con el propósito de introducirme en el aspecto teórico- práctico en las actividades que realice, mismo que en resumen trata de las translocaciones cromosómicas más comunes en leucemia pediátrica en México. Donde se destaca lo siguiente:

Las translocaciones cromosómicas son alteraciones recíprocas en las cuales un fragmento de un cromosoma se intercambia con el fragmento de otro durante la mitosis, dando lugar a un gen híbrido. Hoy en día se ha podido presentar evidencia de que las translocaciones cromosómicas son a menudo los eventos iniciales en el desarrollo de la leucemia. Particularmente en pacientes mexicanos las translocaciones más frecuentes asociadas a leucemia pediátrica (Principalmente LLA) son: BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL-AF4. No obstante, estas translocaciones se presentan únicamente en cerca del 20% de los casos de leucemia pediátrica. Por lo que es muy importante considerar que, aunque no esté presente alguna de las translocaciones en el diagnóstico molecular, el diagnóstico clínico de leucemia pediátrica puede seguir siendo totalmente válido.

La anomalía genética más frecuente mundialmente en leucemia pediátrica es la fusión de los genes TEL Y AML1. Desafortunadamente, aunque TEL-AML1 t (12,21) (p13, q22) es la translocación con el mejor pronóstico en México, su prevalencia es muy baja. Por el contrario, la translocación E2A-PBX1 es la que posee una prevalencia mayor y un peor pronóstico (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

4.3 Revisión bibliográfica de antecedentes y fundamentos teórico-prácticos en el estudio de la LLA

Se realizó una revisión bibliográfica, recopilando información relevante acerca de las leucemias que afectan a la población infantil en México (principalmente de la LLA), con la finalidad de tener una aproximación adecuada al tema de estudio y un mejor entendimiento de las actividades realizadas en el servicio social. Para ello se consultaron artículos científicos, de estudios realizados en México y en otros países, en los que se revisó la introducción, las problemáticas, los resultados, la discusión y las conclusiones.

De esta revisión se puede inferir que, en México, las leucemias son el tipo de cáncer más frecuente en pacientes menores de 15 años, siendo la LLA la más común en niños y adolescentes, con una tasa de incidencia muy alta si se compara con otros países desarrollados. Las alteraciones moleculares que se pueden llegar a presentar en las leucemias son causadas por diversas anomalías genéticas, tal es el caso de las translocaciones.

Para esto último también se consultaron las técnicas y protocolos que se realizan para la detección de estas mutaciones, como lo son las pruebas de PCR-punto final y la PCR-tiempo real.

4.4 Inducción al laboratorio (Uso adecuado de la micropipeta, uso de equipo de laboratorio, manejo de los reactivos).

Dentro del laboratorio de la Unidad de Investigación se realizan diferentes pruebas en las que se utilizan una gran variedad de equipos y de instrumental. Con la finalidad de obtener un resultado óptimo es necesario asegurarse de que todo esté bajo control y en buenas condiciones.

Uso de la micropipeta.

Una de las técnicas que se practica día con día en el laboratorio de infectología son las pruebas de PCR-punto final y tiempo real en las que se requieren volúmenes muy pequeños y exactos para que la reacción pueda funcionar. Para ello es necesario una buena técnica de pipeteo y mucha concentración.

Instrucciones para un buen pipeteo:

Se debe colocar el pulgar sobre el émbolo de pipeteado, presionando hasta el primer tope asegurándose de colocar la punta dentro del líquido hasta una profundidad de 2 a 3 mm de una manera lenta y controlada, hasta disminuir la presión del émbolo para

permitir que se deslice hacia arriba sin soltar el émbolo abruptamente ya que eso podría generar que el líquido salpique dentro de la punta obteniendo volúmenes inexactos y una posible contaminación de la pipeta. Finalmente se lleva la micropipeta al envase al que se añade el líquido, apoyando la punta en la pared del recipiente, oprimiendo el émbolo hasta el primer tope y luego hasta el segundo con una velocidad moderada, siempre en un ángulo de 90° (Contreras, 2018).

Centrifugadora.

Para las pruebas que necesitan de centrifugación (Separación de células mononucleares, extracción de RNA, etc.) es muy importante cargar la centrifuga de una forma adecuada para el funcionamiento y preservación de esta. Ya que un procedimiento incorrecto de cargado ocasiona que la centrifuga vibre durante el proceso de centrifugación, lo que genera que el rotor sufra daños. Un procedimiento adecuado implica colocar las muestras de forma balanceada (Contreras, 2018).

Para esto es necesario cumplir con los siguientes requisitos:

- A) Colocar las muestras con volúmenes iguales de tal manera que queden balanceadas dentro de la centrifuga, en caso de tener un número impar se tiene que buscar otra muestra con el mismo volumen. (Se debe utilizar la balanza para estar seguro).
- B) Además de tener el mismo volumen, se debe tener el mismo centro de gravedad, es decir que no se deben colocar tubos y recipientes como pares contrapuestos, que tengan diferente forma, tamaño, espesor, etc.
- C) Se debe utilizar la centrifuga colocando todos los accesorios en el rotor, ya que estos equipos son diseñados para trabajar con ellos. Las piezas no originales pueden producir un desbalance y acortamiento de la vida útil del equipo.
- D) Una vez que se termine de ocupar la centrifuga, esta se debe dejar abierta por unos minutos y posteriormente se debe limpiar con un papel o pañuelo y apagar el equipo.

Reactivos.

Para el caso de los reactivos, se deben almacenar a una temperatura adecuada (dependiendo el caso) que les permita mantener sus propiedades y así evitar resultados inexactos. Dentro del laboratorio se debe disponer de la información necesaria para el uso correcto de estos. Cada uno de ellos se debe manipular con guantes y de manera cuidadosa evitando contaminación. (Se recomienda hacer alícuotas) (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Campana.

Para el uso de la campana, se deben usar guantes y limpiar en una sola dirección utilizando gasas y etanol al 70 % de adentro hacia afuera, el material se debe limpiar con alcohol antes de introducirlo a la campana, finalmente se deja con la luz ultravioleta durante 10 minutos aproximadamente (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

4.5 Reclutamiento de muestras médula ósea

Se colectaron muestras de médula ósea de pacientes pediátricos que cumplían con el diagnóstico de LLA proporcionadas por el Servicio de Hematología Pediátrica (novenio piso) y Oncoferesis (planta baja), del Hospital General del Centro Médico Nacional “La Raza”. Dichas muestras se registraron en la bitácora de leucemias de acuerdo con el nombre del paciente, el número de afiliación, el folio, la fecha, el nombre del doctor que tomo la muestra, y la edad del paciente. Una vez hecho el registro, las muestras se procesaron.

4.6 Separación de células mononucleares mediante Ficoll Lymphoprep

La sangre humana, está compuesta por partes iguales de plasma y células sanguíneas. Estos incluyen eritrocitos (glóbulos rojos), leucocitos (glóbulos blancos) y trombocitos (plaquetas). Los leucocitos están divididos en diferentes tipos de células, estos incluyen linfocitos y monocitos, que en cooperación con otras células forman la base del sistema inmunitario innato, y a los que nos referimos como células mononucleares de sangre periférica, debido a su único núcleo. El término linfocito engloba dos categorías muy importantes, linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos B son responsables de la producción de anticuerpos, mientras que los linfocitos T producen moléculas de señalización que conducen a la eliminación de células enfermas o células extrañas. Las células mononucleares se pueden separar de otros componentes de la sangre, tales como los eritrocitos y granulocitos mediante un gradiente de centrifugación de densidad usando Ficoll. Debido a que los eritrocitos tienen una proteína llamada “Hemoglobina” son más pesados y densos, por lo tanto, pasarán por la capa de Ficoll, así como los granulocitos y células muertas, mientras que los linfocitos y monocitos al tener una menor densidad y no poseer hemoglobina se acumularán en la barrera gradiente de plasma (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Metodología:

Las muestras obtenidas del Servicio de Hematología Pediátrica se sometieron a un gradiente de centrifugación utilizando Ficoll Lymphoprep, para la separación de células mononucleares (botón).

Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C a 3,500 revoluciones por minuto (rpm) antes de separar el plasma. Una vez que la centrifugación terminó, el plasma (tapa morada, con anticoagulantes) se transfirió a una alícuota (Tubo Eppendorf) de 1.5 mL, este se rotuló con el folio de la unidad, el número de muestra y la fecha.

En un tubo Falcon (rotulado con el número de muestra) se vertió un volumen equivalente (de la muestra original) de Ficoll Lymphoprep. Posteriormente a la muestra se le agregó un volumen equivalente de Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7.4 y se mezcló por inversión. Después se agregó la muestra al tubo Falcon con Ficoll,

en la pared, cuidando de no mezclar. La muestra se centrifugó durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C a 3,500 rpm. Una vez terminada la centrifugación, quedaron tres capas; la primera (restos de plasma) se extrajo y se desechó en un frasco con cloro y agua, la segunda capa (el anillo celular, leucocitos) se extrajo haciendo movimientos circulares y se transfirió a un segundo tubo Falcon, la última capa (eritrocitos) se desechó.

Al segundo tubo Falcon, se le añadió 2 volúmenes equivalentes de PBS y se centrifugó a 3,500 rpm, durante 5 minutos para la obtención del primer botón. Al finalizar ésta, se decantó el líquido del tubo en el vaso de cloro en dirección opuesta al botón (De esta manera se evitó arrastrar el contenido). Posteriormente se añadió 1 mL de PBS y se homogenizo hasta disolver completamente el botón mediante vortex. La solución se transfirió a dos alícuotas y se rotuló con el mismo formato que se utilizó para el plasma. Se realizó nuevamente una centrifugación a 3,500 rpm durante 5 minutos, una vez terminada la centrifugación se decantó el líquido al vaso de cloro en dirección opuesta al botón sin agitar. Finalmente, se registró en la bitácora de control el número de alícuotas de plasma y botones obtenidos. Se almacenó a -70 °C para posteriormente extraer el ARN

4.7 Extracción ARN, mediante el Kit Relia prep viral TNA, miniprep, custom

La extracción de ácido ribonucleico (ARN) es una práctica indispensable en los laboratorios de biología molecular, teniendo en cuenta que múltiples entidades hematológicas requieren, como parte de su diagnóstico, un estudio molecular al inicio de la enfermedad y posteriormente, para evaluar su evolución y respuesta al tratamiento.

El aislamiento de ARN intacto en primera instancia requiere de una disrupción de células o tejido, seguido de una inactivación de la ribonucleasa endógena (RNasa), una desnaturalización de complejos nucleoproteicos, y finalmente la eliminación de ADN y proteínas contaminantes. El paso más importante es la inactivación inmediata de las RNasas endógenas que se liberan de los orgánulos unidos a la membrana cuando se alteran las células.

Existen muchos métodos de purificación de ARN disponibles. Dentro de La Unidad de Investigación se utiliza el Kit Relia prep viral TNA, miniprep, custom y en algunas ocasiones se utiliza trizol. Sin importar cual sea el método es fundamental mantener la integridad del ARN debido a que este es notoriamente susceptible a la degradación. La pureza y la integridad del ARN extraído son fundamentales para su uso eficaz en aplicación de la PCR-tiempo real (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Para la extracción de ARN se utilizó el Kit Relia prep viral TNA, miniprep, custom. A continuación, los pasos a seguir:

Se agregó al botón (obtenido del paso anterior) 20 µL de proteinasa K, seguido de 200 µL de Buffer de lisis. Se vortexio durante 10 segundos y se procedido a incubar a 56°C por 10 minutos. Una vez pasados los 10 minutos se añadió a las muestras 250 µL de isopropanol y se vortexio nuevamente durante 10 segundos. Después se transfirió el contenido a una columna (500 µL aproximadamente) y se centrifugo a

máxima velocidad 10,000 rpm. A continuación, se procedió a pasar la columna a un tubo limpio y se le añadió 500 μL de solución de lavado, y se centrifugo a máxima velocidad (El lavado se repitió tres veces). Posteriormente se colocó 60 μL de agua libre de RNasa cerca del filtro de la columna sin romperlo y se dejó reposar durante un minuto. Finalmente se centrifugo nuevamente a máxima velocidad durante 3 minutos, se retiró la columna y se cuantifico en el Nanodrop. (En caso de no usar el ARN en ese momento se debe resguardar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Cuantificación de ARN en Nanodrop 2000.

Para la cuantificación del ARN extraído se utilizó el programa Nanodrop 2000, para ello se utilizó agua estéril (2 μL) “blanco” para la calibración. Después se limpió el lente utilizando toallas Kimwipes (Toallas especiales para la limpieza de equipos sensibles), se procedió a colocar la muestra y se ajustó el programa en ácidos nucleicos, tipo ARN. Finalmente se cuantifico la concentración, la pureza y la absorbancia.

Obtención de ARN mediante trizol (ARN total)

El otro método que se utilizó para la extracción del ARN fue el de Trizol con la finalidad de tener un mayor aprendizaje en la extracción de ácidos nucleicos. Las muestras (botones) se atemperaron y homogenizaron para un mejor manejo, luego se les agregó 900 μL de trizol y se homogenizaron por pipeteo hasta deshacer la mayor cantidad de residuos blancos. (Pasar el botón por la punta de la pipeta). Posteriormente se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos (Pasar por micro centrifuga, para bajar el trizol de la tapa). Luego se les agregó 200 μL de cloroformo y se pasaron por vortex hasta que se homogenizaron adoptando un color rosa-blanquecino sin formar fases. Se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez terminada la centrifuga se procedió a tomar 400 μL de la fase acuosa (fase superior) y se pasó a un tubo Eppendorf limpio, a continuación, se agregó a la fase acuosa 500 μL de alcohol isopropílico y se incubo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24hr. Para la fase dos, las muestras se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se observó que los botones fueran parecidos a un gel casi imperceptible y se descartó el sobrenadante cuidando de no tirar el botón. Luego se lavaron los botones con etanol (1 μL) al 75 %, y se llevaron a vortex. Posteriormente se centrifugaron a 7,500 rpm por 5 minutos, una vez finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se secaron los botones con la tapa abierta favoreciendo la evaporación del etanol, sin secarlos completamente. Finalmente se agregó 30 μL de agua destilada libre de RNasas, y se mezcló tallando las paredes hasta homogenizar la solución (El agua debe estar a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las muestras se incubaron a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos y se resguardaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cuantificación del ARN se realizó de la misma manera a través del Nanodrop 2000.

4.8 Retrotranscripción y eliminación de ADN genómico (cDNA).

El dogma central de la biología molecular establece que la información fluye desde el ADN al ARNm y de ahí a la proteína. El flujo de información desde ADN a ARN constituye lo que se denomina expresión génica. Los cambios de expresión génica en la célula se dan constantemente y son un mecanismo fino de regulación en muchos procesos que se producen como respuesta a cambios en el ambiente o a cambios internos. No solo el ADN, sino también el ARN puede ser portador de información genética, es decir, el propio ARN puede actuar como plantilla para ser copiada y generar nuevas moléculas de ácidos nucleicos. El paso de información de ARN a ADN puede ser posible gracias a la acción de una enzima particular denominada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La principal función de esta enzima es sintetizar ADN (a la que se le denomina DNA complementario (cDNA)), a partir de ARN. Este proceso se conoce como retrotranscripción (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

La retrotranscripción es un proceso por el cual una hebra de ARN, se retrotranscribe a una cadena complementaria (cDNA). Para ello se necesita una enzima retro transcriptasa, dNTPs Buffer, Primeres, un oligonucleótido complementario a la secuencia de ARN, que se une a esta molécula y que sirve para que la enzima empiece su acción retrotranscriptora. Una vez obtenido el cDNA, se amplifica el gen objetivo mediante una PCR (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Frecuentemente, durante el proceso de extracción de ARN, también se extrae ADN genómico (gDNA). Esto supone un problema, porque el gDNA es susceptible a amplificarse durante la PCR posterior, pudiendo falsear así los resultados. Por eso, es necesario llevar a cabo la eliminación de gDNA.

Para el proceso de retrotranscripción se realizó la siguiente metodología:

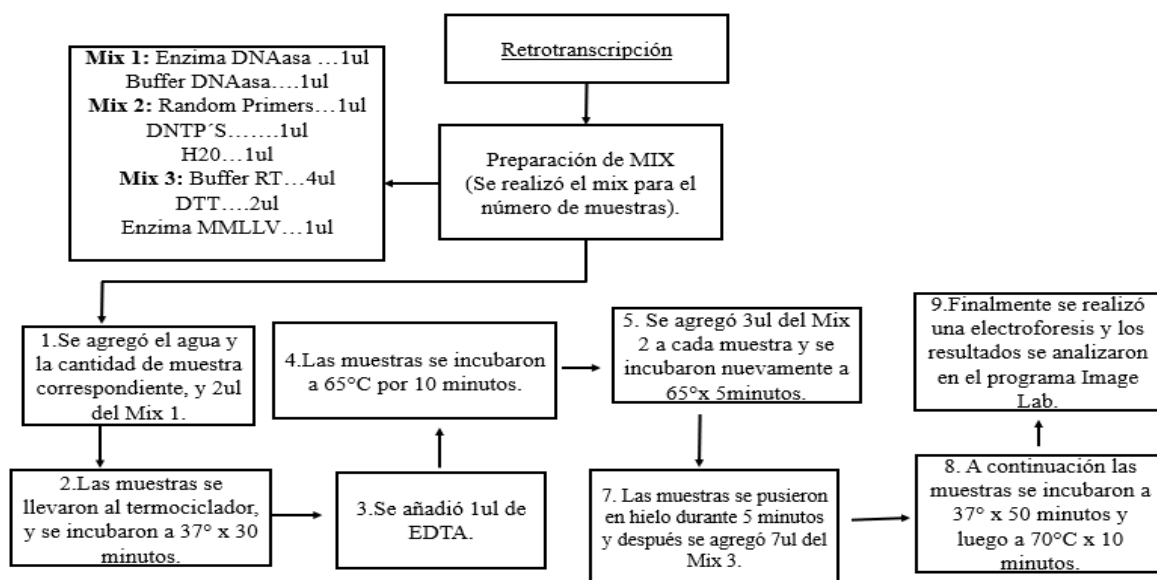


Figura 1. Procedimiento para la realización de la retro transcripción. Elaboración propia

4.9 Preparación de β -actina (Control positivo para PCR).

Antes de realizar la PCR de cDNA de la muestra, debe realizarse una prueba de viabilidad e integridad. Existe una gran variedad de éstas, pero las más populares son las que involucran a la subunidad pequeña del ribosoma (18s) y la de β -actina.

La β -actina es una de las dos actinas del citoesqueleto celular. Las actinas son proteínas altamente conservadas debido a su papel en la estructura, integridad y motilidad de la célula. Dado que su expresión es relativamente baja pero constante, se le conoce como un gen constitutivo. Los genes constitutivos son aquellos que se expresan constante e independientemente de las condiciones experimentales tanto en las muestras como en los diferentes tejidos o tipo de células, debido a que los genes constitutivos carecen de regulación son excelentes indicadores de la integridad del material genético de la célula durante su extracción o manipulación en el laboratorio. Su análisis mediante PCR se basa en emplear iniciadores que flanqueen la secuencia del gen de β -actina en el ADN celular. De esta manera, la amplificación positiva del gen confirma la viabilidad e integridad del material genético extraído (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Una vez demostrada la aptitud del ADN, se realizó la PCR de cDNA.

Para la preparación de β -actina se realizó la siguiente metodología:

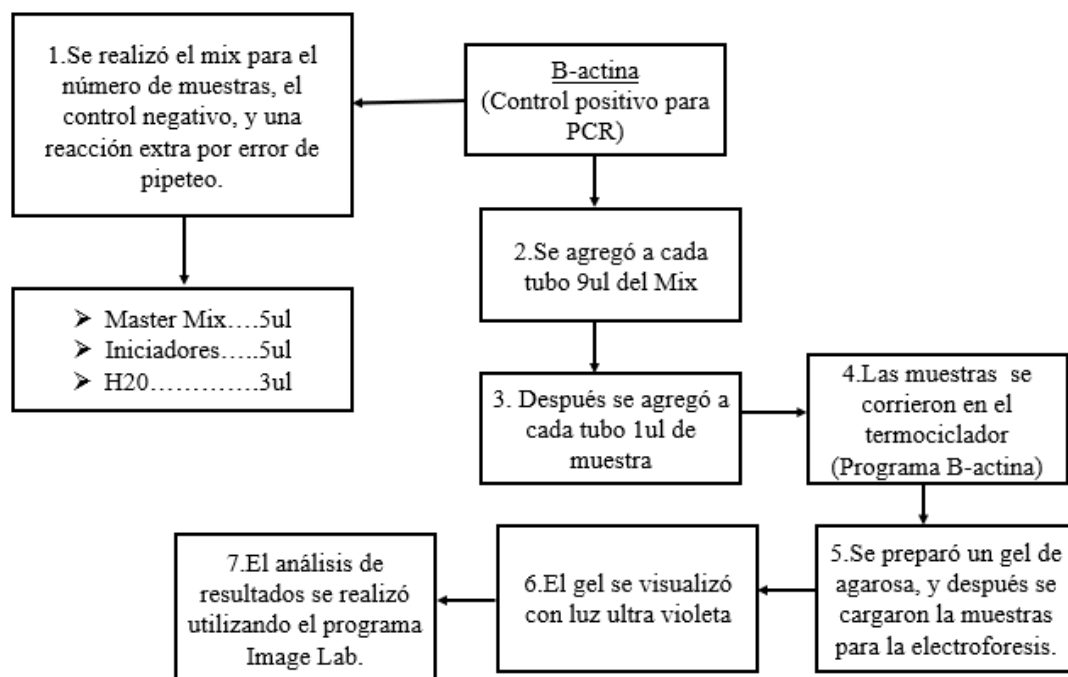


Figura 2. Procedimiento para la realización de β -actina (Control positivo). Elaboración propia.

4.10 Preparación de geles de agarosa con bromuro de etidio

La agarosa es un polisacárido obtenido del aislado de agar de algas rojas marinas, el cual está constituido por unidades repetidas de agarobiosa, sustituida de manera extensa en grupo éster de sulfato, ácido pirúvico cetol y ésteres metílicos. Dicho polímero es de interés en el análisis del ADN debido a las características que posee al ser gelificado, consiste en una bobina aleatoria estructurada por una doble hélice en etapas iniciales de la gelificación y a medida que avanza la gelificación se forman las dobles hélices finales (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

La configuración mencionada forma una red fibrosa que puede ser utilizada como filtro para la clasificación de diferentes moléculas, donde la concentración de agarosa es inversamente proporcional al tamaño del poro (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Metodología:

El gel se obtuvo disolviendo la agarosa en buffer TAE al 1 % y se calentó usando un horno de microondas, hasta obtener una solución homogénea y transparente. Posteriormente se añadió 1 μL de bromuro de etidio y se homogenizó. A continuación, se dejó enfriar la solución a 55 °C y se vertió en un soporte, donde se solidificó, en el que previamente se colocó un peine (El peine forma los pozos donde se depositan las muestras). Finalmente, el soporte se sumergió en un equipo de electroforesis de electrodos que contenía una solución tampón. Los geles de agarosa se prepararon al 2%.

4.11 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes. Para la separación de ácidos nucleicos se utilizan matrices de agarosa y para la separación de proteínas se utilizan matrices de poliacrilamida. Esta técnica representa una herramienta fundamental para análisis cuantitativos en diversos campos de ciencias biológicas como la biología molecular, bioquímica, etc. (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Para el procedimiento de electroforesis se siguió la siguiente metodología (Figura 3).

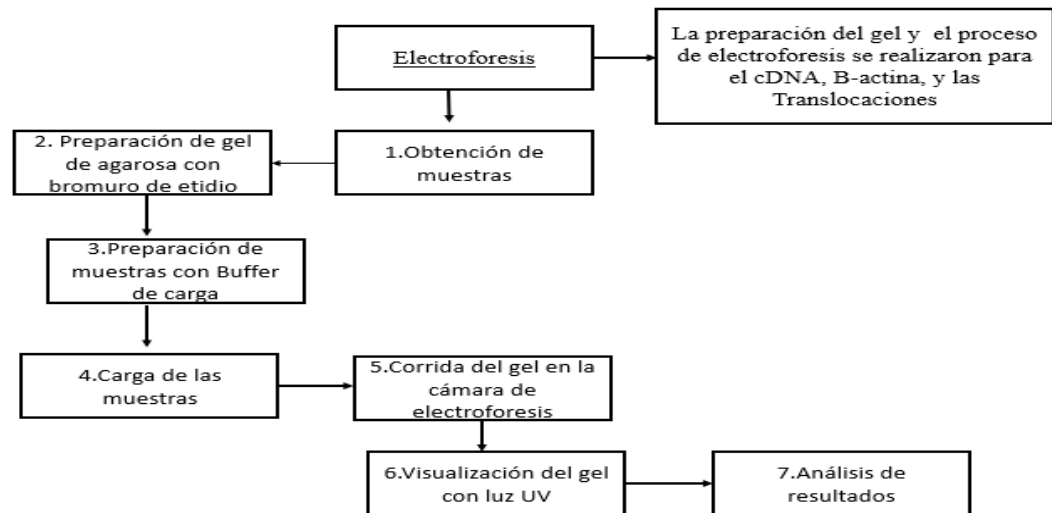


Figura 3. Procedimiento para la elaboración de electroforesis. Elaboración propia.

4.12 PCR-Punto Final

La PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica *in vitro*, que consiste en la multiplicación exponencial del número de copias de un fragmento determinado de ADN empleando parte de la propia maquinaria celular. Desde su invención, la PCR ha revolucionado la biología y la medicina molecular a tal grado que es indispensable para el análisis de ácidos nucleicos en el laboratorio (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

El primer componente de una PCR es “El ADN de doble cadena (dcDNA). La integridad de este es indispensable pues funge como “molde” para la síntesis de la “hebra complementaria” (cDNA), la cual a su vez será la hebra original y así sucesivamente. Para que se lleve a cabo la amplificación de una secuencia determinada de ADN, se necesita de un segundo componente “los iniciadores o primers”. Estos son pequeños fragmentos de ADN (<30 nucleótidos), que se unen a la hebra molde, flanquean a la secuencia que se desea amplificar e indican a la “DNA-polimerasa” qué hebra debe complementarse. Usualmente la hebra molde se considera como la cadena codificante, que corre río abajo (5´-3´) y es igual al ARNm (que da lugar a una proteína). Sin embargo, es una referencia errónea, pues la hebra molde no es más que la cadena de ADN a la cual se une el primer, sentido (forward) o antisentido (reverse). Lo único que determina la hebra molde es el sentido de la síntesis de cadena nueva (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

La DNA-polimerasa es la enzima responsable de sintetizar al ADN, justo como hace *in vivo* (in vivo), requiere de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) para incorporarlos a las nuevas hebras. Sin embargo, dado que la prueba es *in vitro*, es necesario simular las condiciones naturales con el fin de lograr el óptimo funcionamiento y rendimiento de la enzima. Por consiguiente, otros elementos como: buffer, H₂O, MgCl₂ se añaden a la reacción. Este último puede unirse a los dNTP's haciéndolos más específicos y atractivos para la DNA polimerasa que sus

contrapartes difosfatados (dNDP's). Sin embargo, es siempre importante considerar su concentración antes de llevar a cabo la reacción de PCR, pues en cifras elevadas también puede disminuir la especificidad de los (dNTP's) provocando la inhibición de la reacción (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

La PCR consta de 3 etapas: Desnaturalización, alineamiento y elongación

En la **desnaturalización**: Es necesario elevar la temperatura de la reacción hasta 94-96 ° C con el fin de romper los puentes de hidrogeno que mantienen unidas a las bases nitrogenadas. De esta forma ambas hebras del ADN se separan por completo. La temperatura varía dependiendo de la cantidad de guaninas (G) y citosinas (C) en el ADN. Ya que su apareamiento consta de 3 puentes de hidrogeno a diferencia de los dos que tienen el par timina-adenina (T-A). Una mayor cantidad de puentes de hidrogeno entre bases nitrogenadas fortalecen la unión no covalente entre ellas, incrementando también su resistencia a altas temperaturas. Es por ello imprescindible saber la cantidad de (G-C) de la hebra de ADN a analizar con el fin de estimar la temperatura ideal para su desnaturalización (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Alineamiento: En la segunda etapa, la temperatura disminuye alrededor de 60 °C para permitir la unión de los primers con la hebra de ADN complementaria a su secuencia. Tanto errores en la temperatura como en el tamaño de los primers pueden provocar la unión inespecífica de estos. En otros casos, pueden pegarse ellos mismos y formar dímeros (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Elongación: La temperatura en la tercera y última etapa se vuelve a incrementar hasta poco más de 70 °C. Es en este punto cuando la ADN polimerasa empieza a trabajar y a sintetizar las nuevas hebras complementarias. Al finalizar las 3 etapas, se dice que ha concluido un ciclo. Una reacción de PCR puede realizar de 20 hasta 40 ciclos, dependiendo de la enzima y los primers que se utilicen (Bekker-Méndez y Gómez-Casiano, 2015).

Metodología:

Para la detección de translocaciones por PCR-punto final se utilizaron los siguientes reactivos: Master Mix, un juego de iniciadores específicos para cada una de las translocaciones y agua libre de RNAsas. Cada una de las muestras se llevó a un volumen total de 10ul, posteriormente se llevaron al termociclador. Finalmente, los productos finales fueron analizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 2% en un transiluminador Chemi Doc TM XRS+ System y el software Image Lab. Los resultados positivos se repitieron para corroborar los resultados.

4.13 PCR-Tiempo Real

La PCR- RT es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez de visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Los ensayos de la PCR en tiempo real son mucho más sensibles que las pruebas por PCR-punto final y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN. Además, se ha reportado que para la PCR convencional (punto final), la cantidad final de producto amplificado puede verse afectada por inhibidores, saturación de la reacción o bien por falta de una estandarización adecuada. Por lo que los resultados de la PCR-punto final pueden no tener relación entre la cantidad de ácidos nucleicos que había al inicio de la reacción y la concentración final del producto amplificado (Cornejo Romero, 2014, p. 274) Para la amplificación por PCR en tiempo real además de los reactivos que se emplean en la PCR-punto final, es necesario emplear un fluoróforo. En algunos ensayos cuantitativos se requiere determinar el número de moléculas de ARNm, por lo que es necesario llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm a cDNA antes de que se aplique la PCR en tiempo real. En este caso, el ensayo se conoce como retro transcripción o RT acoplada a la PCR (RT-PCR). Finalmente, se realiza la amplificación (síntesis) del ADN o cDNA en un sistema de termociclador que monitorea las señales de los fluoróforos usados para detectar el producto amplificado. Debido a que la fluorescencia de éstos aumenta conforme el producto se amplifica, se combinan los procesos de amplificación y detección en una sola etapa. Para la detección de biomarcadores relevantes en niños con LLA se realizaron pruebas de PCR-tiempo real (Cornejo Romero, 2014, p. 274)

Metodología:

Para la detección de translocaciones por PCR tiempo real, se utilizó un juego de iniciadores específicos, Buffer RT, agua libre de RNAasa, enzima Taq-polimerasa, y una sonda específica para cada translocación. Las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μ L y se procesaron en un equipo StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR System. Finalmente, las muestras positivas se repitieron para corroborar resultados.

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron 95 muestras de pacientes pediátricos mexicanos con LLA proporcionadas por El Servicio de Hematología Pediátrica (noveno piso), y Oncoferesis (planta baja) del Hospital General “Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La raza”. Estas muestras fueron procesadas del 4 de abril del 2022 al 27 de septiembre 2022. Durante este tiempo se registraron cuatro muestras positivas para el reordenamiento TEL-AML, una muestra positiva para el

reordenamiento E2A-PBX, y una para BCR-ABL menor. No se encontraron muestras positivas para las demás translocaciones.

La detección de los reordenamientos genéticos se realizó por pruebas de PCR-tiempo real y PCR-punto final. Los resultados mostraron una mayor frecuencia del reordenamiento TEL-AML, translocación que está asociada con un buen pronóstico. Desafortunadamente, aunque este reordenamiento, es la translocación con mejor pronóstico en nuestro país, su prevalencia en nuestro territorio es muy baja, sí se compara con la de otros de países desarrollados. Esta translocación se presenta en el 25 % de los casos de LLA (Guerra-Castillo *et al.*, 2016).

Por otro lado, E2A-PBX, es la segunda translocación más frecuente, pero es la que posee una mayor prevalencia en México, semejante con la de países desarrollados. En este trabajo solo se encontró en un paciente, sin embargo, Guerra-Castillo *et al.* (2016), reportaron una alta frecuencia para este reordenamiento (5.15 %) similar a la reportada en países desarrollados (4 %) que poseen una población mayormente caucásica. Esta translocación se encuentra frecuentemente en niños con leucemias agudas linfoblásticas de fenotipo pre-B. Los pacientes portadores de este reordenamiento tienen un desenlace desfavorable por lo tanto su presencia debe tenerse en cuenta al momento de establecer un tratamiento efectivo y oportuno (Guerra-Castillo *et al.*, 2016).

Esto concuerda con lo descrito por Bekker-Méndez *et al.* (2014), quienes reportaron una prevalencia significativamente alta para E2A-PBX (7.10 %) y una baja prevalencia para TEL-AML (7.40 %).

Por otro lado, el reordenamiento de BCR-ABL se ha encontrado en dos tercios de los casos de LLA. Este reordenamiento confiere un mal pronóstico, pero se asocia con una baja frecuencia en países en desarrollo (1.8 %) y una frecuencia mundial del (2 %) (Guerra-Castillo *et al.*, 2016). En el presente reporte solo se encontró en un paciente.

Tal y como se mencionó con anterioridad, no se encontró la presencia de los demás reordenamientos genéticos. Cabe destacar que MLL-AF4 en otros estudios se ha encontrado con una frecuencia del 2 % y también se ha asociado con un desenlace desfavorable. Lagunas-Rangel *et al.* (2015), indican que FLT3 (ITD) se ha encontrado en el 5 % de los casos. Juárez-Velázquez *et al.* (2022) menciona que en diferentes estudios los reordenamientos de CRLF2 (P2RY8 e IGH) se han encontrado en el 5 % de los casos. Esto podría ser un indicio de la relevancia clínica de ambas translocaciones (Principalmente CRLF2), ya que estos reordenamientos genéticos podrían encontrarse con mayor frecuencia que BCR-ABL, MLL-AF4 en pacientes pediátricos, además están asociadas con un desenlace desfavorable. Posiblemente la frecuencia de cada uno de estos reordenamientos se deba a diversos factores étnicos, de raza o factores ambientales, etc.

6.CONCLUSIÓN

En México se debe hacer conciencia sobre la importancia de realizar pruebas para la detección de alteraciones genéticas en pacientes pediátricos con leucemia, debido a que son pocos los centros que las realizan y no todos las realizan de manera rutinaria. Con la finalidad de darles a los pacientes un mejor diagnóstico y un tratamiento oportuno.

7.IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

En la población de la Ciudad de México se ha informado que en niños la tasa de incidencia ajustada por edad (AAIR por las siglas en ingles de age-adjusted incidence rate) para LLA son sorprendentemente altos entre 49.5 y 57.6 por millón de habitantes (Mejía-Aranguré *et al.*, 2016; Pérez-Saldivar *et al.*, 2011) en comparación con otros países de Latinoamérica, además que esta incidencia parece estar aumentando.

Un estudio de la Ciudad de México demostró que el 73.2 % de los niños tenía el inmunofenotipo de células precursoras B (BCP B cell precursor) , el 12.4 % tenía el inmunofenotipo de células T, y el resto se desconocía (Pérez-Saldivar *et al.*, 2011). Del total de casos de leucemia infantil, aproximadamente el 80 % son (LLA), alrededor de 17 % son leucemia mieloide aguda (LMA) y el restante 2.3 % son esencialmente leucemia mielógena crónica (LMC) con cromosoma Filadelfia positivo y leucemia mielomonocítica juvenil (Pérez-Saldivar *et al.*, 2011).

Por lo que el impacto de las actividades realizadas para el servicio social dentro de la Unidad de Investigación responde a la demanda de dicha situación, la detección de alteraciones moleculares en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica otorga una detección oportuna que apoya al médico para darle un mejor tratamiento al paciente.

8.APRENDIZAJE Y HABILIDADES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DEL SERVICIO SOCIAL.

Mi estancia dentro de la Unidad de Investigación Médica me permitió poner en práctica y consolidar mi formación profesional, así como la adquisición de nuevos conocimientos y habilidades descritas en este trabajo, adquirir una actitud más crítica mediante la identificación y estudio de problemas relacionados a los procesos celulares fundamentales, enfatizando en el proceso salud-enfermedad enmarcado en el contexto social vigente.

Por otra parte, mi estancia dentro del laboratorio me llevo a realizar actividades, como la obtención de muestras, clasificación, procesamiento, resguardo y análisis. Cada una de estas actividades me condujo a la revisión de artículos científicos (parte teórica) para entender lo que estaba haciendo dentro del laboratorio (parte práctica) Dándome las herramientas para analizar e interpretar lo que el investigador quiere demostrar o enseñar en sus publicaciones y así poder regresar con más seguridad a la parte práctica. Esto me permitió entender mejor la estructura y la interpretación de artículos científicos.

9.FUNDAMENTO DE LAS ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

La etiología de las leucemias, presentan distintos factores que condicionan la enfermedad, tal es el caso de las enfermedades genéticas que promueven una inestabilidad genómica, los virus linfotrópicos, agentes ambientales que provocan una estimulación crónica del sistema inmunitario, la radioterapia y quimioterapia, los bencenos y por último, también se pueden originar por translocaciones cromosómicas y otras mutaciones adquiridas, donde muchas translocaciones específicas son asociadas con ciertas neoplasias.

Dado que, el diagnóstico de LLA en población infantil, está dado por la inmunofenotipificación, la clínica y el estudio hematológico del paciente. Existen pruebas moleculares como es el panel de PCR-punto final y PCR-tiempo real para la detección de translocaciones asociadas a LLA y MLA. La determinación correcta en cada una de las pruebas para conocer las diferentes translocaciones.

Por lo que en la Unidad de Investigación en Infectología e Inmunología se detectan simultáneamente por PCR tiempo real y punto final las translocaciones linfoblásticas (TEL-AML1 t(12;21) (p13; q22), MLL-AF4 t(4;11) (q21; q23), BCR-ABL Menor t(9;22) (q34;q11), E2A-PBX1 t(1;19)(q23;p13) y translocaciones Mieloblásticas PML-RAR t(15;17)(q22;q21), BCR-ABL Mayor) en muestras de médula ósea (MO) de pacientes pediátricos con (LLA) y (MLA). Una detección oportuna apoya al médico tratante en la decisión de cuál es el mejor tratamiento para el paciente.

La colaboración en dicho proceso de investigación permitió realizar una vinculación directa del proceso enseñanza-aprendizaje con una problemática de la realidad socialmente definida, como lo es la leucemia en la población pediátrica de la Ciudad de México; aportando así a la obtención de información útil y de valor para el desarrollo y planificación de nuevas vías de investigación y tratamiento para dicha enfermedad. En consonancia con la misión de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco.

10.REFERENCIAS

- Bekker-Méndez, V. C., Gómez-Casiano, G. (2015). Detección de translocaciones pediátricas: Unidad de Investigación Médica del Hospital de Infectología e Inmunología (UIMII) del Centro Médico Nacional “La Raza” (IMSS)
- Bekker-Méndez, V. C., Miranda-Peralta, E., Núñez-Enríquez, J. C., Olarte-Carrillo, I., Guerra-Castillo, F. X., Pompa-Mera, E. N., Ocaña-Mondragón, A., Rangel-López, A., Bernáldez-Ríos, R., Medina-Sanson, A., Jiménez-Hernández, E., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J. G., de Diego Flores-Chapa, J., Fajardo-Gutiérrez, A., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M. del C., Dorantes-Acosta, E. M., Bolea-Murga, V., & Núñez-Villegas, N. (2014). Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study—Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/210560>
- Contreras Pineda, J. (2018). *Biología Celular y Molecular Médica I*. <https://jorge-contreras.webs.com/guia-EI%20uso%20de%20micropipeta-BM.pdf>
- Cornejo Romero, A. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (A. Cornejo Romero & A. Serrato Díaz, Eds.; Primera edición, p. 274) [Review of *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*]. Amelia Cornejo Romero. [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/Herramientas](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/Herramientas)
- Daniel-Cravioto, A., Gonzalez-Bonilla, C. R., Mejia-Arangure, J. M., Perez-Saldivar, M. L., Fajardo-Gutierrez, A., Jimenez-Hernandez, E., Hernandez-Serrano, M., & Bekker-Mendez, V. C. (2009). Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leukemia & Lymphoma*, 50(8), 1352–1360. <https://doi.org/10.1080/10428190903015636>
- Guerra-Castillo, F. X., Ramos-Cervantes, M. T., Rosel-Pech, C., Jiménez-Hernández, E., & Bekker-Méndez, V. C. (2016). Detección de translocaciones relevantes por PCR en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social, Sup.* 54(3), 302–308. <https://www.redalyc.org/journal/4577/457762457012/html/>
- Jiménez-Morales, S., Miranda-Peralta, E., Saldaña-Alvarez, Y., Perez-Vera, P., Paredes-Aguilera, R., Rivera-Luna, R., Velázquez-Cruz, R., Ramírez-Bello, J., Carnevale, A., & Orozco, L. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in

Mexican patients. *Leukemia Research*, 32(10), 1518–1522.

<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.03.021>

- Juárez-Velázquez, M. D. R., Moreno-Lorenzana, D. L., Martínez Anaya, D. A., Hernández Monterde, E. A., Aguilar-Hernández, M. M., Reyes-León, A., Chávez-González, M. A., López Santiago, N., Zapata Tarrés, M., Juárez Villegas, L., Rivera Sánchez, N., Soto Lerma, O., Vega-Vega, L., Rivera Luna, R., & Pérez-Vera, P. (2022). High occurrence of CRLF2 abnormalities in Mexican children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cytokine*, 155, 155896.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155896>
- Lagunas-Range, F. A., Pérez-Contreras, V. A., Cortés-Penagos, C. (2015). FLT3, NPM1 y C/EBP α como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Rev Mex Hematol* 2015;16:152-167.
https://www.researchgate.net/publication/306347201_FLT3_NPM1_y_CEBPa_como_marcadores_pronosticos_en_pacientes_con_leucemia_mieloide_aguda
- Mata-Rocha, M., Rangel-López, A., Jimenez-Hernandez, E., Nuñez-Enríquez, J. C., Morales-Castillo, B. A., Sánchez-Escobar, N., Sepúlveda-Robles, O. A., Bravata-Alcántara, J. C., Nájera-Cortés, A. S., Pérez-Saldivar, M. L., Flores-Lujano, J., Duarte-Rodríguez, D. A., Oviedo de Anda, N. A., Romero Tlalolini, M. de los A., Alaez Verson, C., Martín-Trejo, J. A., Muñoz Medina, J. E., Gonzalez-Bonilla, C. R., Hernandez Cueto, M. de los A., & Bekker-Méndez, VC. (2022). Low Prevalence of ETV6::RUNX1 Fusion Gene in a Hispanic Population. *Frontiers in Pediatrics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.837656>
- Mejía-Aranguré, J., Carlos Núñez-Enríquez, J., Fajardo-Gutiérrez, A., del Carmen Rodríguez-Zepeda, M., Alfonso Martín-Trejo, J., Aldebarán Duarte-Rodríguez, D., Medina-Sanson, A., Flores-Lujano, J., Jiménez-Hernández, E., Nancy Núñez-Villegas, N., Luisa Pérez-Saldivar, M., Paredes-Aguilera, R., Cárdenas-Cardós, R., de Diego Flores-Chapa, J., Carolina Reyes-Zepeda, N., Victoria Flores-Villegas, L., Amador-Sánchez, R., Refugio Torres-Nava, J., Bolea-Murga, V., Rangel-López, A. (2016). Epidemiología descriptiva de la leucemia mieloide aguda (LMA) en niños residentes de la Ciudad de México: reporte del Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños Gaceta Médica de México ARTÍCULO ORIGINAL.
https://anmm.org.mx/GMM/2016/s2/GMM_152_2016_S2_66-77.pdf
- Pérez-Saldivar, L., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., Flores-Chapa, J. de D., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J. G., Álvarez-Rodríguez, F. J., Bolea-Murga, V., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M. del C., Rivera-Luna, R., Dorantes-Acosta, E. M., Jiménez-Hernández, E., Alvarado-Ibarra, M., Velázquez-Aviña, M. M.,

Torres-Nava, J. R., Mejia-Arangure, J. M. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, 11, 355.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-355>

- Pérez-Vera, P., Salas, C., Montero-Ruiz, O., Frías, S., Dehesa, G., Jarquín, B., & Rivera-Luna, R. (2008). Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 184(2), 94–98.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.04.003>
- Ries, L., Melbert, D., Krapcho, M., Stinchcomb, D., Howlader, N., Horner, MJ; Mariotto, A., Miller, B., Feuer, E., Altekruse, S., Lewis, D., Clegg, L., Eisner, M., Reichman, M., & Edwards, B. (2008). *SEER cancer statistics review, 1975-2005* / *Health & Environmental Research Online (HERO) | US EPA*. 907.
https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/730406
<https://doi.org/10.1182/BLOOD.V45.3.321.321>