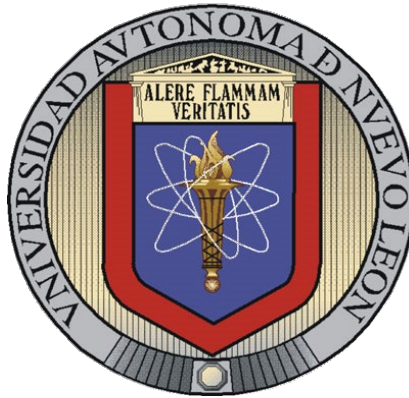


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“Análisis de genes potencialmente asociados a
progresión de la leucemia, útiles para el monitoreo
de la ERM”**

Por:

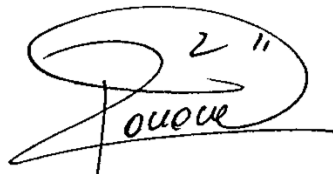
Q.C.B. Idalia Garza Veloz

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

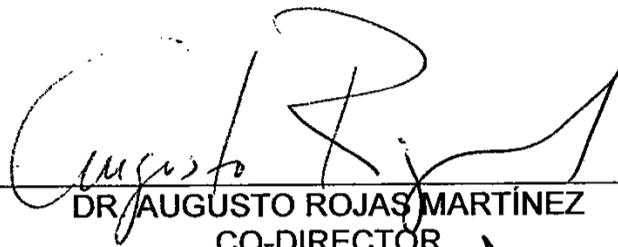
Agosto, 2008

Análisis de genes potencialmente asociados a progresión de la leucemia, útiles para el monitoreo de la ERM

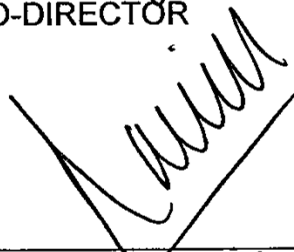
Aprobación de Tesis:



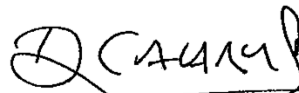
DRA. ROCIO ORTIZ LÓPEZ
DIRECTOR



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
CO-DIRECTOR



DR. JOSÉ CARLOS JAIME PÉREZ
CO-DIRECTOR



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de la UANL y en el Laboratorio del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, con la colaboración de la Unidad de Secuenciación y Tiempo Real del INMEGEN en la ciudad de México, D.F.

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión de la Dra. Rocío Ortiz López como directora y los doctores Augusto Rojas Martínez y José Carlos Jaime Pérez como co-directores.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por amarme, permitirme vivir y darme la provisión suficiente para cumplir mis sueños en la vida

A mi **Familia** por apoyarme, ser mi soporte en todo momento y permitirme realizar todas mis metas y proyectos

A mis Asesores **Dra. Rocío Ortiz López, Dr. José Carlos Jaime Pérez y Dr. Augusto Rojas Martínez**, por dirigirme, enseñarme, darme la confianza y apoyarme en la realización de esta tesis y del posgrado

A **Margarita Martínez Fierro** por ser mi mentor, tener el tiempo y paciencia para enseñarme y por todo el apoyo y amistad que me ha dado, gracias x existir.

A mis amigos y compañeros **Diana Pérez, Martha Luévano, Mariana Elizondo, Yael C., Iram, Michelle Zamudio, Sofía Bernal....** Por estar ahí y traer diversión y comodidad a mi vida

A todo el **personal y maestros** del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL.

A las instituciones apoyaron el proyecto y por ende la realización de esta tesis, tanto financieramente como otorgando otro tipo de recursos **CONACyT SALUD-2004-01-026, CUCC-HU-UANL, e INMEGEN.**

GRACIAS!!!

ÍNDICE

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS
LISTA DE FIGURAS
ABREVIATURAS
RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Leucemias
- 1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)
- 1.3 Clasificación FAB y MIC de las Leucemias
- 1.4 Genética Molecular de la LLA
- 1.5 Tratamiento
- 1.6 Pronóstico
- 2.1 Enfermedad Residual Mínima
- 2.2 Técnicas para la detección de la ERM
 - 2.2.1 Análisis Citogenético
 - 2.2.2 Técnicas de Hibridación in situ Fluorescente
 - 2.2.3 Citometría de Flujo
 - 2.2.4 Amplificación de Ácidos Nucléicos por PCR y qPCR
- 3.1 Búsqueda de Nuevos Biomarcadores en Pacientes con Leucemia, mediante Estudios Genómicos de Alto Rendimiento

4.1 ANTECEDENTES DIRECTOS

5.1 JUSTIFICACIÓN

6.1 OBJETIVOS

- 6.1.1 Objetivo general
- 6.1.2 Objetivos particulares

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

8.1 ESTRATEGIA GENERAL

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

- 8.2.1 Origen de los reactivos
- 8.2.2 Equipos utilizados
- 8.2.3 Programas de análisis bioinformático
- 8.3.1 Origen de las Muestras
- 8.3.2 Sujetos de Estudio
- 8.3.3 Criterios de Inclusión
- 8.3.4 Criterios de Exclusión
- 8.3.5 Criterios de Eliminación
- 8.4.1 Toma de Muestra

- 8.5.1 Procesamiento de la Muestra
- 8.5.2 Separación de Células Mononucleares
- 8.5.3 Extracción de RNA Total
- 8.5.4 Preparación del cDNA
- 8.5.5 Cuantificación del cDNA
- 8.5.6 Diseño de los iniciadores
- 8.5.7 PCR cuantitativa en tiempo real
- 8.5.8 PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-Array)
- 8.6.1 Secuenciación del gen PAX5
- 8.6.2 Diseño de los oligonucleótidos para los exones
- 8.6.3 Origen de las muestras
- 8.6.4 Amplificación de los exones
- 8.6.5 Purificación del producto de PCR
- 8.6.6 Reacción de secuenciación

9.0 RESULTADOS

- 9.1 Banco de Muestras
 - 9.1.2 Análisis de los niveles de expresión por qPCR
- 9.2.1 Resultados del Objetivo 1: Estandarización del análisis cuantitativo de los posibles biomarcadores de interés en sujetos sin leucemia
 - 9.2.2 Selección de los genes endógenos
 - 9.2.3 Selección de Concentración
 - 9.2.4 Optimización de la qPCR
- 9.3 Resultados del Objetivo 2: Valorar la expresión de los posibles biomarcadores en muestras sucesivas de seguimiento de pacientes con leucemia
- 9.4 Resultados del Objetivo 3: Caracterizar molecularmente al gen Pax5

10.0 DISCUSIÓN

11.0 CONCLUSIÓN

12.0 PERSPECTIVAS

13.0 BIBLIOGRAFÍA

14.0 APÉNDICE

- 14.1 Carta de Consentimiento Informado

LISTA DE TABLAS:

Tabla 1	Hallazgos de laboratorio característicos de LLA
Tabla 2	Clasificación morfológica de las leucemias agudas (FAB)
Tabla 3	Criterios FAB y MIC para los subtipos de la LLA
Tabla 4	Aberraciones cromosómicas estructurales no aleatorias en la LLA
Tabla 5	Indicadores clínicos y de laboratorio con valor pronóstico
Tabla 6	Métodos para la detección de la ERM en la leucemia aguda y crónica
Tabla 7	Genes seleccionados por diferentes investigadores, después de estudios genómicos de expresión
Tabla 8	Iniciadores utilizados para el análisis de los genes por qPCR
Tabla 9	Secuencia de Oligonucleótidos de los Exones de Pax5
Tabla 10	Descripción de las muestras seleccionadas
Tabla 11	Distribución del Banco de muestras
Tabla 12	Distribución de los pacientes
Tabla 13	Características de las muestras seleccionadas de pacientes con LLA
Tabla 14	Niveles de expresión de los genes endógenos
Tabla 15	Niveles de expresión por concentración

LISTA DE FIGURAS:

- Fig. 1** Imagen de frotis de sangre periférica con incrementos de blastos característicos de la leucemia linfoblástica aguda
- Fig. 2** Anormalidades cromosómicas recurrentes en LLA
- Fig. 3** Diagrama de la estrategia general
- Fig. 4** Distribución de los genes en la placa de reacción
- Fig. 5** Gráfica de los niveles de expresión de los genes endógenos probados en pacientes con LLA
- Fig. 6** Gráfica de niveles de expresión de PAX5 y DEFA1 por concentración
- Fig. 7** Gráficas de correlación lineal y ejemplo de curvas de amplificación de Pax5 en las 4 diluciones probadas por qPCR
- Fig. 8** Curvas de amplificación de los 47 genes evaluados con Sybr green
- Fig. 9** Curva de disociación de 14 genes con picos inespecíficos
- Fig. 10** Curva de disociación de los genes evaluados por qPCR
- Fig. 11** Mapa de Calor de los genes seleccionados
- Fig. 12** Genes diferencialmente expresados en todos los pacientes
- Fig. 13** Genes diferencialmente expresados por Género
- Fig. 14** Genes diferencialmente expresados por Edades
- Fig. 15** Genes diferencialmente expresados por Riesgo
- Fig. 16** Genes diferencialmente expresados por Linaje y translocación BCR-ABL
- Fig. 17** Exones del gen de PAX5 (Paired Box 5)
- Fig. 18** Reacción de PCR para el gen Pax5
- Fig. 19** Gradiente de temperaturas para los exónes 2, 5 y 8
- Fig. 20** Amplificación de los 10 exones del gen de Pax5 estandarizados
- Fig. 21** Amplificación de los 10 exones a partir de las muestras seleccionadas
- Fig. 22** Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 2
- Fig. 23** Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 8
- Fig. 24** Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 10
- Fig. 25** Alineamiento de las secuencias mutadas de los exones 8 y 10 con su secuencia de referencia

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μl	Microlitros
μm	Micras
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CGH	Hibridación genómica comparativa, por sus siglas en inglés: Comparative Genomic Hybridization
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético, por sus siglas en inglés: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
F	Femenino
Fig	Figura
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> , por sus siglas en inglés: Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
g	Gramos
GTYPE	Siglas del programa GeneChip Genotyping Analysis
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
Kb	Kilobases
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de células T
LMA	Leucemia mielocítica aguda
LMC	Leucemia mielocítica crónica
M	Molar
M	Masculino
Mb	Megabases
mg	Miligramos
min.	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrógeno
Phi	Cromosoma Filadelfia
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Polymorphism
U	Unidad
UA de C	Universidad Autónoma de Coahuila
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

RESUMEN

Q.C.B. Idalia Garza Veloz

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Agosto 2008

Área de estudio: Genética Molecular

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas:82

Título del estudio: ANÁLISIS DE GENES POTENCIALMENTE ASOCIADOS A PROGRESIÓN DE LA LEUCEMIA, ÚTILES PARA EL MONITOREO DE LA ERM.

Introducción. La leucemia linfoblástica (LL) es un grupo de enfermedades de la médula ósea que se caracteriza por una proliferación maligna de los precursores linfoides. La LL aguda (LLA) es la más importante y frecuente en México. Su origen se asocia a alteraciones cromosómicas como translocaciones, inversiones, aneuploidías, y alteraciones en marcadores de superficie, siendo éstas mismas las que se utilizan actualmente para el monitoreo de la enfermedad residual mínima (ERM) en el seguimiento de la enfermedad. Existen cambios en el número de copias de secuencias del DNA que se han asociado a alteraciones en la función y la expresión de los genes implicados en LLA. En nuestro laboratorio estudios previos de CGH con GenoSensor Array 300, Vysis/Abbott, de microarreglos de SNP (500,000 SNP), GeneChip Human Mapping 500k (Affymetrix) y de microarreglos de Expresión HG U133 Plus 2.0 (Affymetrix), mostraron un grupo de genes candidatos a ser usados como biomarcadores útiles en el monitoreo de la ERM y en el pronóstico de la enfermedad.

Objetivo. Validar en una población de sujetos con LLA, un grupo de genes seleccionados mediante estudios genómicos, para determinar su utilidad como biomarcadores para predecir recaída, progresión y/o respuesta al tratamiento en ERM.

Material y Métodos. Se colectó un total de 99 pacientes con LLA que accedieron participar en el estudio. A cada uno se le tomaron muestras de sangre periférica a diferentes tiempos (al diagnóstico, a las 4 semanas y a las 8 semanas). De cada muestra se separaron células mononucleares, a las cuales se les extrajo RNA total y de éste se obtuvo el cDNA que sirvió como templado para evaluar el nivel de expresión de un grupo de 47 genes, mediante el método de qPCR/SybrGreen. Una vez obtenidos los resultados, se calcularon los niveles de expresión por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se analizaron mediante un análisis bilateral de la variancia por jerarquías de Friedman.

Resultados. Se obtuvieron: 11 genes con nivel de expresión significativo en todos los pacientes: STAT5, BCL2A1, OPAL1, FLT3, RXRA, FOS, SORT1, HK2, SL00A8, CD44 y CD3D; 14 genes significativos por género: BCL11A, STAT5, BCL2A1, OPAL1, CREB1, HK2, SL00A8 y NOTCH1 en Mujeres y BCL2A1, FLT3, FOS, SORT1, HK2 y CD44 en hombres; 14 genes significativos por edades: BCL11A, STAT5, BCL2A1, FLT3, FOS y SL00A8 en Niños, y CTNNB1, STAT5, BCL2A1, OPAL1, CREB1, SORT1, HK2 y SL00A8 en Adultos; 11 genes significativos por riesgo: STAT5, BCL2A1, OPAL1, FLT3, SORT1 y CD3D en riesgo habitual y BCL2A1, OPAL1, FOS, HK2 y SL00A8 en riesgo alto; 13 genes significativos por linaje: BCL11A, STAT5, BCL2A1, OPAL1, FLT3, RXRA, FOS, SORT1, HK2, SL00A8, CD44 y PAX5 en linaje B y CYLD en linaje T; y 13 genes significativos por presencia de translocación BCR-ABL: STAT5, BCL2A1, OPAL1, FLT3, RXRA, FOS, SORT1, HK2, SL00A8, CD3D y CD44 en BCR-ABL negativo y BCL11A y PAPD5 en BCR-ABL positivo.

Conclusión: De los 45 genes evaluados se identificaron 18 genes potencialmente útiles como biomarcadores para el pronóstico y monitoreo de la ERM en un grupo de pacientes con LLA de población mexicana.

Dra. Rocío Ortíz López
Director de tesis

INTRODUCCIÓN

1.1 Leucemias

La leucemia, es un grupo de enfermedades neoplásicas progresivas del sistema hematopoyético caracterizado por la proliferación desregulada de células progenitoras indiferenciadas o parcialmente diferenciadas, las cuales resultan de alteraciones clonales que aumentan la tasa de duplicación o sobrevida de las células leucémicas.¹

La leucemia representa un padecimiento grave, que impacta de manera significativa la salud pública a nivel mundial. México no es excepción y las tasas de morbimortalidad asociadas con leucemia son cada vez mayores, teniendo actualmente una mortalidad de 5.8% dentro de las muertes debidas a cáncer en los grupos de población afectados.²

Las leucemias pueden ser clasificadas según su agresividad, y la célula de la cual se originan en: leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielocítica aguda (LMA) y leucemia mielocítica crónica (LMC). La leucemia aguda es la forma más común de neoplasia, representa el 30% de todos los cánceres de la infancia (de 2 a 15 años) en Europa y EE.UU. El 80% de las leucemias agudas son linfoblásticas y el resto son mieloblásticas. La LLA en la infancia presenta una máxima frecuencia entre los dos y tres años de edad, posee una incidencia anual de 30 a 40 pacientes por millón (2,400 niños y adolescentes menores de 20 años al año) siendo mucho más alta en la raza blanca que entre otras razas o grupos étnicos, y con un ligero predominio en el género masculino.^{3,4} De manera que la LLA es la más importante y frecuente en México.¹

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

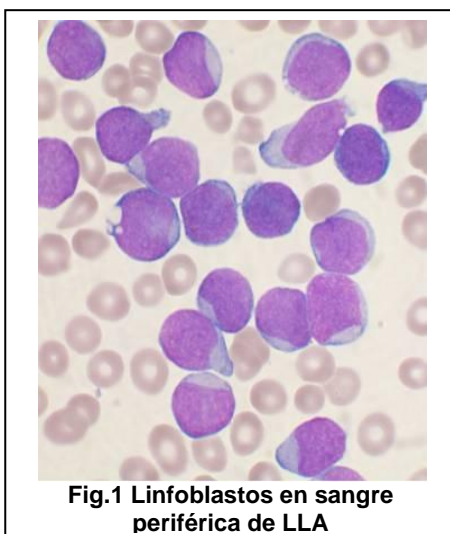


Fig.1 Linfoblastos en sangre periférica de LLA

Este tipo de leucemia se caracteriza por el acumulo de células inmaduras de tipo linfoide en la médula ósea, infiltrando bazo, ganglios e hígado principalmente. La anomalía básica parece ser la mutación de una sola célula progenitora linfoide que da origen a una clona de linfocitos malignos. Estas células linfoides mantienen la capacidad de proliferar de manera no regulada, pero parecen estar detenidas en su secuencia de maduración. Es desconocido el factor desencadenante de la mutación genética leucémica original, pero puede

ser una combinación de factores leucemógenos como la susceptibilidad genética (extracromosomas, formación de genes quiméricos como BCR/ABL y PML/RAR-alfa, la activación de los oncogenes ABL, MYC, BCL-2, RAS; inversiones y pérdidas), las mutaciones somáticas por la exposición a productos químicos (caucho, benceno, hidrocarburos policíclicos, pesticidas, tabaco y alcohol), a la radiación ionizante, a los campos electromagnéticos; a desordenes inmunitarios o a infección viral por retrovirus (como el HTLV-1).^{1, 2, 5}

Los síntomas más comunes son la fatiga o debilidad (92%), dolor óseo o articular (80%), fiebre (70%), pérdida de peso (66%) y masas anormales (62%), los cuales son explicables por la disminución en la hemoglobina y hematocrito y por la trombocitopenia y neutropenia acompañantes. Son signos comunes la esplenomegalia (86%), hepatomegalia (74%) y linfadenopatía (76%), debido al aumento del porcentaje de blastos en la médula ósea, sangre, bazo, hígado y ganglios. La LLA también puede afectar el SNC (2%), riñones y testículos, por lo que el cuadro clínico puede ser confuso. El inicio de la enfermedad suele ser abrupto y continúa de manera progresiva. Las complicaciones más graves que pueden presentar los pacientes son la infección y la hemorragia, las cuales son las causas más comunes de muerte.^{1, 5}

El diagnóstico suele ser fácil, ya que se sospecha en una simple biometría hemática (BH) y se confirma con un estudio de médula ósea (Ver Tabla 1).⁵

Tabla 1. Hallazgos de laboratorio característicos de la LLA ⁵
Sangre periférica
- Cifra de Leucocitos ordinariamente aumentada, pero puede ser normal o estar disminuída
- Neutropenia
- Linfoblastos
- Anemia normocítica normocrómica
- Trombocitopenia
Médula ósea
- Hiper celular
- >30% linfoblastos

1.2 Clasificación FAB y MIC de las Leucemias

Desde 1976, la asignación a alguno de los principales grupos de leucemias (mieloide o linfoide) y a subgrupos dentro de cada grupo principal, se ha basado en características

morfológicas y citoquímicas establecidas por el sistema de clasificación Franco-Americano-Británicos (FAB)⁶.

Se describen a continuación 11 tipos de LA que en la actualidad reconoce el grupo cooperativo franco-americano-británico (FAB). Esta clasificación morfológica de las LA es la única que debe considerarse actualmente:

Tabla 2. Clasificación morfológica de las leucemias agudas (FAB)	
LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLASTICAS	
L1:	linfoblástica "típica"
L2:	linfoblástica "atípica"
L3:	parecida al linfoma de Burkitt
LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLASTICAS	
M0:	mieloblástica diferenciada mínimamente
M1:	mieloblástica inmadura
M2:	mieloblástica madura
M3:	promielocítica
M4:	mielomonoblástica
M5:	monoblástica
M6:	eritroleucemia
M7:	megacarioblástica

En el último decenio, también se ha usado la inmunofenotipificación de células leucémicas y el análisis citogenético de aberraciones cromosómicas para complementar los datos morfológicos y citoquímicos (MIC por sus siglas en inglés Morphologic, Immunologic, and Cytogenetic). En la actualidad es ampliamente aceptado que el mejor procedimiento para clasificar a la leucemia aguda usa una combinación de criterios morfológico, citoquímico, inmunológico y citogenético.⁷⁻¹⁰ (Ver Tabla 3)

Tabla 3. Criterios FAB y MIC para los subtipos de la LLA.^{6, 7}

CARACT. CITOLÓGICAS	CLASIFICACIÓN FAB			SUBGRUPO P	CLASIFICACIÓN MIC								
	L1	L2	L3		TDT	HLA-DR	CD 19	CD 24	CD 10	CD 20	Rearreglo	Citopl. μ	Ig Membr
TAMAÑO DE LA CÉLULA	Predominan células pequeñas	Células de tamaño grande heterogéneo	Células de tamaño grande homogéneo	PRECURSOR ES-B TEMPRANOS	+	+	+	-	-	-	+	-	-
CROMATINA NUCLEAR	Homogénea en cualquier caso individual	Variable, heterogéneo en cualquier caso	Finamente punteada y homogénea	LLA COMÚN (CALLA)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
FORMA NUCLEAR	Regular, hendiduras o muescas ocasionales	Irregular, hendiduras y muescas comunes	Regular-oval a redondo	LLA PRE-B	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NUCLEOS	No visibles o pequeños e incóspicuos	Uno o más presentes, a menudo grandes	Prominentes, uno o más vesiculosos	LLA-B	-	+	+	+	-	+	+	-	+
CANTIDAD DE CITOPLASMA	Escaso	Variable, a menudo moderadamente abundante	Moderadamente abundante	LLA DE PRECURSOR TEMPRANO	TDT	CD 7	CD2 (RE)						
BASOFILIA DEL CITOPLASMA	Ligera o moderada, raramente intensa	Variable, intenso en algunos	Muy intensa	LLA-T	+	+	-						
VACUOLACIÓN CITOPLÁSMICA	Variable	Variable	A menudo prominente		+	+	+						

1.3 Genética molecular de la LLA

El estudio de las alteraciones en la genética molecular de la LLA ha permitido mayor avance en la comprensión de la fisiopatología de las leucemias, su pronóstico y la elección racional del tratamiento más adecuado. Los hechos que en general se relacionan con el desarrollo de la LLA son tres: la expresión aberrante de protooncógenos, las translocaciones cromosómicas que dan origen a genes de fusión que codifican cinasas activas y factores de transcripción alterados, y la hiperdiploidía, resultante en la presencia de más de 50 cromosomas.

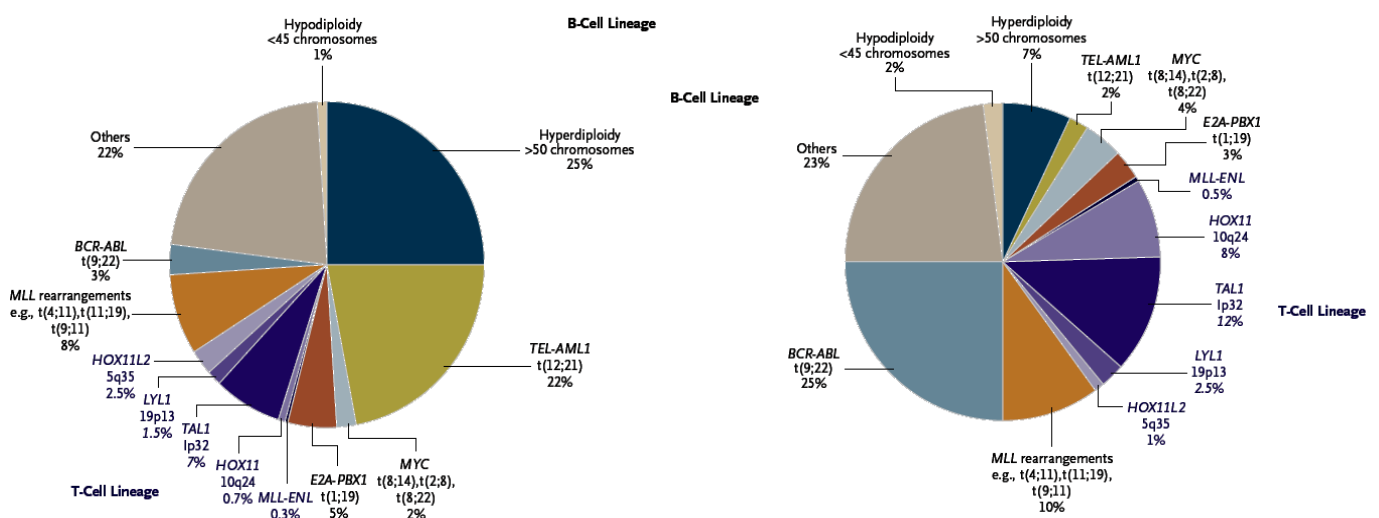
Se pueden demostrar cariotipos anormales en 50 a 60% de los casos de LLA (Ver Tabla4). Las anomalías parecen ser más comunes en la LLA-B y en la LLA común, que en la LLA-T. Se han descrito tanto hiperdiploidía como hipodiploidía. Los pacientes quienes tienen cifras cromosómicas mayores de 50 tienen un mejor pronóstico con remisión prolongada. Un cariotipo normal también se vincula con un mejor pronóstico. Los pacientes con anomalías numéricas o estructurales, o de ambos tipos, con cifras modales inferiores a 50, tienen un peor pronóstico. Cerca de 10 a 15% de los niños con LLA tiene el cromosoma Ph el cual se vincula con un pronóstico adverso. El subtipo FAB L3 se caracteriza por una translocación de 8 a 14, t(8;14). En particular las siguientes aberraciones se vinculan con un pronóstico adverso; t(9;22), t(8;14), t(4;11).¹¹

Tabla 4. Aberraciones cromosómicas estructurales no aleatorias en la LLA¹¹

Inmunofenotipo	Anormalidad Cromosómica	Genes Implicados
LLA de línea celular B	t(4;11)(q21;q23) t(5;14)(q31;q32)	IL-3, IgH
LLA células pre-B	t(1;19)(q23;p13)	prl, E2A
LLA célula B	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	c-myc, IgH c-myc, Igk c-myc, Igλ
LLA célula T	t(11;14)(p13;q11) t(1;14)(p34;q11) t(8;14)(q24;q11) t(10;14)(q24;q11) t(1;14)(p32;q11) t(14;14)(q11;q32) t(7;9)(q35-36;q34) t(7;14)(q35-36;q11) t(7;7)(p15;q11) t(7;14)(p15;q11) inv(14)(q11;q32) inv(14)(q11;q32)	tcl-2, TCRα TCRα c-myc, TCRα Tcl-3, TRCα TRCα TRCα TRCβ TRCβ TRCγ TRCγ TRCα
Variable	t(9;22)(q34;q11) del 9(p21-22)	c-abl, bcr if-α, if-β1

Las alteraciones genéticas descritas contribuyen a la transformación leucémica de la célula hematoprogenitora de la médula ósea o de su descendencia inmediata, se alteran así las funciones celulares más críticas; principalmente se aumenta el potencial de autorrenovación de manera ilimitada, o se impide la diferenciación celular y promueve la resistencia a las señales de apoptosis, todo lo cual contribuye a la supremacía y perpetuación de las células hematopoyéticas malignizadas.¹ En la figura 2 se muestran los porcentajes de estos rearrreglos, dependiendo del linaje o estirpe celular de la célula leucémica.

Fig. 2 Anormalidades cromosómicas recurrentes en LLA¹²



Las translocaciones y los reordenamientos genéticos resultantes han demostrado concluyentemente el significativo impacto de las anomalías citogenéticas en la respuesta clínica al tratamiento (Fig.2), pero tal vez sean por sí mismos insuficientes para causar la leucemia aguda; es probable que se requiera de un segundo grupo de mutaciones que alteran tanto la proliferación como la supervivencia de las células hematoprogenitoras malignizadas. En este grupo se encuentran la sobreexpresión del receptor FLT-3 de la cinasa de tirosina, y las proteínas que participan de forma colectiva en la vía del retinoblastoma, p53, p107 y p130, cuyo papel es controlar la entrada de las células al ciclo celular.¹²

1.4 Tratamiento

El tratamiento no solo tiene como objetivo mejorar la calidad y el tiempo de vida del paciente, sino también obtener la curación total de la enfermedad. Los fármacos utilizados en el tratamiento atacan a la célula leucémica de diferente forma, para ello se utiliza una combinación de medicamentos (quimioterapia combinada) que permite eliminar de manera gradual las células leucémicas en la mayor parte de los pacientes, para obtener una curación total. En condiciones óptimas esta curación puede lograrse en el 80% de los niños y hasta en 40% de los adultos que sufren de LLA.¹

Para planificar el tratamiento de la LLA se divide a los pacientes en categorías denominadas: riesgo bajo, riesgo habitual o intermedio, riesgo alto y riesgo extremadamente alto, basándose en los parámetros determinados al momento del diagnóstico. Los parámetros principales son: edad y número de leucocitos al diagnóstico, presencia del Antígeno Común de Leucemia Linfoblástica Aguda (CALLA), número de blastos totales al día 8 de tratamiento, infiltración a sistema nervioso central, citogenética y posteriormente al día 36 de tratamiento se valora la remisión morfológica completa (RMC), considerada como menos del 5% de blastos en médula ósea.¹³

El tratamiento se divide en las siguientes etapas fundamentales:

A) Inducción a la remisión: Consiste en quimioterapia múltiple combinada, se utilizan de 4 a 8 medicamentos de manera secuencial, los medicamentos utilizados son la Vincristina, Prednisona, Doxorubicina, Daunomicina, Mitoxantrona, Ciclofosfamida, Asparaginasa, 6-Mercaptopurina, Metotrexato y Etopósido, con el fin de reducir en un lapso de 4 semanas la cantidad de células leucémicas, de tal manera que ya no sean detectables en la médula ósea y en consecuencia los valores de BH y el estado clínico del paciente mejoren de forma notable.^{14, 15}

B) Consolidación/intensificación: Se pretende erradicar totalmente las células leucémicas residuales que hayan sobrevivido. Se administran diferentes esquemas que incluyen dosis altas de medicamentos no utilizados durante la inducción, como el metotrexato parental, o la administración de nueva cuenta del régimen de inducción.

C) Mantenimiento: Se administra diariamente 6-mercaptopurina y una vez por semana metotrexato por vía oral, además de terapia intratecal por 2 o 3 años. De manera periódica se puede suspender este tratamiento para administrar de nuevo los medicamentos iniciales: vincristina, prednisona, asparaginasa o antraciclinas.

D) Profilaxis al SNC en cada etapa: El objetivo es destruir las células que potencialmente se pueden o pudieron introducir al SNC, se administra quimioterapia intratecal (de 4 a 5 veces, cada 7 a 15 días) a partir de la primera o segunda semana después del diagnóstico, utilizando fármacos compatibles con el tejido nervioso como dexametasona, hidrocortisona, metotrexato o el arabinósido de citosina (ARA-C).^{1, 13} Si el paciente completa el tratamiento con éxito, se pasa a una etapa de vigilancia por un periodo mínimo de 2 años.

1.5 Pronóstico

Antes de 1960 podía esperarse que un paciente con diagnóstico de LLA muriera en unos cuantos meses. Con nuevas modalidades de tratamiento (especialmente terapéutica farmacológica combinada), los índices de remisión han mejorado de manera espectacular. La remisión se define como un periodo en el cual no hay signos clínicos ni hematológicos de la enfermedad.

Puede esperarse que el 97% de los niños y del 60% al 80% de los adultos con LLA alcancen un estado de remisión completa después de la terapia apropiada de inducción¹⁴⁻¹⁷, que del 50 al 70% de los niños y el 30% de los adultos presenten datos clínicos de infiltración leucémica si no se aplica la profilaxis al SNC^{18, 19}. Aproximadamente el 20% de los pacientes va a sufrir una recaída, en el primer año de vigilancia después de suspendido el tratamiento. Menos del 25% de los pacientes que recaen logran sobrevivir a largo plazo, si el paciente sobrevive sin recaídas durante 7 a 10 años después del diagnóstico se puede considerar técnicamente curado.¹⁶

La tasa de curación de la LLA en niños es la mejor entre todos los tipos de cáncer del ser humano. En la actualidad, aproximadamente el 75% de los niños entra en una remisión prolongada con un periodo indefinido de supervivencia, es decir, se curan de la enfermedad.²⁰

En Adultos con LLA la tasa de curación fluctúa entre el 25 al 40%. La mayoría de los pacientes recae, lo que explica el menor éxito que en la variedad de la infancia. Los

pacientes con una tasa muy alta de recaída (20%) tienen una mediana de supervivencia de 8 a 16 meses, por lo que es necesario intentar trasplante de células hematopoyéticas en este grupo de enfermos cuando se obtiene la primera remisión completa. Solo de 10 a 25% ha logrado una supervivencia de cinco años.^{1, 5}

Los pacientes con mal pronóstico en la LLA incluyen a quienes han pasado la pubertad y los lactantes, así como aquellos con cifras extremadamente grandes de blastos, quienes se presentan con el cromosoma Philadelphia y aquellos con afección extensa mediastínica o del SNC. En la Tabla 5 se enlistan ciertos factores que afectan el pronóstico (posibilidad de recuperación) y las opciones de tratamiento, clasificando a la situación de los pacientes en favorable (buen pronóstico) y desfavorable (mal pronóstico).^{13, 21}

Tabla 5. Indicadores clínicos y de laboratorio con valor pronóstico. ²¹		
Indicadores de Valor Pronóstico en LAL en Niños		
	Favorable	Desfavorable
Edad	1 – 10 años	<1, >10
Género	Femenino	Masculino
Magnitud y distribución de la carga tumoral		
Leucocitosis	<10 x 10 ⁹ /L	>50 x 10 ⁹ /L
Visceromegalia “masivas”	Ausente	Presente
Tumor mediastinal	Ausente	Presente
Infiltración testicular	Ausente	Presente
Infiltración renal	Ausente	Presente
Infiltración SNC	Ausente	Presente
Clasificación citomorfológica	FAB L1	FAB L2, L3
Clasificación inmunológica	LLA “precursor de célula B”	LLA Tipo “T”, “B”
Clasificación citogénica	Alteraciones numéricas Hiperdiploidía -50 Alteraciones estructurales (12;21)	Alteraciones numéricas Hiperdiploidía -46 Alteraciones estructurales t(9;22), t(4,11), t(1;19), t(8;14), t(11;14)
Respuesta al tratamiento de inducción	M0=M1 (-5% blastos en el día 14)	M0=M3 (-25% blastos en el día 14)
Estado nutricional al diagnóstico	Normal	Deficiente

Una herramienta útil para el seguimiento de los pacientes con LLA es la determinación de la Enfermedad Residual Mínima (ERM). Es posible detectar una célula maligna entre un millón de células normales al emplear qPCR o FISH, de una muestra de médula ósea. La detección de MRD durante la etapa de mantenimiento tiene un alto valor para predecir la recaída de la LLA.¹

2.1 Enfermedad Residual Mínima (ERM)

La medición del número de células anormales o leucémicas menor al 5%, es denominada enfermedad mínima residual (ERM), al finalizar la inducción a la remisión provee una medición directa de la respuesta de la LLA a la quimioterapia administrada. La determinación de ERM puede realizarse en todos los pacientes, teniendo como finalidad el complementar los factores pronóstico y el grupo de riesgo de recaída en médula ósea durante los 5 años posteriores al diagnóstico.⁵

Actualmente se sabe que la probabilidad de curar un paciente con leucemia aguda está relacionada con el volumen de la población neoplásica y que la rápida reducción del clon leucémico durante la fase inicial del tratamiento de inducción está correlacionada con largas supervivencias.²² Las estrategias clínicas habituales que se utilizan en el manejo de estos pacientes no permiten conocer en la totalidad de los casos el estado de la población neoplásica. En el momento del diagnóstico la mayoría de pacientes con leucemia presentan un número de células neoplásicas superior a 10^{12} .²³ Alcanzan la remisión cuando tras el tratamiento con quimioterapia o tras un trasplante, el número de células blásticas en la médula es menor al 5%, siempre desde el punto de vista morfológico observados en el microscopio óptico. Sin embargo pacientes en remisión morfológica todavía pueden presentar del orden de 10^{10} células leucémicas.

Cómo se comportan estas células residuales en el curso de la enfermedad, si fluctúan, disminuyen o permanecen estables tras la terapia de consolidación o si otros factores, como la respuesta inmunológica, pueden afectar al tamaño de la población residual, son cuestiones que actualmente son motivo de numerosos trabajos de investigación. Así, en los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías cuyos objetivos han sido: a) la detección, cuantificación y seguimiento de las células leucémicas residuales y b) determinar si los resultados obtenidos con las diferentes técnicas son predictivos de la evolución de la enfermedad, con el fin de poder diferenciar grupos de pacientes con diferente pronóstico que puedan beneficiarse de tratamientos más adecuados.⁵

Dependiendo de la semana de tratamiento en la cual se realiza la ERM, los valores de corte para determinar el riesgo de recaída son distintos. En cualquier momento del tratamiento la presencia de más de 0.01% de células de la leucemia se relaciona a un riesgo mayor de recaída. En cambio un nivel mayor de 1% al finalizar la inducción o más 0.1% a la semana 14 se relacionan con un peor pronóstico. El momento y la frecuencia para determinar la ERM, establecido por la mayoría de los protocolos, es durante o al

finalizar la inducción a la remisión, aunque en algunos estudios lo realizan en varias ocasiones durante el tratamiento o al finalizar el mismo.²⁴

2.2 Técnicas para la Detección de la ERM

Actualmente se están utilizando de forma rutinaria cuatro metodologías para la detección y el seguimiento de la ERM en pacientes con leucemias (Ver Tabla 6)

- El estudio citogenético para detectar alteraciones cromosómicas clonales específicas de las células leucémicas
- La FISH para detectar alteraciones cromosómicas y reorganizaciones génicas específicas de las células leucémicas, tanto en metafase como en interface.
- La citometría de flujo para detectar inmunofenotipos aberrantes que son característicos de un particular clon leucémico.
- Y diversas estrategias de amplificación de ácidos nucleicos (PCR, q-PCR) para detectar reorganizaciones génicas específicas de las células leucémicas.

Tabla 6. Métodos para la detección de la ERM en la leucemia aguda y crónica				
Técnica	% Casos estudiados	Sensibilidad relativa	Ventajas	Desventajas
Citogenética	> 75%	10^{-1}	- Detecta células leucémica in situ - Si existe marcador, seguimiento de la mayoría de pacientes - Cuantitativo	- Poca sensibilidad - Requiere células en división
FISH	> 40%	10^{-1} - 10^{-4}	- Detecta marcadores específicos - En metafase e interface - Rápido - Cuantitativo	- Relativa poca sensibilidad
Citometría de flujo	> 50%	10^{-2} - 10^{-4}	- Rápido - Relativa sensibilidad - Cuantitativo	- Existencia de subpoblaciones leucémicas - Cambio de fenotipo con la progresión de la enfermedad
Amplificación por ácidos nucleicos (PCR, q-PCR)	> 40%	10^{-4} - 10^{-6}	- Rápido - Alta sensibilidad - Cuantitativo	- Que no exista marcador (60% de leucemias)

- 1) El porcentaje de pacientes estudiados en cada caso depende del tipo de enfermedad y del marcador específico que se estudie.
- 2) Cada técnica tiene una sensibilidad intrínseca que varía en función de la precisión de la metodología empleada y de la variable estudiada.
- 3) La sensibilidad de la técnica de FISH está en función de los marcadores que se estudien, el análisis con una única sonda nos da una sensibilidad del 1% mientras que con tres sondas llega a 10^{-4}

- 4) En la mayoría de los laboratorios de seguimiento de las reorganizaciones génicas mediante PCR y qPCR de una visión cualitativa sobre la presencia o no de la ERM. Recientemente se ha desarrollado la PCR cuantitativa que permite realizar un seguimiento cuantitativo y la PCR a tiempo real que disminuye los problemas de contaminación.

2.2.1 Análisis Citogenético

El análisis citogenético da una amplia información estableciendo el espectro de aneuploidías y cambios estructurales cromosómicos que se producen en las células de la mayoría de las formas aguda y crónica de leucemia. Si tenemos en cuenta que estas alteraciones cromosómicas recurrentes aparecen en el 80 al 90% de los niños con leucemia aguda,^{25, 26} se entiende que el estudio citogenético pueda utilizarse en el seguimiento de la mayoría de los pacientes con Leucemia. Por otro lado, la principal ventaja de esta técnica es que identifica la célula leucémica sin problemas de ambigüedad ni de contaminación. En la mayoría de los estudios realizados, la desaparición del cariotipo anómalo del clon leucémico coincide con la remisión clínica (morfológica) del paciente. Ya en 1971, Hart et al., estudiaron una serie de nueve pacientes, ocho con LMA y uno con LLA, observando que todos los pacientes que recaían presentaban las mismas alteraciones cromosómicas observadas al diagnóstico.²⁷ Más recientemente en 1992, Freireich et al, estudiaron una serie de 71 pacientes afectos de LMA, en 20 de ellos detectaron el cariotipo anómalo presente al diagnóstico y todos recayeron durante las 78 semanas siguientes al estudio sugiriendo la utilidad del estudio citogenético para predecir la recaída. Sin embargo, 25 de los 51 pacientes restantes recayeron sin que se observara el cariotipo inicial, indicando que la no detección del clon original no garantiza remisiones durables.²⁸

La eficacia de esta técnica también parece estar relacionada con el tipo de progresión de la enfermedad que se estudia, siendo especialmente útil, en el seguimiento. La utilización de qPCR, para detectar la reorganización BCR-ABL específica de la LMC, aunque es muy sensible, no presenta una relación estrecha con la probabilidad de recaída, ya que pacientes con persistencia de PCRs positivas no necesariamente recaen.^{29, 30} Por lo cual, el estudio citogenético desempeña un papel pronóstico importante porque detecta anomalías adicionales que son indicativas de la progresión de la enfermedad, sin embargo, tiene limitada su eficacia en el seguimiento de la ERM debido a la baja sensibilidad que presenta. Requiere células en división y por tanto la sensibilidad está en función de la tasa de división celular y del número de metafases que se estudian; con el análisis de 20 metafases la sensibilidad de la técnica se estima en un 10%, y con el análisis de 45 metafases aumenta hasta el 5%. Por lo tanto ha sido necesario desarrollar

técnicas que permitan aumentar el número de metafases evaluables o bien que no requieran células en división.

2.2.2 Técnicas de Hibridación in situ Fluorescente

La FISH es una técnica molecular muy versátil e informativa. Puede utilizar desde sondas que hibridan con toda la superficie del cromosoma (Pintado cromosómico), como sondas que hibridan con regiones concretas del cromosoma (Ej.: las sondas centroméricas de DNA satélite- α específicas para cada cromosoma), o sondas que hibridan sobre la secuencia de un gen (sondas de secuencia única. Ej.: la sonda para la reorganización BCR-ABL). Permite estudiar desde cambios cromosómicos numéricos a reorganizaciones génicas, tanto en metafase como en interface, ya que no es imprescindible disponer de células en división.

La sensibilidad de la técnica depende del tipo y número de sondas que se utilicen. Kasprzy y Secker-Walker, (1997) demostraron que utilizando una única sonda centromérica para la detección de trisomías, la sensibilidad era de alrededor del 1%; sin embargo si se detectaban varias trisomías (en casos de LLA con hiperdiploidías) aplicando sondas para 3 cromosomas simultáneamente la sensibilidad aumentaba a 10^{-4} .³¹ Nylund et al (1994), utilizaron la técnica FISH con sondas centroméricas para detectar cambios cromosómicos numéricos en interface y en metafase en siete pacientes afectados de LMA en remisión; en tres detectaron cariotipos anómalos y dos de ellos acabaron recayendo. Los pacientes que presentaron una FISH negativa (cariotipo normal) se mantuvieron en remisión. Sin embargo, en cinco pacientes afectados de LLA la FISH resultó ser menos informativa: todas las muestras examinadas fueron FISH negativas y sin embargo recayeron dos pacientes.³² White et al (1995) estudiaron 13 niños afectados de LLA con hiperdiploidías, detectando la ERM en cinco pacientes en remisión, en cuatro al cabo del mes de finalizar el tratamiento y en tres persistía en controles sucesivos; sin embargo, la correlación con la evolución de la enfermedad no fue significativa.³³

El Rifai et al, (1997) utilizaron la técnica de pintado cromosómico para estudiar la ERM en 25 pacientes con LLA; establecieron la sensibilidad de la técnica analizando 2000 metafases en 14×10^{-4} con un límite de confianza de 0.95. Sin embargo, aunque esta técnica puede ser aplicada para la detección de trisomías y translocaciones, en el estudio de las monosomías no es informativa ya que la tasa de falsos positivos está entre un 5% y un 10% de las células analizadas. Detectaron la ERM en 13 de los 25 pacientes estudiados, seis de ellos mostraron un aumento en más de un 1% de células residuales antes de la recaída clínica. El resto, que presentaron entre un 0.5% y un 0.8% de las

células residuales, se mantenían en remisión. En 12 de los 25 pacientes estudiados no se detectó la EMR pero dos pacientes recayeron.³⁴

Zhao et al, (1995) utilizaron la librería cromosómica del cromosoma 17 para detectar la t(15;17) en 10 pacientes afectados de leucemia promielocítica en remisión. Detectaron la translocación en tres pacientes entre uno y dos meses antes de la recaída clínica coincidiendo con los resultados obtenidos por PCR.³⁵

La FISH también permite detectar translocaciones en interface utilizando sondas de secuencia única, como por ejemplo las sondas específicas que hibridan sobre los genes BCR y ABL marcadas con dos fluorocromos distintos y que permiten visualizar la t(9;22) en la LMC.³⁶ Sin embargo la sensibilidad de la técnica está limitada por el porcentaje de falsos positivos en linfocitos normales, que es del 5%. Amiel et al, 1994, estudiaron la EMR en 11 pacientes, cinco de ellos trasplantados, alcanzando un nivel de detección de la reordenación de un 1%. En los cinco pacientes trasplantados detectan una FISH positiva durante los tres meses post-transplante.³⁷ Sinclair et al, 1997, reducen la tasa de falsos positivos de reordenamientos BCR-ABL en linfocitos normales al 0.14%. Estos autores utilizan además de las sondas BCR (marcadas de color verde) y ABL (marcada de color naranja), la sonda ASS (marcada de color azul) correspondiente al gen de la argininosucinato sintetasa localizado junto al gen ABL en el cromosoma 9. Así una célula positiva no solo debe presentar la colocalización BCR-ABL (verde/naranja) sino además la colocalización (naranja/azul).³⁸ Recientemente, Dewald et al, 1998, describen una nueva técnica, Double (D)-FISH, que permite visualizar además de la reorganización BCR-ABL sobre el cromosoma 22, la recíproca ABL-BRC sobre el cromosoma 9; reduciendo los falsos positivos al 0.079%.³⁹

Una de las principales desventajas de esta técnica es el background o ruido de fondo, aunque se evita cada vez más con la mayor especificidad de los protocolos y las sondas que suministran las casas comerciales.

Actualmente se están desarrollando técnicas que combinan la técnica FISH con la citometría de flujo y la incorporación de la bromodeoxiuridina (FACS/FISH/BUdR). Las diferentes subpoblaciones celulares se separan mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales, y se analizan mediante FISH aquellas que presentan el mismo inmunofenotipo observado al diagnóstico, a la vez que la incorporación de la BUdR permite saber la capacidad proliferativa de las células leucémicas. Esta técnica permite detectar tres células leucémicas de entre 10^5 células normales, aumentando notablemente la sensibilidad de la FISH.⁴⁰

2.2.3 Citometría de Flujo

Las células hematopoyéticas presentan en la superficie y en el citoplasma un conjunto de antígenos (inmunofenotipo), cuya expresión está regulada durante la hematopoyesis y que suele ser característico de cada tipo celular. Las células leucémicas, salvo raras excepciones, no presentan antígenos específicos que las diferencien de las células normales. Sin embargo estudios paralelos realizados en muestras de individuos sanos y de pacientes con leucemias agudas, han puesto de manifiesto la existencia en las células leucémicas de múltiples aberraciones antigénicas con respecto a los patrones fenotípicos detectados en las células normales.⁴¹ Si conocemos el perfil antigénico aberrante (inmunofenotipo aberrante) de las células leucémicas al diagnóstico, podemos utilizarlo como guía en el seguimiento de la ERM.

Si se marcan las células con una combinación de anticuerpos monoclonales (entre tres y cuatro diferentes), mediante el análisis de citometría de flujo, podemos identificar los diferentes patrones fenotípicos aberrantes que nos permitirán poder detectar las células leucémicas residuales. La sensibilidad de la técnica es de 10^{-3} analizando 30,000 células nucleadas y su eficacia dependerá de la combinación de antígenos que se utilice.⁴²

Farahat et al, 1998 estudiaron 53 pacientes afectados de LLA-B, utilizando una combinación de antígenos TdT con CD10 y CD19. En 6 de 9 pacientes que recayeron detectaron la expresión de los antígenos entre las 5 y 15 semanas antes de la recaída morfológica, 43 pacientes permanecieron en remisión sin detectarse la ERM en ninguno de ellos. A su vez, encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre ambos grupos para la SLE.⁴³ Ciudad et al, 1998 estudiaron 53 niños afectados de LLA en remisión citomorfológica, utilizando un gran panel de anticuerpos monoclonales en triple combinación para detectar las aberraciones fenotípicas y subpoblaciones celulares presentes al diagnóstico. Los mismos autores discriminaron un grupo de pacientes con peor pronóstico que serían aquellos que presentaron después de la terapia de inducción un nivel de ERM superior a 1×10^{-3} . Un año después los mismos autores estudiaron 45 pacientes afectados de LLA-B, como estrategia para la detección de la ERM analizaron la presencia de un aumento en la frecuencia de células B inmaduras (CD34+/CD19+ ó CD20-/CD34+) o la existencia de un asincronismo madurativo y demostraron que la detección de la ERM era indicativa de una tasa alta de recaída y de corta supervivencia ($p < 0.01$).^{44, 45}

La principal ventaja de esta técnica es que no presenta falsos positivos. Sin embargo, sigue mostrando falsos negativos debido a que se producen cambios fenotípicos constatados en las recaídas leucémicas.⁴⁶ Por lo tanto es importante determinar el máximo de posibilidades fenotípicas aberrantes al diagnóstico, de manera que estos cambios no afecten a al menos alguna de ellas. Una importante proporción de cambios fenotípicos se relaciona con la presencia de subpoblaciones leucémicas minoritarias (la

incidencia de subpoblaciones oscila alrededor del 45% en LLA de linaje T y alrededor del 24% en la LLA de linaje B). Así, dentro del clon leucémico pueden aparecer células positivas y negativas para un mismo antígeno. La identificación de las subpoblaciones leucémicas es importante para la búsqueda de células leucémicas residuales, ya que la recaída puede ocurrir en una subpoblación menos representada que sea altamente resistente a la quimioterapia.

2.2.4 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR y qPCR

La presencia de alteraciones cromosómicas en neoplasias hematológicas se describieron por primera vez durante la década de los 60. A partir de entonces se pensó que estas alteraciones cromosómicas podrían ser la base etiológica de la neoplasia. En 1983 Rowley, observó que los puntos de rotura de las translocaciones frecuentes en las leucemias, coincidían con la localización de un oncogén celular. Posteriores investigaciones han descubierto que alrededor de una translocación cromosómica pueden producirse diferentes eventos. Por un lado se puede producir la desregulación de un oncogén y por otro lado crearse un gen nuevo directamente envuelto en el proceso de la leucemogénesis.⁴⁷

Actualmente, está establecido que las translocaciones contribuyen al proceso de leucemogénesis induciendo una alteración en la activación de un gen, que en la mayoría de los casos se trata de factores de transcripción.

Se han descrito dos métodos de activación⁴⁸:

- El primer método se da en las LLA de células B maduras y en las LLA de células T. Consiste en la yuxtaposición de un gen de las inmunoglobulinas (Ig) o de los receptores de las células T (TCR) con el oncogén c-MYC localizado en 8q24 o con otro oncogén putativo. En este caso el punto de rotura se produce fuera del oncogén, de manera que c-MYC puede colocarse a un extremo u otro del gen de las Ig o de los TCR, de tal forma que el promotor de estos provoca la activación de c-MYC, cuya transcripción provoca la desregulación de la transcripción y del ciclo celular.
- El método más habitual que se produce en la mayoría de las leucemias, consiste en la activación de un oncogén putativo creado a partir de la rotura de dos genes normales, seguida de una yuxtaposición inapropiada. El resultado es un gen quimérico, resultante de la fusión de los exones de ambos genes, cuya transcripción esta regulada por el promotor de otro gen. Generalmente la expresión de este gen quimérico da lugar a un factor de transcripción anómalo que inicia la desregulación del ciclo celular.

La técnica de PCR permite detectar estas reorganizaciones génicas, ya que si conocemos las secuencias adyacentes al punto de rotura de ambos genes, podemos utilizarlas como iniciadores para amplificar el gen quimérico resultante. La técnica es muy sensible detectando una célula leucémica entre 10^{-5} – 10^{-6} células normales.

Si a la hora de diseñar los iniciadores que flanquean la región translocada, éstos están separados por una secuencia de DNA relativamente corta (no más de 600 pares de bases), podemos amplificar directamente el DNA; la técnica es más fácil de realizar con menos problemas de degradación del ácido nucleico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los iniciadores separan secuencias de DNA largas que contienen exones e intrones, de manera que es mejor amplificar el DNA complementario a partir del RNA mensajero (RT-PCR), en el que a través del proceso de empalme alternativo se han eliminado la mayoría de secuencias no codificantes. Trabajar con RNA presenta más dificultades por los problemas de degradación del material y de contaminación.

Las técnicas de PCR y qPCR se han utilizado en el campo de la ERM, sobre todo en el seguimiento del transcrito BCR-ABL en pacientes con LMC o LLA, en el seguimiento del transcrito PML-RAR α en pacientes con LMA tipo M3, y en el seguimiento del transcrito AML1-ETO en pacientes con LMA tipo M2. También se ha estandarizado la técnica para el seguimiento del transcrito CBF β -MYH11 en pacientes con LAM tipo M4⁴⁹, y para el seguimiento de los reordenamientos donde está implicado el gen MLL en leucemias agudas con alteraciones en 11q23.⁵⁰ Por otro lado, se han estandarizado las técnicas para el seguimiento de la ERM mediante la detección de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células T (TCR) en pacientes con LLA.⁵¹

El reordenamiento BCR-ABL ha sido el más estudiado. En un principio, los estudios por PCR no cuantitativa, aunque eran muy sensibles, presentaban falsos positivos y se consideraban predictivos de recaída bien cuando se producía un cambio de una PCR Ph- a Ph+ o bien cuando en controles sucesivos persistía una PCR Ph+. Esta situación también se podía producir incluso en periodos prolongados durante los cuales el paciente se encontraba en remisión morfológica sin presentar evidencia de recaída. Recientemente, Radich et al, 1995, estudiaron una serie de pacientes con LMC utilizando la qPCR demostrando que la recaída estaba relacionada con la detección o no de una PCR positiva; así el 42% de los pacientes con una PCR Ph+ recaían mientras que solo lo hacían el 3% de los pacientes con una PCR Ph-, además con una probabilidad menor a 0.001. Sin embargo los mismos autores seguían encontrando casos donde existía una persistencia de PCR+ sin estar relacionada con la recaída del paciente.⁵² Recientemente, los mismos autores, estudiaron 36 pacientes trasplantados afectados de LLA Ph+ y demostraron que el tipo de gen quimérico BCR-ABL detectado post-trasplante estaba

relacionado con el riesgo de recaída; 7 de los 10 pacientes que expresaron el transcrito BCR-ABL codificante para la proteína p190 recayeron, mientras que de los 8 pacientes que expresaron el transcrito BCR-ABL codificante para la proteína p210 sólo recayó 1.⁵³ En este sentido Serrano et al, 2000, estudiaron 55 pacientes con LMC trasplantados y observaron que la recaída citogenética estaba precedida por la detección del transcrito codificante para la p190.⁵⁴

La técnica de qPCR tiene una sensibilidad que oscila entre 10^{-3} y 10^{-4} y permite diferenciar entre grupos de pacientes con diferente pronóstico.

En la LLA la detección de la ERM mediante qPCR se realiza utilizando como marcadores los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células T que se producen en la mayoría de LLA de linaje B y de linaje T, respectivamente. Mediante esta técnica, van Dongen et al, 1998 realizaron el seguimiento de la ERM en 240 niños afectados de LLA, realizaron una qPCR en diferentes momentos del tratamiento. Estos autores llegaron a la conclusión de que el riesgo de recaída era significativamente tres veces mayor en los pacientes que presentaron un nivel de detección de ERM igual o inferior a 10^{-4} ; al mismo tiempo asociaron la persistencia de la ERM al final del tratamiento a un mal pronóstico.⁵⁵

Aunque las técnicas de PCR y qPCR son muy sensibles para la detección de la ERM, presentan una serie de problemas a considerar. Se pueden obtener falsos positivos por problemas de contaminación del DNA, especialmente cuando amplificamos una translocación utilizando los mismos iniciadores y sondas para diferentes casos. Problemas que deben solucionarse utilizando máximas condiciones de esterilidad durante la manipulación y procesamiento de las muestras. Por otro lado, en el caso de utilizar transcritos de RNA puede ser que la mayoría de las células neoplásicas con una translocación cromosómica no expresen en correspondiente RNA, como ocurre en las células madre progenitoras en la LMC.⁵⁶ O que aunque lo expresen sea realmente difícil obtenerlo intacto, debido a que se degrada fácilmente, como ocurre con el transcrito PML-RAR α .

3.1 Búsqueda de Nuevos Biomarcadores en Pacientes con Leucemia, mediante Estudios Genómicos de Alto Rendimiento

Actualmente los esfuerzos para el estudio de las leucemias se enfocan en la búsqueda de marcadores biológicos, específicos, rastreables en todos los pacientes y cuantificables con metodologías accesibles a la mayoría de los laboratorios; que determinen el comportamiento clínico de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

Como ya se describió anteriormente la ERM en LLA se ha monitoreado a través de alteraciones cromosómicas como translocaciones frecuentes en oncogenes, pero estudios realizados nos han demostrado que un solo marcador no es suficiente para generar un fenotipo global, por lo que actualmente se busca encontrar un grupo de biomarcadores, genes rastreables por su nivel de expresión y aplicables como factores pronóstico, mediante herramientas genómicas de alto rendimiento.

Uno de los primeros trabajos en los que se analizaron perfiles de expresión génica por medio de microarreglos fue el desarrollado por Yeoh Eng-Juh, et al. (2002), en el cual se analizaron 360 muestras de pacientes con LLA mediante microarreglos de expresión, observando que el patrón de expresión de 20 genes coincidió con los hallazgos citogenéticos E2A-PBX1, BCR-ABL, TEL-AML1, arreglos MLL e hiperdiploidías cromosómicas >50, por lo que mediante el análisis de patrones de expresión se podía estratificar y clasificar a los paciente con LLA.⁵⁷

Kohlman A, et al. (2003) analizó los perfiles de expresión con microarreglos de alta densidad (12,000/22,000 genes) 25 pacientes con LLA y 65 con LMA de recién diagnóstico, todos los casos habían sido previamente caracterizados de manera individual por morfología, análisis citogenéticos, inmunofenotipo y por genética molecular, el perfil de expresión de un grupo de genes diferencialmente expresados fue suficiente para discriminar 8 subgrupos relevantes en los pacientes con LLA. Las aberraciones cromosómicas y características inmunofenotípicas de cada paciente correlacionaron estrictamente con el patrón de expresión de los genes, AML correlaciono con t(8;21), t(15;17), t(11q23)/MLL, o inv(16) así como para los precursores LLA-B con t(9;22), t(8;14), o t(11q23)/MLL y precursores LLA-T. Estos datos confirman la posible aplicación de la tecnología de microarreglos para la clasificación de la LLA.⁵⁸

Willenbrock H, et al (2004) analizaron en 45 niños daneses con LLA la expresión génica al momento del diagnóstico por medio de microarreglos de expresión U133A+B, observando 29 genes sobre expresados CD19, CD3, CD74, TPP53, los cuales son potenciales marcadores para la predicción de la ERM.⁵⁹

En el 2005, Kuchinskaya et al. Compararon los perfiles de expresión por microarreglos Hu95ver2a entre 29 muestras de niños y 15 de adultos con LLA de reciente diagnóstico, observando que no existían diferencias en el perfil de expresión entre niños y adultos, ambos eran muy similares, aunque el análisis de los patrones de expresión permitió reclasificar algunas muestras en el grupo citogenético adecuado.⁶⁰

Flotho, et al (2006), analizaron la expresión de genes en linfoblastos, en muestras de 189 niños con LLA al diagnóstico y compararon los resultados con los niveles de ERM en los días 19 y 46 de inducción a la remisión. Se encontró que el gen CASP8AP2 estaba significativamente asociado con ERM, por lo que la medición de la expresión de este gen

al diagnóstico, permite identificar a aquellos pacientes cuyas células leucémicas son altamente susceptibles a quimioterapia.⁶¹

Más recientemente Mulligan CG, et al (2007) Identificaron mediante análisis de SNPs y secuenciación, en 242 muestras de pacientes con LLA al diagnóstico, delección y sub-expresión del gen PAX5 en LLA-B y su metilación en LLA-T, siendo este gen el blanco más frecuente de mutaciones somáticas en el 31.7% de los casos. Las delecciones fueron también encontradas en los genes TCF3 (E2A), EBF1, LEF1, IKZF1 (IKAROS) y IKZF3 (AIOLOS). Los resultados sugieren la directa interrupción de la vía de señalización que controla el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B en LLA, así como también demuestra el poder de las herramientas genómicas de alto rendimiento para la identificación de lesiones moleculares en cáncer.⁶²

Así mismo Martin SB, et al. (2007) Identificaron mediante microarreglos de expresión en 311 pacientes pediátricos con LLA al diagnóstico, sobre-expresión del gen OPAL1 como predictivo de respuesta favorable.⁶³

Tabla 7. Genes seleccionados por diferentes investigadores, después de estudios genómicos de expresión

INVESTIGADOR/AÑO	TAMAÑO DE MUESTRA	RESULTADOS
Yeoh Eng-Juh, et al. 2002	327 pacientes	Patrón de expresión de 20 genes; coincide con hallazgos citogenéticos (TEL/AML1, BCR/ABL, etc)
Kohlman, A et al. 2003	10 pacientes	Sobre-expresión de 4 genes: TRB, CD3D. MME y CTGF
Willenbrock H, et al 2004	23 pacientes	29 genes sobre-expresados: CD19, CD3, CD74, TP53,etc.
Kuchinskaya, E. et al 2005	242 pacientes	No existen diferencias en el perfil de expresión entre niños y adultos
Holleman A, et al. 2006	437 pacientes	Sobre-expresión de OPAL1 no es constante en LLA de buen pronóstico
Martin SB, et al. 2007	311 pacientes	Identifican sobre-expresión de OPAL1 como predictivo de respuesta favorable
Mulligan, CG. et al 2007	242 pacientes	Identificaron delección y sub-expresión de PAX5 en LLA-B; metilación en LLA-T. Comprueban papel en leucemogénesis.

Si analizamos con detalle los datos anteriores obtenidos por diferentes investigadores, podemos observar que en todos los trabajos realizados, se seleccionan uno o varios genes principales, útiles para la clasificación o predicción de recaída. Con el inconveniente que ninguno de estos genes o grupos de genes son comunes entre los trabajos realizados, lo que nos indica la gran variabilidad que existe en la selección y clasificación del grupo de estudio y el abordaje del problema. Por otro lado, ninguno de estos trabajos se realizó con muestras de los mismos pacientes tomadas a diferentes

tiempos de la evolución de la enfermedad para analizar la variación en la expresión de esos genes a lo largo de la enfermedad y determinar si estos podían correlacionarse con recaídas, lo cual sería de gran utilidad para el seguimiento de la ERM.

Por lo anteriormente descrito, lo que nos propusimos en nuestro trabajo fue realizar estudios genómicos amplios de análisis de número de copias y de análisis de expresión, utilizando plataformas de microarreglos, en un grupo de sujetos bien caracterizados con LLA, con cariotipo, inmunofenotipo y cuenta de leucocitos. Derivados de estos estudios se seleccionaron un grupo de biomarcadores y éstos se validaron mediante qPCR en muestras de pacientes con LLA tomadas a diferentes tiempos durante la evolución de la enfermedad en cada uno de los pacientes en estudio.

4.1 Antecedentes Directos de este Trabajo

Como parte de un proyecto mayor titulado Búsqueda de Biomarcadores Útiles en el seguimiento de la Enfermedad Residual Mínima en pacientes con Leucemia, se derivó el primer proyecto para la “Búsqueda de regiones genómicas crípticas en pacientes con LLA”, en el cual se buscaron regiones genómicas crípticas propensas a sufrir alteraciones subcromosómicas en 16 muestras de DNA de pacientes con LLA de diagnóstico reciente y sin tratamiento previo, para identificar posibles regiones asociadas a marcadores genéticos para el seguimiento y la evolución de la enfermedad. Previa selección de las células blásticas las muestras se analizaron por hibridación genómica comparativa en microarreglo de 287 clonas de BACs de genes relacionados al cáncer, GenoSensor Array 300, Vysis/Abbott y por análisis de intensidad de hibridación con un microarreglos de SNP (500,000 SNP), GeneChip Human Mapping 500k (Affymetrix). Como resultado se observaron múltiples alteraciones en cada una de las muestras. Con la técnica BAC-CGH se encontraron 271 alteraciones: 153 ganancias (56.5%) y 118 pérdidas (43.5%). En 31 casos de ganancias y 24 de pérdidas se observaron regiones de alteraciones consistentes. Con el microarreglo de SNPs se encontraron 141,269 alteraciones: 84,347 ganancias (60%) y 56,922 pérdidas (40%) de material genético. Las regiones de alteraciones comunes por el microarreglo de SNP fueron 1q12, 5p11, 6q13.3, 7p13, 7q11.21, 7q34, 8p23.1, 9p21.3, 9p11.2, 14q11.2, 14q32.33, 15q11.1 y 16p11.2. El análisis de los resultados con ambas técnicas muestra seis regiones con alteraciones comunes: 6q16.3, 6q23.3, 9p21.3, 9p11.2, 12q13.3 y 14q32.33. Estas albergan algunos genes supresores de tumor y genes relacionados con el control del ciclo celular.

Se observó una disminución en el número de copias de las regiones 6q16.3 (GRIK2) y 9p21 (CDKN2A), lo cual concuerda con reportes previos; sin embargo no se observó la pérdida del gen PAX1 (9p13.2) que también había sido reportada como asociada a LLA.

En este trabajo se encontraron 2 regiones, 9p21 y 6q16.3 que pueden ser candidatos a marcadores por encontrarse como pérdidas consistentes entre las muestras analizadas.⁶⁴

Recientemente se desarrolló un segundo proyecto de investigación titulado “Análisis de perfiles de expresión génica en LLA” en el cual se buscaron genes marcadores que pudieran ser utilizados para determinar el pronóstico y para el monitoreo de la ERM; para ello se utilizaron 11 muestras de pacientes con LLA de reciente diagnóstico a los cuales se les midieron los niveles de expresión de un grupo de genes involucrados con leucemia por medio de microarreglos (HG U133 Plus 2.0) y los que se encontraron expresados significativamente se validaron en 48 muestras de pacientes con LLA de reciente diagnóstico por qPCR. Se identificaron 46 genes diferencialmente expresados al comparar pacientes con LLA de linaje T y B; 3 genes diferencialmente expresados al comparar niños y adultos; 263 genes al comparar niños y adultos con LLA-T, y 529 al comparar niños y adultos con LLA-B.

No se identificaron genes expresados diferencialmente al comparar pacientes de acuerdo al riesgo de recaída: alto y habitual. Se vio alterada constantemente la vía Wnt- β Catenina, destacando su alteración en la vía del desarrollo del sistema hematológico. Se confirmó la subexpresión significativa de PAX5, AP1B1 y PLCG2 en LLA-T; la expresión de los genes CDKN2A y OPAL1 fue muy heterogénea y no se asoció a ninguna variable estudiada.

Los genes WBP5 y SNK1LK mostraron sub-expresión significativa tanto en niños como en adultos. Los genes FLT3 y RGS1 mostraron subexpresión en pacientes con hiperdiploidía y Ph+. El gen DEFA1-3 mostró subexpresión únicamente en el grupo de pacientes con alto riesgo de recaída; mientras que los pacientes con riesgo habitual solamente mostraron sobreexpresión, además de algunos pacientes de alto riesgo. Se identificó la expresión diferencial de los genes AP1B1, PLCG2, WBP5, ASNF1LK, RGS1 y DEFA1-3.⁶⁵

5.1 JUSTIFICACIÓN

El objetivo principal en el tratamiento de la LLA es el establecer una terapia enfocada a cada paciente, con la finalidad de distinguir aquellos pacientes con mayor índice de curación y que requieren de un tratamiento menos intenso, de aquellos que por su situación de riesgo alto requieren de un manejo especial y de un tratamiento más agresivo.

La enfermedad residual mínima (ERM), la cual se refiere a la medición del número de células anormales (células positivas para marcadores asociados a leucemia en médula ósea) al finalizar la inducción a la remisión, provee una medición directa de la respuesta de la leucemia al tratamiento administrado, siendo un indicador importante para considerar la respuesta temprana o tardía de la enfermedad, y una herramienta de valor pronóstico para predecir la incidencia de recaídas y ELE tanto en los pacientes pediátricos, adolescentes y adultos.

Actualmente la ERM en LLA se ha monitoreado a través del seguimiento de ciertas alteraciones genéticas como lo son la detección de anepluoidías, cambios estructurales cromosómicos y numéricos, aberraciones antigénicas de superficie, y translocaciones, pero estas alteraciones son marcadores aislados cuyo seguimiento no es suficiente para generar un fenotipo global de la enfermedad, además de ser solo útiles para un grupo pequeño de pacientes que comparten esa alteración en particular, ya que en la mayoría de los pacientes con LLA existe una gran variabilidad genética. Actualmente no existen biomarcadores que permitan el seguimiento de la ERM en todos los pacientes con LLA

El interés por encontrar nuevos marcadores útiles en el seguimiento de la enfermedad se ha acelerado al contar con las nuevas metodologías genómicas que permiten análisis de cientos de genes en un solo ensayo. Sin embargo, los estudios iniciales muestran una gran variabilidad en los resultados obtenidos. Varios trabajos proponen nuevos biomarcadores (aún no validados en otras poblaciones) útiles en el seguimiento de la ERM, pero la mayoría de éstos son útiles para clasificar pero no adecuados para seguimiento ó pronóstico

La mayoría de la información en la literatura está enfocada a LLA de la infancia, lo reportado en los adultos toma valores de corte distintos a los utilizados en pacientes pediátricos, por lo cual no pueden aplicarse en este grupo de edad. Aún encontrando estas diferencias, se reporta en un análisis multivariado que la evaluación inmunológica

de la EMR al día +35 de tratamiento fue el parámetro pronóstico de mayor relevancia en pacientes adultos con LLA, y junto con la edad, leucocitos al diagnóstico y presencia de cromosoma Filadelfia positivo, representa la combinación de variables más representativa de permanecer sin recaídas. Parámetros que no fueron considerados en los trabajos realizados.

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la búsqueda de un grupo de marcadores biológicos, mediante metodologías genómicas de alto rendimiento. El proyecto actual consiste en la validación de los marcadores obtenidos de los proyectos anteriores. De manera que en este estudio se validaran los marcadores seleccionados, en muestras de pacientes a distintos tiempos de evolución de la enfermedad.

Junto con los marcadores seleccionados en nuestros estudios, se incluirán algunos marcadores referenciados por otros grupos de investigación, para determinar si estos también pusieran ser útiles en nuestro grupo de pacientes.

Esto con el objetivo final de seleccionar un grupo de biomarcadores específicos, rastreables por su nivel de expresión en todos los pacientes y cuantificables con metodologías accesibles a la mayoría de los laboratorios; que idealmente permitan determinar el comportamiento clínico de la enfermedad, la respuesta al tratamiento, y que sean aplicables como factores pronóstico mediante su monitoreo en la ERM a un más bajo costo.

6.1 OBJETIVOS

6.1.1 Objetivo General:

Validar en una población de sujetos con LLA, un grupo de genes seleccionados mediante estudios genómicos, para determinar su utilidad como biomarcadores para predecir recaída, progresión y/o respuesta al tratamiento en ERM.

6.1.2 Objetivos Específicos:

1. Estandarizar el análisis cuantitativo de los posibles biomarcadores de interés en líneas celulares y sujetos sin leucemia.
2. Valorar la expresión de los posibles biomarcadores en muestras sucesivas de seguimiento de pacientes con leucemia.
3. Correlacionar la expresión de los posibles biomarcadores con la progresión de la enfermedad, y seleccionar los biomarcadores útiles para la medición de la ERM.
4. Caracterizar molecularmente los biomarcadores seleccionados.

7.1 Diseño del Estudio

Experimental, Longitudinal, de Seguimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Estrategia Experimental

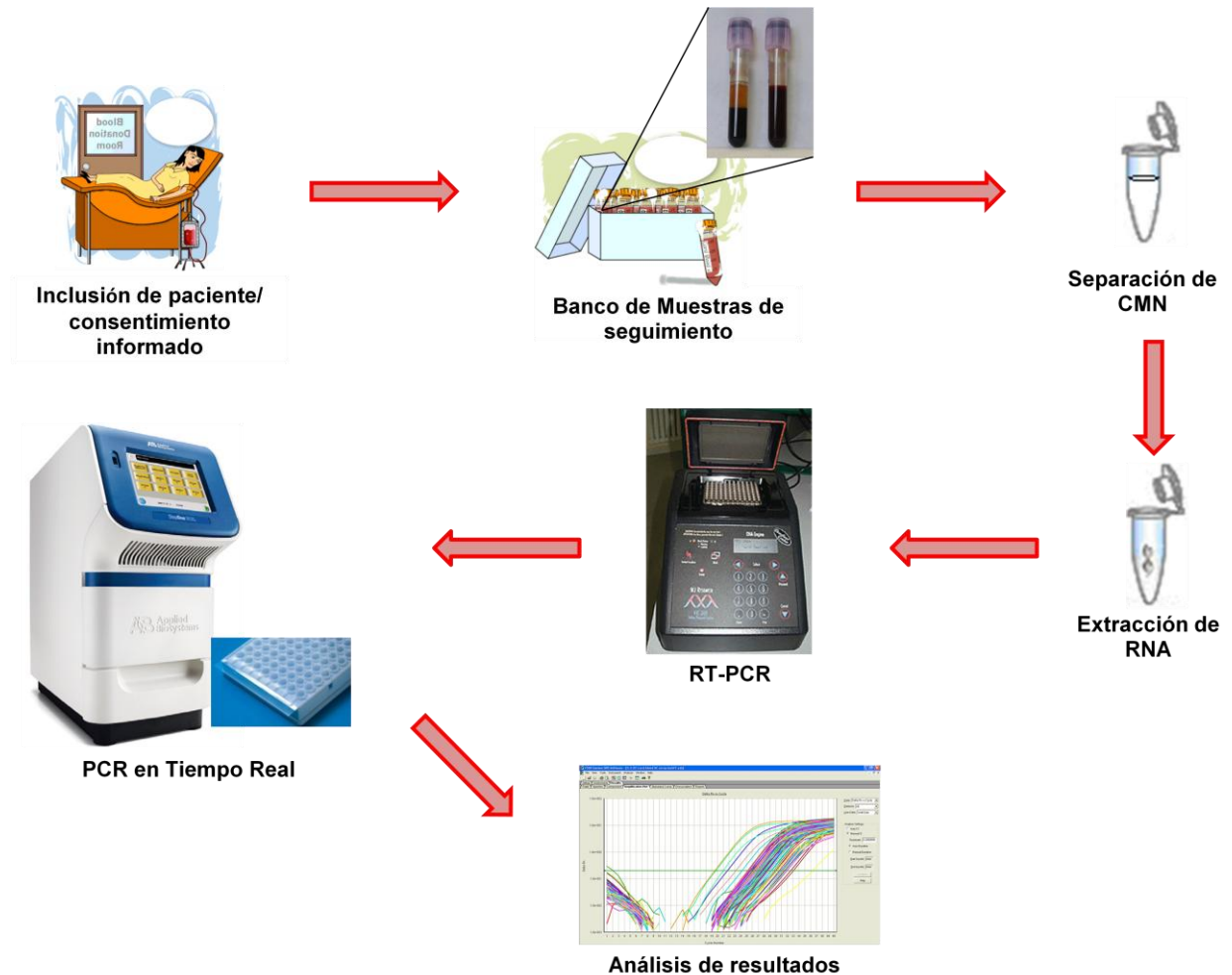


Fig. 3. Estrategia general. En ésta figura se esquematiza el proceso que se siguió en la realización de este proyecto. A partir de muestras de sangre periférica tomadas a diferentes tiempos y recolectadas de pacientes con LLA que accedieron a participar en el estudio, se separaron células mononucleares, a las cuales se les extrajo RNA total, obteniéndose a partir de este el cDNA, el cual sirvió como templado para evaluar el nivel de expresión de un grupo de genes por medio de qPCR, una vez obtenidos los resultados se analizaron por diferentes métodos estadísticos.

8.2 Origen de los reactivos

Los reactivos utilizados para la separación de células mononucleares, el Histopaque®-1077, el BSA (Bovine Serum Albumin), el PBS (Phosphate Buffered Saline) y el DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO EE.UU). El EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium dihydrate) fue adquirido de

USBiological (Swampscott, MA EE.UU). El RNAlater® fue adquirido de Ambion (Austin, TX EE.UU).

El material plástico como las puntillas con filtro de diferentes volúmenes y los tubos con rosca de 1.5, 15 y 50mL fueron adquiridos de Corning Inc. (Corning, NY, EE.UU).

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy® Mini Kit de QIAGEN® (Germantown, MD EE.UU).

Para la reacción de retrotranscripción se utilizó el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, el cual fue adquirido al igual que los cebadores, el agua DEPC tratada (Certified DNase/RNase free) y la Agarosa Ultra Pura™ de Invitrogen™ (Carlsbad, CA EE.UU)

Los reactivos utilizados para las reacciones de PCR convencional fueron adquiridos de Promega (Madison, WI EE.UU) y de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK).

Los reactivos utilizados para las reacciones de qPCR (FG, Fast optical _ - well Rxn Plate de 48, 96 y 384 pozos y las FG, _-well optical adhesive film para placas de 48 y 96 pozos) y de secuenciación (kit BigDye® terminator versión 3.1) fueron adquiridos de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK), el ExoSap-IT para purificación de productos de PCR fue adquirido de USB Corporation (Cleveland, OH, EUA).

8.2.1 Equipo

Se emplearon micropipetas de diferentes rangos Eppendorf Research (Camibh Göttingen, Alemania), micropipetas electrónicas multicanal y monocanal de diferentes rangos Labnet International, Inc. (Woodbridge, NJ EE.UU), un Vortex Maxi Mix II modelo M37615 de Barnstead International (Dubuque, IO EE.UU), un espectrofotómetro Nanodrop, modelo ND-1000 UV/Vis (Wilmington, DE EE.UU), una campana de PCR CBS Scientific Co. (Del Mar, CA EE.UU), un termociclador MJ Research modelo PTC-100 (Watertown, MA EE.UU), un termociclador de gradiente MJ Mini BioRad modelo PTC 1148 (Hercules, CA EE.UU), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), un horno de microondas General Electric modelo MOM-015 (Fairfield, CA EE.UU), una cámara de electroforesis Fotodyne Inc (Hartland, WI EE.UU), una fuente de poder PowerPac BioRad (Hercules, CA EE.UU), un fotodocumentador de geles UVP Mini Darkroom modelo M-26 (Upland, CA EE.UU) una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C (Camibh Göttingen, Alemania), una microcentrífuga refrigerada LabNet modelo Hermler Z300K (Gosheimerser, Alemania), termocicladores de tiempo real: un StepOne Real-Time PCR System 48 W. y un 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied

Biosystem (Warrington, WA, UK) y un analizador de secuencias ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (4 Capilares) de Applied Biosystem (Warrington, WA, UK).

8.2.2 Programas

La captura de datos y de la tesis se realizó en una computadora HP Pavilion dv2000, con el Office XP de Microsoft. Para el diseño de los iniciadores se utilizaron los programas Primer Express 2.0, Primer Premier 5, Beacon Designer 7. Para la visualización y análisis de los productos amplificados por tiempo real se utilizaron los programas StepOne Software v2.0, SDS2.2.2, SigmaPlot 11.0, MiniTab® 15.1, Bioconductor R2.7.1. Para la visualización y análisis de secuencias se utilizaron los programas Chromas, GeneStudio™, ClustalW y Blast. Para la búsqueda de Información se utilizó la página de Internet del Nacional Center for Biotechnology Information (NIH, MD EE.UU).

8.3 Origen de las muestras

8.3.1 Sujetos de Estudio

Para este estudio se invitaron a participar a pacientes que acudieron al Servicio de Hematología del Centro Universitario contra el Cáncer (CUCC) durante el periodo de Septiembre 2006 a Febrero 2008, con diagnóstico de LLA y que no hubieran recibido tratamiento. Para establecer el diagnóstico, los pacientes se estudiaron y clasificaron mediante pruebas estándares de laboratorio clínico realizadas en el CUCC: morfología celular, pruebas citoquímicas e IFT. Una vez diagnosticados, los pacientes con LLA les fue explicado el estudio y se les invitó a participar en él, con la correspondiente firma de la carta de consentimiento informado. En caso de menores de edad, los estudios se realizaron con el consentimiento de los padres o tutores. También se solicitó la participación voluntaria de un grupo de 6 sujetos adultos clínicamente sanos. El protocolo de investigación fue evaluado por el Comité de Ética de la Institución previo al inicio de la toma de muestras; siendo aprobado con el número de registro: BIO5-006.

8.3.2 Criterios de Inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de LLA que acudieron al servicio de Hematología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" en el periodo de Septiembre 2006 a Febrero 2008 y que aceptaron participar en el estudio.
- No haber comenzado con el tratamiento.

8.3.3 Criterios de Exclusión:

- Pacientes con tratamiento iniciado o que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes que abandonaron el estudio (excluyendo deceso).

8.3.4 Criterios de Eliminación:

- Cantidad de muestra insuficiente.
- Calidad deficiente en toma, transporte o almacenamiento de muestra.

8.4 Toma de Muestras:

De cada sujeto de investigación se obtuvieron los datos clínicos y una muestra de (5mL) de sangre periférica, de la cual se trató con el anticoagulante EDTA. La sangre con EDTA se almacenó inmediatamente a 4°C y fue la que se utilizó para la extracción de RNA total. Inmediatamente después de la toma de muestra, y en un periodo de tiempo menor a una hora se comenzó el procesamiento de las muestras, con la finalidad de obtener lo más intacto posible al perfil de expresión génica.

8.5 Procesamiento de la muestra

8.5.1 Separación de células mononucleares

- 1) Agregar 3mL de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®) a un tubo cónico de 15mL, y esperar a que alcance la temperatura ambiente.
- 2) Cuidadosamente colocar por encima del Histopaque®-1077 de 3 – 5mL de sangre periférica total, o médula ósea, con un pipeteador automático. Centrifugar a 1000rpm durante 30 minutos a 20°C. No centrifugar a temperaturas inferiores para evitar la aglomeración de células y una pobre recuperación. Emplear un rotor Swing-Out.
- 3) Después de la centrifugación, aspirar cuidadosamente con una pipeta Pasteur la interfase opaca que contiene las células mononucleares, y transferir a un nuevo tubo cónico de 15mL.
- 4) Agregar 10mL de buffer de lavado (PBS + 0.1% BSA + 2mM EDTA, en agua DEPC) a 4°C y mezclar 10 veces por inversión. Centrifugar a 1000rpm durante 10 minutos y 4°C.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla de células mononucleares en 5mL de buffer de lavado. Centrifugar nuevamente a 1000rpm durante 10 minutos y 4°C.
- 6) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla de células mononucleares en 1mL de Buffer de lavado.

8.5.2 Extracción de RNA total

En este paso se procedió de acuerdo a las instrucciones descritas por el estuche RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®). Los pasos fueron los siguientes:

- 1) Centrifugar por 5 minutos a 5000rpm una alícuota de las células mononucleares preservadas en RNAlater. Una vez formada la pastilla eliminar la mayor cantidad posible de líquido sobrenadante, ya que afectara la extracción, obteniendo un bajo rendimiento.
- 2) Agregar buffer RLT (para lisar las células) y mezclar muy bien hasta disolver la pastilla y cualquier agregado de células. Agregar 350uL a $\leq 5 \times 10^6$ de células, y 600uL si son entre 5×10^6 y 1×10^7 de células. Asegurarse que el lisado obtenido no sea muy viscoso; de ser así, agregar un mayor volumen de buffer RLT según lo requiera.
- 3) Agregar un volumen de etanol al 70% y mezclar por pipeteo. 350 o 600ul dependiendo del volumen inicial de RLT.
- 4) Transferir un máximo de 700uL de la mezcla del paso 3 a una columna RNAeasy; cerrar la tapa y centrifugar por 15 segundos a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el eluido. Si el volumen de mezcla es mayor a 700uL, agregar el resto de la muestra en la misma columna y repetir la centrifugación.
- 5) Agregar 700uL de buffer RW1, cerrar la tapa de la columna y centrifugar por 15 segundos a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el eluido.
- 6) Agregar 500uL de buffer RPE a la columna. Cerrar la tapa de la columna. Centrifugar por 15 segundos a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el eluido.
- 7) Repetir el lavado anterior con 500uL de buffer RPE. Cerrar la tapa de la columna y centrifugar por 3 minutos a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el eluido.
- 8) Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 1.5mL, libre de RNAsas. Agregar directamente de 20-25uL de agua libre de RNAsas, directamente sobre la membrana. Cerrar la tapa de la columna. Incubar un minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm).
- 9) Tomar el eluido y agregarlo nuevamente a la columna y centrifugar nuevamente por 1 minuto a máxima velocidad ($\geq 10,000$ rpm). Recuperar el eluido ya que en el se encuentra el RNA.
- 10) Cuantificar y almacenar el tubo etiquetado a -80°C .

8.5.3 Preparación del cDNA

A partir del RNA total extraído para cada muestra, se sintetizó el cDNA para cada una de ellas siguiendo las instrucciones descritas por el estuche SuperScript™ III First-Strand

Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™). El siguiente procedimiento esta diseñado para convertir desde 1pg a 5ug de RNA total:

- 1) Mezclar y centrifugar brevemente cada componente antes de usarse.
- 2) Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0.2 o 0.5mL:

Componente	Cantidad
Primers (Random hexamers 50ng/uL)	1 uL
Annealing Buffer	1 uL
RNA total (5ug)	6uL
H ₂ O libre de RNasa/DNasa	
	Vol. Final: 8uL

- 3) Incubar el tubo con la mezcla de reacción en un termociclador a 65°C por 5 minutos, e inmediatamente poner en hielo por 1 minuto. Centrifugar el tubo brevemente.
- 4) Añadir los siguientes componentes estando el tubo en hielo:

Componente	Cantidad
2X First-Strand Reaction Mix	10uL
SuperScript™ III/ RNaseOUT Enzyme mix	2uL
	Vol. Final: 12uL

- 5) Vortexear la muestra brevemente para mezclar, y colectar por centrifugación breve. Incubar en el termociclador como lo indica el siguiente programa:
 - 25°C por 12 minutos
 - 50°C por 50 minutos
 - 85°C por 5 minutos
 - 4°C por ∞
- 6) Almacenar el cDNA sintetizado a -20°C.

8.5.4 Cuantificación del cDNA

- 1) Se preparo un blanco de cDNA siguiendo el protocolo descrito en el punto anterior de preparación de cDNA, solo que al preparar la mezcla 1 del paso 2, no se incluyeron los primers (random hexamers) hasta al final del paso 5, así de esta manera se obtuvo una solución que tenía todos los reactivos de la reacción de retrotranscripción excepto el cDNA sintetizado.
- 2) El blanco de cDNA se utilizo como blanco para cuantificar el cDNA sintetizado de cada una de las muestras. La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

8.5.5 Diseño de los Iniciadores

- La secuencia de los iniciadores utilizados para cada gen a analizar fue descargada del Primer Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Los iniciadores de los genes que no se encontraban en dicha página fueron diseñados en los softwares Primer Express 2.0 y Beacon Designer 7. La secuencia de todos los iniciadores utilizados se encuentran en la Tabla 8

Tabla 8. Iniciadores utilizados para el análisis de los genes por qPCR

Gen	GenBank	Descripción	Secuencia (5'-3') oligonucleótido		Tm °C	Amplicon	Primer Bank
CCR5	NM_000579	Receptor 5 de citocinas (C-C motif).	Fw	AGGGCTGTGAGGCTTATCTTC	61.3	150	4502639a1
			Rv	CACCTGCATAGCTTGGTCCA	61.9		
IL10	NM_000572	Precursor de Interleucina 10, factor inhibidor en la síntesis de citocinas.	Fw	ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC	62.3	111	10835141a1
			Rv	TCACATGCGCCTTGATGTCTG	63.0		
WNT5A	NM_003392	Familia Wingless con sitio de integración tipo MMTV	Fw	ATGGCTGGAAGTGCAATGTCT	62.0	107	4507929a1
			Rv	ATACCTAGCGACCACCAAGAA	60.3		
FZD3	NM_017412	Receptor frizzled 3	Fw	TTGACTGTGTTTCATGGGGCAT	62.0	140	8393378a1
			Rv	GCTGCTGTCTGTTGGTCATAATG	61.7		
CTNNB1	NM_001904	Beta catenina (proteína asociada a caderina)	Fw	GCTACTCAAGCTGATTTGATGGA	60.4	120	4503131a1
			Rv	GGTAGTGGCACCAGAATGGATT	62.0		
GSK3B	L33801	Glicogen 3 beta sintasa quinasa	Fw	CGAGGAGAACCCAATGTTTCG	61	296	529237a1
			Rv	GGTCGGAAGACCTTAGTCCAAG	61.7		
JNK	NM_002750	Proteín quinasa 8 mitogeno activada	Fw	AGCAAGCGTGACAACAATTTTT	60.1	175	4506095a1
			Rv	GAAATGGTCGGCTTAGCTTCT	60.1		
SOS1	NM_005633	sevenless homologo 1	Fw	AAGAGGAAGCGAAGAAACCCT	61.1	221	15529996a1
			Rv	TCAGCACACATTGCCACTTTAAT	61.0		
BCL11A	AF080216	Proteína dedos de zinc en LLC de linaje B y linfoma 11A	Fw	CTCTCCCAGATGTGAACCGAG	61.7	263	12150278a1
			Rv	TTGCATTGTTTCCGTTTGTGC	60.8		
JAK2	NM_004972	Proteína tirosincinasa (Janus quinasa 2)	Fw	GTATCCACCCAACCATGTCTTC	60.4	103	4826776a1
			Rv	GTTGCTGCCACTGCAATACC	61.9		
STAT5	NM_003152	Transductor de señales y activador transcripcional 5A	Fw	GGTGCAGAGTCCGTGACAG	62.3	107	21618342a1
			Rv	ACAGGTAGGGACAGAGTCTTC	60.0		
JUN	NM_002228	Dominio Jun activador de unión a proteína	Fw	TGGAAACGACCTTCTATGACGA	60.8	242	4758616a1
			Rv	GTTGCTGGACTGGATTATCAGG	60.4		
BCL2A1	AY234180	BCL2 relacionada con la proteína variante A1	Fw	AACTTCTACGACAGCAAATTGCC	61.6	130	29691301a1
			Rv	TTGTGCCATTTCCCCCAGC	62.9		

OPAL1	NM_017787	Proteína hipotética FLJ20154	Fw	ATGCCTTTCCTTTTGGGTCTTAG	60.5	243	33563366a1
			Rv	CAGGTTGATTCATGTTGCCG	60.1		
IL2RA	K03122	Precursor del receptor para interleucina 2	Fw	GGGGACTGCTCACGTTTCATC	62.6	72	307047a1
			Rv	GGATCTCTGGCGGGTCATC	61.6		
CCND2	NM_001759	Ciclina D2 G1/S específica	Fw	CTACCTTCCGAGTGCTCCTA	63.0	163	4502617a1
			Rv	CCCAGCCAAGAAACGGTCC	62.9		
RXRA	U66306	Receptor alfa para retinoides	Fw	CTTCGGTTTTCCGAGCACG	61.4	149	3411009a1
			Rv	CAGGGACACCAGCCGACTA	63.0		
PDE4D	NM_006203	Fosfodiesterasa 4D, cAMP-específica	Fw	GATTGTGACTCCATTTGCTCAGG	61.4	251	32306513a1
			Rv	AGGCCATCTCACTGACGGA	62.3		
STAT1	NM_007315	Transductor de señales y activador transcripcional 1 isoforma alfa	Fw	ATGTCTCAGTGGTACGAACCTCA	61.0	107	6274552a1
			Rv	TGTGCCAGGTAAGTCTGATT	60.8		
CD10	NM_000902	Membrana metalo-endopeptidasa	Fw	GATCAGCCTCTCGGTCCTTG	61.7	134	4505203a1
			Rv	TGTTTTGGATCAGTCGAGCAG	60.3		
CREB1	AY347527	Elemento de unión a proteína 1 en respuesta a cAMP	Fw	CCAGCAGAGTGGAGATGCAG	62.3	86	33694240a1
			Rv	GGGCTAATGTGGCAATCTGTG	61.3		
FOS	NM_005252	Oncogén homólogo al FBJ osteosarcoma murino viral	Fw	CGGGCTCAACGCAGACTA	62.0	147	4885241a1
			Rv	GGTCCGTGCAGAAGTCCTG	62.3		
CYLD	NM_015247	cilindromatosis (síndrome turban tumor)	Fw	TCAGGCTTATGGAGCCAAGAA	60.9	129	14165258a1
			Rv	ACTTCCCTTCGGTACTTTAAGGA	60.4		
RAPGEF2	AL117397	Factor (GEF2) intercambiador del nucleotide guanine Rap	Fw	GTTATGGTGAAAGAACACCGAGA	60.2	183	5911917a1
			Rv	CACCTCCATTGGGCTAGAAAGAA	60.2		
SORT1	NM_002959	Receptor 3 de neurotensinas, preproteína sortilin 1	Fw	TGATCTCAGAGGCTCAGTATCC	60.2	212	17149834a1
			Rv	CAGGACCAATAGCCATGCCAA	62.5		
HK2	NM_000189	Hexoquinasa 2	Fw	GAGCCACCACTCACCCACT	62.8	130	15553127a1
			Rv	ACCCAAAGCACACGGAAGTT	62.3		
S100A8	NM_002964	S100 proteína de unión a calcio A8	Fw	TGATAAAGGGGAATTTCCATGCC	60.6	65	21614544a1
			Rv	ACACTCGGTCTCTAGCAATTTCT	61.1		
DOCK10	AB014594	Proteína KIAA0694	Fw	AAAGACCTACCGAATGATCCT	60.3	184	6683721a1
			Rv	CACATGCCACTGGGAACATAAA	60.3		
MYH9	AL832639	Cadena pesada 9 de miosina	Fw	GAGCTGGCAAGACGGAGAAC	62.8	282	30268331a1
			Rv	CTTCCTTGGCTTGGCGGATA	62		
PAPD5	AL833922	Dominio conteniendo 5 asociado a PAP	Fw	GTGTTTGGGAAGTGGGAGAAC	60.8	67	21739473a1
			Rv	CGACTTTGTGTTTCCGAAGAGC	61.9		
CD2	NM_001767	Antígeno 2 del linfocito	Fw	TGGACTTGATCAACACAACCC	60.2	112	4502653a1
			Rv	GTGTGATGACCCTCTGAGAAAG	60.0		
CD3D	NM_000732	Antígeno CD3D, polipéptido delta (complejo TiT3)	Fw	GCCTGGTACTGGCTACCCT	62.7	116	4502669a1
			Rv	CGTCCCTCTACCCATGTGATG	62.1		

CD8A	NM_171827	Antígeno de diferenciación de los linfocitos T	Fw	ATGGCCTTACCAGTGACCG	61.4	104	27886642a1
			Rv	AGGTTCCAGGTCCGATCCAG	62.9		
PBX1	BT006705	Factor de transcripción 1 en células leucémicas pre-B	Fw	CATGCTGTTAGCGGAAGGC	61.2	109	30582249a1
			Rv	CTCCAAGTGGTGTCTGAACC	60		
FAT	NM_005245	Homólogo 1 al supresor de tumor	Fw	GGGAGACATTTGGCTTTGCTC	61.5	185	4885229a1
			Rv	ATGTAAACACCCATCTTGACAGG	60.2		
NKG2-D	NM_007360	Receptor tipo lectina de la subfamilia K en las células NK	Fw	GAGTGATTTTTCAACACGATGGC	60.6	208	6679052a1
			Rv	ACAGTAACTTTCCGGTCAAGGGAA	61.4		
HOXA9	NM_152739	Proteína A9 isoforma a con homeodominio	Fw	TACGTGGACTCGTTCCTGCT	62.7	153	23097236a1
			Rv	CGTCGCCCTGGACTGGAAG	62.7		
CD44	X66733	Glicoproteína marcador de superficie	Fw	CCCTGCTACCAGTACGTCTTC	61.6	167	31191a1
			Rv	TGTGGTCAAAGCCCCTGG	62.8		
TNFRSF7	NM_001242	Receptor de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral	Fw	CAGAGAGGCACTACTGGGCT	62.9	114	4507587a1
			Rv	TGCAAGGATCACACTGAGCAG	62.3		
DEFA1	NM_004084	Defensina alfa 1	Fw	TCCCTTGCATGGGACGAAAG	62.2	111	4758146a1
			Rv	GGTTCCATAGCGACGTTCTCC	62.5		
NOTCH1	AK000012	Locus neurogénico notch asociado a proteína 1 (EG)	Fw	CACACACGGAGGCATCCTAC	62.3	119	7019819a1
			Rv	GCTGGAGCATCTTCTTCGGAA	62.1		
CASP8AP2	NM_012115	CASP8 asociada a protein 2	Fw	TCATAGCACTTCACTGCCAAAT	60.0	122	6912288a1
			Rv	GAGAACGTGACCAAACCCAT	60.5		
PAX5	NM_016734	Proteína activadora específica para linfocitos de linaje B	Fw	CAGCAGGACAGGACATGGAG	62.0	108	9951920a1
			Rv	CCTTGATGAGCAAGTCCACT	60.0		
FLT3	U82002	Tirosina quinasa 3 relacionada con FMS	Fw	TCAAGTGCTGTGCATACAATTCC	61.4	148	1764153a1
			Rv	AGCAGGGTTAAAACGACAATGA	60.2		
MYC	X00364	Proto-oncogen	Fw	GGGATCGCGCTGAGTATAAAA	60.0	174	312410a1
			Rv	GAAGCCCCTATTCGCTCC	61.9		
RPL13A	NM_012423	Proteína ribosomal L13a	Fw	CGAGGTTGGCTGGAAGTACC	62.2	121	6912634a1
			Rv	CTTCTCGGCCCTGTTCCGTAG	62.4		
HPRT1	NM_000194	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1	Fw	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	61.9	131	4504483a1
			Rv	AGACGTTCAAGTCCTGCCATAA	60.5		

8.5.6 PCR cuantitativa en tiempo real

La qPCR es un método que permite la cuantificación de manera absoluta o relativa de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. Esto permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación del blanco o diana dentro de un amplio rango de magnitud. El análisis de la curva de disociación del producto, posibilita además la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (TM).

8.5.7 PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-Array)

- 1) Se preparó en una placa de 96 pozos la mezcla de iniciadores (Forward y Reverse) para cada gen de interés de una manera ordenada. Cada iniciador en la mezcla estaba a una concentración de 5µM.

- 2) Con una micropipeta multicanal se colocaron 1uL de mezcla de iniciadores para cada gen a cada pozo de la placa, correspondiendo cada pozo a un gen diferente. Cada gen se evaluó por duplicado en la misma placa.
- 3) Se incluyeron 2 genes endógenos, los cuales fueron utilizados para la normalización de los resultados, y 2 controles negativos, uno que correspondía al control negativo de la reacción de retrotranscripción (NTC-RT) y un control negativo propio de la reacción de qPCR (NTC).

Fig. 4. Distribución de genes en la placa de reacción

Distribución de genes por placa

Duplicado de genes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CCR5	BCL11A	IL2RA	CYLD	CD2	NTC-RT	CCR5	BCL11A	IL2RA	CYLD	CD2	NTC
B	IL10	JAK2	CCND2	RAPGEF2	CD3D	TNFRSF7	IL10	JAK2	CCND2	RAPGEF2	CD3D	TNFRSF7
C	WNT5A	STAT5	RXRA	SORT1	CD8A	PAX5	WNT5A	STAT5	RXRA	SORT1	CD8A	PAX5
D	FZD3	JUN	PDE4D	HK2	PBX1	DEFA1	FZD3	JUN	PDE4D	HK2	PBX1	DEFA1
E	CTNNB1	BCL2A1	STAT1	S100A8	FAT	CASP8AP2	CTNNB1	BCL2A1	STAT1	S100A8	FAT	CASP8AP2
F	GSK3B	OPAL1	CD10	DOCK10	NKG2-D	NOTCH1	GSK3B	OPAL1	CD10	DOCK10	NKG2-D	NOTCH1
G	JNK	FLT3	CREB1	MYH9	HOXA9	RPL13A	JNK	FLT3	CREB1	MYH9	HOXA9	RPL13A
H	SOS1	MYC	FOS	PAPD5	CD44	HPRT1	SOS1	MYC	FOS	PAPD5	CD44	HPRT1

- 4) El mix para cada muestra se preparó de la siguiente manera:
Una vez cuantificado con un blanco el cDNA de la muestra, se hicieron cálculos para que en cada pozo de reacción (Vol. Final de 15uL) quedaran 10ng totales de cDNA, hecho el cálculo se tomaron dichos microlitros de cDNA, se colocaron en un tubo de 1.5mL, se agregaron 735uL de SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems y se completo con H2O libre de DNAsas/RNAsas hasta un volumen de 1372uL.
Se vortexeo y se centrifugo brevemente. Se repartieron 14uL del mix de la muestra a cada pozo de reacción de la placa, excepto a los controles negativos, los cuales se prepararon de manera individual agregándole al pozo de reacción del NTC-RT 7.5uL de SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems, 4.5uL de H2O libre de DNAsas/RNAsas y 1uL del control negativo de la reacción de retrotranscripción. Y el NTC de la reacción de qPCR se preparó agregándole 7.5uL de SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems, y 6.5uL de H2O libre de DNAsas/RNAsas.
- 5) La placa de 96 pozos se selló con un film óptico (FG, 96-well optical adhesive film de Applied Biosystem).
- 6) La placa sellada se vortexeo y se centrifugó a 3500rpm a 4°C por 1 minuto. Se protegió de la luz y se mantuvo almacenada a 4°C hasta su colocación en el equipo de qPCR.

- 7) En el termociclador de qPCR 7900HT Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystem, se introdujo el siguiente programa:

Temperatura	Tiempo	
95°C	10 min.	
95°C	15 seg.	40 ciclos
60°C	1 min.	
Agregar Curva de Disociación		
95°C	15 seg.	
60°C	15 seg.	
95°C	15 seg.	

- 8) Se corrió cada placa de cada muestra y se incluyó una placa de un grupo control sano, formado por 3 hombres y 3 mujeres sin leucemia a los cuales se les recolectó un tubo de EDTA de sangre periférica a cada uno, y se siguió el mismo procedimiento de procesamiento de muestra que para el resto de las muestras de pacientes con LLA, solo que al momento de hacer la reacción de retrotranscripción se hicieron cálculos para tomar cantidades iguales de cada uno de los seis RNAs y que al final nos quedaran 500ug de RNA total en la reacción. Este grupo control sano se tomó como referencia para hacer la segunda normalización en los cálculos de niveles de expresión de cada muestra por el método de $\Delta\Delta Ct$.
- 9) Al término de cada reacción se verificó que existiera un solo pico por reacción en los resultados de la curva de disociación.
- 10) Los resultados de Ct se exportaron en formato de Excel para la realización de los cálculos de niveles de expresión por el método de $\Delta\Delta Ct$.

8.6.0 Secuenciación del gen PAX5

La técnica de secuenciación esta basada en el método de terminación de cadena en el cual dideoxynucleótidos marcados con un compuesto fluorescente distinto pueden agregarse a la cadena creciente de DNA deteniendo la elongación de la cadena debido a la falta del grupo OH en el extremo 3'. Cada reacción proporciona la información de las posiciones de cada uno de los nucleótidos, pudiendo visualizar la secuencia de la cadena original completa por medio de un analizador de secuencias.

8.6.1 Diseño de los oligonucleótidos para los exones

Los oligonucleótidos para la secuenciación de los 10 exones del gen PAX5 fueron diseñados en los softwars Primer Express 2.0 y Beacon Designer 7, a partir de la secuencia del gen de pax5 reportada en el Ensembl (ID: OTTHUMG00000019907).

Tabla 9. Secuencia de Oligonucleótidos de los Exones de Pax5

Exón	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') del oligonucleótido	Valor E	TM (°C)	%GC	pb	producto
1	PAX5-1AF	ggagcggaggcttgaattattcc	1e-04	64	50	24	552pb
	PAX5-1AR	cacgaataccccacgagtataaaga	4e-05	59	44	25	
2	PAX5-2F	gtgccatttcgtttacattgaga	1e-04	61	42	24	653pb
	PAX5-2R	tcctcctgactaagtcaccctat	1e-04	58	50	24	
3	PAX5-3F	tcaaatgttcaaaagccgcatctg	1e-04	64	42	24	653pb
	PAX5-3R	gggacagcgacatttgaagatc	1e-04	64.7	50	24	
4	PAX5-4F	tacacagggaaacagaagcaaagt	1e-04	60.2	41.7	24	534
	PAX5-4R	ctttaattatctgacattctatagacc	3e-06	53.7	29.6	27	
5	PAX5-5F	gctggaatttaagcgaagcccttc	1e-05	70.5	50	26	706pb
	PAX5-5R	gcatatctgcacgcacacaggg	0.001	65.9	59.1	22	
6	PAX5-6F	cttgggaaaggcagtgacctacct	1e-04	64	54	24	602pb
	PAX5-6R	gcccgaagatcattacacctct	4e-05	63	48	25	
7	PAX5-7F	cttattctgccttgctttggttacg	3e-06	66.3	40.7	27	543pb
	PAX5-7R	aatcacatccaaacacaccaagaag	4e-05	60	40	25	
8	PAX5-8F	cattgcctagcctcccaagca	0.001	66	59	22	604pb
	PAX5-8R	tggccaacaaggcctgttgagtga	4e-05	69	52	25	
9	PAX5-9F	tacacatgtgagagtctgccattc	1e-04	59.4	45.8	24	603pb
	PAX5-9R	gaaatacaagttacacacaggtagg	0.009	54.8	40	25	
10	PAX5-10F	tagatggcgaagagcctcgaaat	4e-04	64	50	23	558pb
	PAX5-10R	tggatggatagtcagacagctggagg	1e-05	67.7	53.8	26	

8.6.2 Origen de las muestras

Las 12 muestras que se utilizaron para secuenciar los exones del gen de Pax5, fueron ADNs a los que previamente se les había realizado BAC-CGH y análisis de CNV por microarreglos de SNP.⁶⁴

Tabla 10. Descripción de las muestras seleccionadas.⁶⁴

Identificación	Edad (años)	Sexo	Inmuno fenotipo	Cariotipo
LLA-07	12	F	LLA-B común	46, XX (40%)/ hipodiploidía 32, XX (40%)/ hiperdiploidía 95, XX (20%)
LLA-12	8 m	M	LLA pro B	46, XY (80%)/ 92, XY (20%)
LLA-14	14	F	LLA-T	46, XX
LLA-15	6	F	LLA pro B	46, XX (70%)/ 39, XY (30%)
LLA-16	10 m	F	LLA pre B	46, XX, t (6;22) (p21;q11) (100%).
LLA-19	3	M	LLA-T	46, XY
LLA-22	40	F	LLA pre B	51,XX,+6,+8,+8,+12,+22,t(9,22) Phi +
LLA-24	43	M	LLA pro B	46,XY,-22,+mar
LLA-28	16	M	LLA-T	46, XY
LLA-29	18	M	LLA-T	46, XY (50%)/46, XY, del (6)(éter--□ 21?)
LLA-30	21	M	LLA-T	46,XY (80%)/ 92,XY (30%)
LLA-33	9 m	F	LLA-B común	45-44,XX,-1,-7,-9,-10,+19,+21, t(1:7)(q31:p22), t(1:11)(p31:p4),t(16:16) (p13.1:q22),+mar?[cp6] /44-46XX,-2,-9,-10, -13,18,+19,+21, del(11)(q23qter), t(16,16)(p13.1:q22)+2mar?[cp4]

8.6.3 Amplificación de los exones

La amplificación de cada exón se llevó a cabo con la enzima TaqGold de Applied Biosystem.

8.6.4 Purificación del Producto de PCR

Se purificaron los productos de PCR removiendo restos de primers y nucleótidos, por medio del reactivo ExoSap-IT, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1) El reactivo ExoSap se retiró de -20°C y se colocó en hielo durante el desarrollo del procedimiento.
- 2) En un tubo de 0.2mL se mezcló 14uL del producto de PCR con 5.6uL de ExoSap
- 3) Se incubó a 37°C por 15 minutos para degradar los primers y nucleótidos remanentes
- 4) Se incubó a 80°C por 15 minutos para inactivar al ExoSap-IT.
- 5) El producto de PCR ahora purificado se almacena a -20°C

8.6.5 Reacción de Secuenciación

- 1) Se mezclaron los componentes siguientes en un tubo de 0.2mL:

Componente	Cantidad
BigDye® terminator versión 3.1	2.1uL
Buffer 5X	2.9uL
Primers Forward o Reverse (0.16uM)	0.32uL
Producto de PCR purificado	3.5uL
Agua libre de nucleasas	1.18uL
	Vol. Final 10uL

- 2) Se incubó en un termociclador con el programa siguiente:

Temperatura	Tiempo	
96°C	1 min.	
96°C	10 seg.	25 ciclos
50°C	5 seg.	
60°C	4 seg.	
4°C	∞	

- 3) Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron con EDTA/ Etanol mediante el siguiente protocolo:
 - a. Al tubo de 0.2mL donde se encuentra el producto de PCR de la secuenciación, agregar 5uL de EDTA (125mM) y 60uL de Etanol (95%)
 - b. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos y centrifugar a 4000rpm por 30 minutos. Eliminar el Etanol
 - c. Agregar 60uL de Etanol (70%)
 - d. Centrifugar a 3850rpm por 15 minutos y eliminar el etanol

- e. Secar por 5 minutos
 - f. Resuspender en 13uL de Formamida e incubar a 95°C por 5 minutos.
- 4) Una vez resuspendidos los productos purificados de la reacción de secuenciación, éstos se analizaron en el equipo ABI PRISM® 3130 DNA Analyzer de Applied Biosystem.

9.0 RESULTADOS

9.1 Banco de Muestras

Se logró recolectar un banco de muestras con 218 pacientes, de los cuales: 99 pacientes se les recolectó muestra de sangre periférica en un tubo con EDTA al diagnóstico, otro al mes y otro a los tres meses de iniciado el tratamiento, los 120 pacientes restantes solo se les logró recolectar una muestra al momento del diagnóstico. Las muestras se recolectaron durante el periodo de Septiembre de 2006 a Febrero del 2008. En las tablas 11 y 12 se describe la distribución de las muestras:

Tabla 11. Distribución del banco de muestras

*Muestras banco UDM			Nuevos pacientes			Total pacientes	Total de muestras
30			69			99	294
1era	2da	3ra	1ra	2da	3ra		
Seguimiento			Seguimiento				

*Se contaba previamente con un banco de 30 muestras recolectadas al diagnóstico por lo que se les hizo el seguimiento a esos pacientes y se les terminó de recolectar el resto de las muestras.

El 70.40% de los pacientes fueron niños y 29.59% adultos, la distribución por sexo fue del 55.44% para el género femenino y del 44.56% para el género masculino, el 7.07% de los pacientes presentaron LLA de precursores de linaje T, y el 92.93% de linaje B.

Tabla 12. Distribución de los Pacientes

	Niños	Adultos	TOTAL
LLA-T	4	3	7
LLA-B	65	27	92
	70	29	99

Los 99 pacientes que contaban con las 3 muestras recolectadas (una al diagnóstico y dos de seguimiento) tuvieron en cada muestras una concentración $\geq 100\text{ng/uL}$, y una pureza cercana al 2.0 (de acuerdo al resultado de la relación 260/280 obtenida por espectrofotometría). Las características de dichas muestras se describen en la Tabla 13.

Tabla 13. Características de las muestras seleccionadas de pacientes con LLA

ID	SEXO	EDAD al DX	CUENTA LEUCOCITARIA DX	DX	RIESGO al DX
LLA-4	Femenino	3	19, 000	LLA-B	Habitual
LLA-6	Masculino	3	8, 000	LLA-B	Habitual
LLA-7	Femenino	12	115000	LLA-B	Alto
LLA-9	Femenino	3	4340	LLA-B	Habitual
LLA-15	Femenino	6	78000	LLA-B	Alto
LLA-17	Femenino	11	25200	LLA-B	Alto
LLA-18	Masculino	27	264	LLA-B	Habitual
LLA-20	Masculino	40	2, 700	LLA-B	Alto
LLA-21	Masculino	10	289000	LLA-T	Alto
LLA-23	Femenino	30	27000	LLA-B	Alto
LLA-24	Masculino	43	MAS DE 200,000	LLA-B	Alto
LLA-25	Femenino	12	2, 830	LLA-B	Alto
LLA-31	Masculino	4	13400	LLA-B	Habitual
LLA-39	Masculino	17	3, 000	LLA-B	Habitual
LLA-40	Masculino	10	3290	LLA-B	Alto
LLA-43	Femenino	7	11800	LLA-B	Habitual
LLA-44	Masculino	15	1900	LLA-T	Alto
LLA-49	Masculino	5	10000	LLA-B	Habitual
LLA-50	Masculino	10	45000	LLA-B	Alto
LLA-51	Masculino	5	2000	LLA-B	Habitual
LLA-53	Femenino	6	5490	LLA-B	Habitual
LLA-56	Femenino	8	47000	LLA-B	Habitual
LLA-57	Masculino	15	600	LLA-B	Alto
LLA-60	Femenino	3	500	LLA-B	Habitual
LLA-61	Masculino	19	15220	LLA-B	Habitual
LLA-64	Masculino	30	321000	LLA-B	Alto
LLA-66	Masculino	13	266000	LLA-B	Alto
LLA-67	Masculino	6	8,000	LLA-B	Habitual
LLA-69	Femenino	4	3600	LLA-B	Habitual
LLA-71	Masculino	6	1450	LLA-B	Habitual
LLA-72	Masculino	5	10370	LLA-B	Habitual
LLA-73	Femenino	4	21800	LLA-B	Alto
LLA-74	Masculino	7	6340	LLA-B	Habitual
LLA-75	Masculino	12	5230	LLA-B	Alto
LLA-77	Masculino	4	3500	LLA-B	Habitual
LLA-79	Masculino	10	4640	LLA-B	Alto
LLA-80	Femenino	16	2500	LLA-T	Alto
LLA-81	Masculino	21	3100	LLA-T	Alto
LLA-82	Femenino	15	13400	LLA-B	Alto
LLA-84	Masculino	4	4270	LLA-B	Habitual
LLA-86	Masculino	10	4510	LLA-B	Habitual
LLA-87	Masculino	20	970	LLA-B	Alto

LLA-88	Masculino	16	4250	LLA-B	Alto
LLA-89	Masculino	19	17010	LLA-B	Alto
LLA-90	Femenino	5	2350	LLA-B	Habitual
LLA-91	Masculino	16	2090	LLA-B	Alto
LLA-92	Masculino	3	2511	LLA-B	Habitual
LLA-93	Masculino	11	3230	LLA-B	Alto
LLA-94	Masculino	6	3580	LLA-B	Alto
LLA-95	Femenino	6	9110	LLA-B	Habitual
LLA-96	Masculino	6	7470	LLA-B	Alto
LLA-98	Femenino	35	16700	LLA-B	Alto
LLA-99	Femenino	25	2380	LLA-B	Alto
LLA-100	Masculino	35	270700	LLA-B	Alto
LLA-102	Femenino	11	4440	LLA-B	Alto
LLA-103	Femenino	9	2700	LLA-B	Alto
LLA-106	Femenino	12	3130	LLA-B	Alto
LLA-107	Masculino	5	4780	LLA-B	Habitual
LLA-109	Femenino	21	6980	LLA-B	Alto
LLA-110	Masculino	14	710	LLA-B	Alto
LLA-111	Masculino	37	33000	LLA-B	Alto
LLA-112	Masculino	21	3,100	LLA-T	Alto
LLA-114	Masculino	5	8350	LLA-B	Alto
LLA-115	Femenino	10	9,110	LLA-B	Habitual
LLA-116	Femenino	1	79510	LLA-B	Alto
LLA-118	Masculino	11	7930	LLA-B	Alto
LLA-120	Masculino	17	5200	LLA-B	Alto
LLA-122	Masculino	6	7870	LLA-B	Habitual
LLA-124	Masculino	18	730	LLA-B	Alto
LLA-126	Masculino	14	6800	LLA-B	Alto
LLA-127	Masculino	1	6400	LLA-B	Habitual
LLA-128	Femenino	3	2450	LLA-B	Habitual
LLA-129	Femenino	10	1800	LLA-B	Habitual
LLA-130	Masculino	2	3830	LLA-B	Habitual
LLA-131	Masculino	3	2100	LLA-B	Alto
LLA-132	Femenino	4	4520	LLA-B	Habitual
LLA-133	Masculino	10	3840	LLA-B	Alto
LLA-134	Masculino	22	13200	LLA-B	Habitual
LLA-137	Masculino	7	7900	LLA-B	Habitual
LLA-139	Femenino	6	8330	LLA-B	Alto
LLA-140	Masculino	14	4420	LLA-B	Alto
LLA-148	Femenino	20	6.67	LLA-B	Alto
LLA-149	Femenino	9	7060	LLA-B	Habitual
LLA-151	Femenino	8	4810	LLA-B	Alto
LLA-152	Masculino	41	2300	LLA-B	Alto
LLA-154	Femenino	44	33020	LLA-B	Alto
LLA-157	Masculino	6	7090	LLA-B	Habitual

LLA-162	Masculino	9	5780	LLA-B	Habitual
LLA-163	Femenino	5	11980	LLA-B	Alto
LLA-164	Masculino	3	3710	LLA-B	Habitual
LLA-166	Femenino	9	4920	LLA-B	Alto
LLA-171	Masculino	6	2090	LLA-B	Habitual
LLA-172	Masculino	2	6520	LLA-B	Alto
LLA-177	Femenino	2	5130	LLA-B	Habitual
LLA-178	Masculino	16	2190	LLA-B	Habitual
LLA-182	Masculino	1	5280	LLA-B	Alto
LLA-188	Masculino	12	4720	LLA-B	Alto
LLA-189	Femenino	16	100200	LLA-B	Alto
LLA-197	Masculino	13	36500	LLA-B	Habitual

*a = años

9.1.2 Análisis de Niveles de Expresión de genes por qPCR

Se seleccionaron 47 genes para su validación en muestras de seguimiento de pacientes con LLA, de ellos 6 genes habían sido previamente propuestos como posibles biomarcadores en muestras analizadas al diagnóstico, mediante SNPs, y microarreglos de expresión en los trabajos descritos en antecedentes directos, 5 genes fueron referenciados de la literatura, y 2 genes endógenos para ser utilizados durante la normalización de resultados.

La química de detección seleccionada para determinar los niveles de expresión génica por qPCR fue Sybr Green I, para lo cual fue requerido seleccionar y/o diseñar iniciadores altamente específicos.

9.2 Obj. 1 Estandarización del análisis cuantitativo de los posibles biomarcadores de interés en sujetos sin leucemia.

Para comenzar con los ensayos la estandarización tanto de la selección de los genes endógenos como para la selección de la concentración se utilizó un grupo de 8 pacientes con LLA, 3 eran de linaje T y 5 de linaje B, además de un Pool de controles normales formado por 3 hombres y 3 mujeres.

9.2.1 Selección de los genes endógenos

Para la selección de los genes endógenos se evaluó la expresión de 4 genes endógenos (GAPDH, RPL13A, B2M y HPRT1) candidatos para controles internos por qPCR, en las 8 muestras de pacientes con LLA el ensayo se realizó por triplicado y el cálculo de los

niveles de expresión se calculo por medio del método $2^{-\Delta C^T}$ (donde $\Delta C^T = (\text{Prom. Ct muestra} - \text{Prom. Ct sano})$).

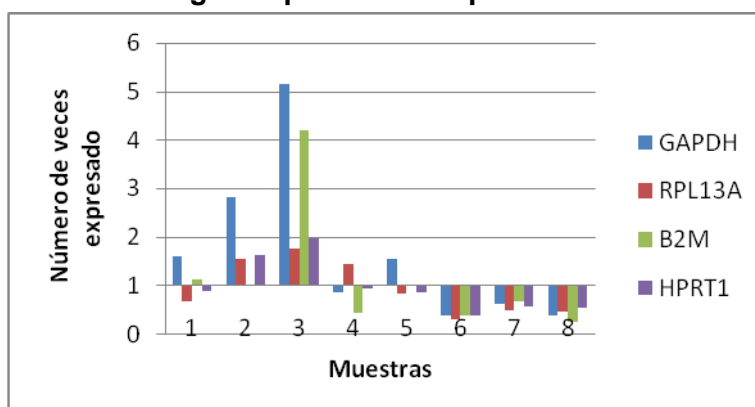
Tabla 14. Niveles de expresión de los genes endógenos

Muestras		Datos Gráfica			
		Cambios en niveles de expresión			
		GAPDH	RPL13A	B2M	HPRT1
LLA 44	1	0.354964	0.22153292	0.32881693	0.41807574
LLA 80	2	0.62805963	0.51762021	0.29575821	0.78926173
LLA 81	3	1.1505659	0.58468592	1.24346689	0.95597445
LLA 42	4	0.18786649	0.48277435	0.12320698	0.44693216
LLA 69	5	0.34587312	0.28010074	0.28857996	0.40566375
LLA 75	6	0.08407479	0.09678876	0.10770759	0.17435093
LLA 87	7	0.13547424	0.16349989	0.19733587	0.2698221
LLA 93	8	0.08129757	0.15423322	0.06935886	0.2603136

Fig. 5. Gráfica de niveles de expresión de los genes Endógenos probados en pacientes con LLA

	Valores de P
GAPDH	6.81E-08
RPL13A	6.53E-05
B2M	8.00E-08
HPRT1	0.0001269

Con menor variación



Se seleccionaron los genes RPL13A y HPRT1 porque mostraron una menor variación en las muestras analizadas, tanto en sus niveles de expresión como en el análisis estadístico (ANOVA de una vía) por sus mayores valores de p.

9.2.2 Selección de Concentración

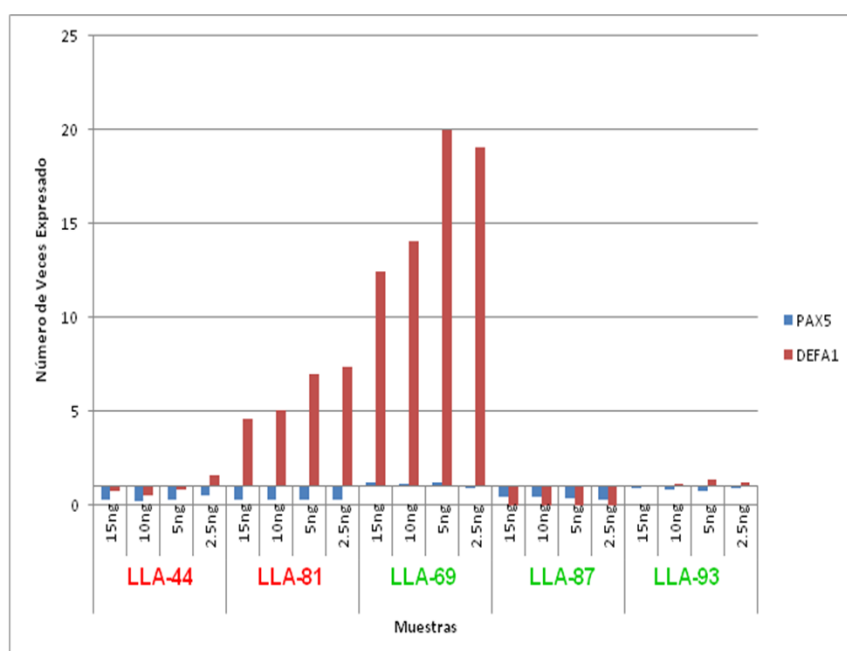
Para la selección de la concentración se evaluó la expresión de 3 genes: Pax5 (reportado como subexpresado), DEFA1 (reportado como sobreexpresado) y RPL13A (gen endógeno utilizado para normalizar resultados), en 5 muestras de pacientes con LLA (2 de linaje T y 3 de linaje B) y un pool de controles normales (3 mujeres y 3 hombres, para hacer la segunda normalización), para cada muestra se prepararon 4 diluciones:

quedando a 15ng, 10ng, 5ng y 2.5ng totales de cDNA por pozo de reacción por muestra para los 3 genes a evaluar en cada una de estas concentraciones.

El ensayo se realizó por triplicado y el cálculo de los niveles de expresión se calculo por medio del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (donde $\Delta CT = (\text{Prom. Ct muestra} - \text{Prom. Ct Endógeno})$ y $\Delta\Delta CT = (\text{Prom. } \Delta Ct \text{ muestra} - \text{Prom. } \Delta Ct \text{ sano})$).

Muestra		PAX5	DEFA1
1 LLA-44	1 15ng	0.32061258	0.75797722
	1 10ng	0.26035083	0.51664698
	1 5ng	0.29258791	0.83062285
	1 2.5ng	0.54495911	1.63870252
2 LLA-81	2 15ng	0.32668347	4.59523021
	2 10ng	0.33594816	5.06997638
	2 5ng	0.32852507	6.99257259
	2 2.5ng	0.32483672	7.37652453
3 LLA-69	3 15ng	1.21579133	12.4697105
	3 10ng	1.18627932	14.1132403
	3 5ng	1.19465629	20.0181593
	3 2.5ng	1.01775186	19.1026398
4 LLA-87	4 15ng	0.46923993	0.02815898
	4 10ng	0.48765669	0.03105544
	4 5ng	0.40416707	0.03811102
	4 2.5ng	0.31552368	0.03247401
5 LLA-93	5 15ng	0.92379273	1.10326104
	5 10ng	0.81858685	1.1621305
	5 5ng	0.75799676	1.36746757
	5 2.5ng	0.89797878	1.23950484

Fig. 6. Gráfica de niveles de expresión de PAX5 y DEFA1 por concentración

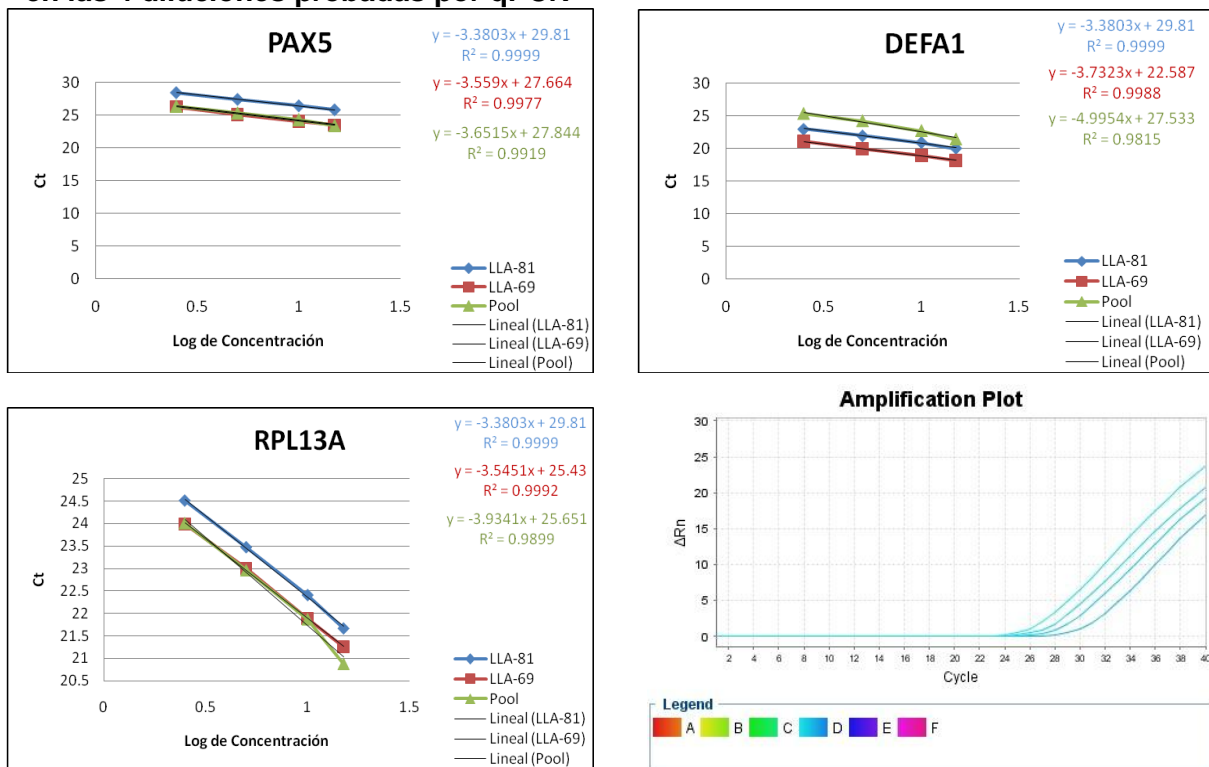


		Valor de P	
		15ng	10ng
PAX5	LLA-81	0.00284399	0.00188925
	LLA-69		
DEFA1	LLA-81	0.00118765	0.00211052
	LLA-69		

En la gráfica anterior se observa que los niveles de expresión de pax5 en las muestras LLA-81 y LLA-87 se mantiene constante en las 4 diluciones, y que para las muestras LLA-44, LLA-69 y LLA-93 muestra una expresión constante en las diluciones de 15, 10 y 5ng, pero disminuye en la última dilución de 2.5ng, por lo que se concluye que la mínima concentración a la que pax5 muestra una expresión constante es la de 5ng totales por pozo de reacción.

El gen DEFA1 solo muestra una expresión constante en las cuatro diluciones de la muestra LLA-87, en el resto de las muestras no tiene un patrón de expresión por dilución por lo que se procedió a correlacionar linealmente los valores de Ct vs Log de la concentración para cada uno de los genes evaluados en las 4 diferentes diluciones de las muestras LLA-69 y LLA-81, ya que en estas se mostraba una sobreexpresión de DEFA1 que iba en incremento conforme disminuía la concentración.

Fig. 7. Gráficas de correlación lineal y ejemplo de curvas de amplificación de Pax5 en las 4 diluciones probadas por qPCR



En las gráficas de correlación lineal se observa que tanto PAX5 como DEFA1 y RPL13A mantienen una correlación lineal cercana al 0.999 en las 3 muestras evaluadas (LLA-69, LLA-81 y el pool), lo cual significa que la expresión se mantiene constante en cualquiera de las 4 diluciones, por lo cual se seleccionó para trabajar la concentración de 10ng totales por pozo de reacción.

9.2.3 Optimización de la qPCR

Para poder realizar el cálculo de los niveles de expresión de cada gen mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, previamente se validó que las eficiencias de amplificación tanto de los genes blanco como de los genes endógenos fuera aproximadamente igual. Se determinó la eficiencia de la PCR corriendo por triplicado curvas estándar (Grupo de diluciones de cDNA (pool de pacientes sanos) a diferentes concentraciones: 2, 2.5, 5, 10 y 15ng/uL) para cada gen blanco y de referencia. Para cada gen blanco se calculó el ΔCT (ΔCT (CT target – CT reference)) y se graficó contra el logaritmo de la concentración, obteniendo una regresión lineal semi-logarítmica. La ecuación de la recta para cada gen blanco están representadas en la Tabla 16, las pendientes de las regresiones lineal semi-logarítmica fueron < 0.1 , esto revela que las eficiencias de amplificación tanto de los genes blanco como de los genes endógenos son aproximadamente igual. A si mismo se observó que su amplificación fue homogénea, Fig. 8.

Tabla 16. Ecuaciones de la recta de las gráficas de eficiencia calculadas para los genes blanco

Gen	Pendiente	Ecuación de la recta
CCR5	0.0959	$y = 0.0959x + 1.9954$
IL10	-0.0937	$y = -0.0937x + 3.1466$
WNT5A	0.0677	$y = 0.0677x + 3.5752$
FZD3	-0.0125	$y = -0.0125x + 4.8742$
CTNNB1	-0.0181	$y = -0.0181x + 0.6005$
GSK3B	-0.0229	$y = -0.0229x + 4.5951$
JNK	0.0519	$y = 0.0519x + 3.3781$
SOS1	-0.0137	$y = -0.0137x + 1.9219$
BCL11A	0.0637	$y = 0.0637x + 3.7081$
JAK2	0.0167	$y = 0.0167x + 1.2373$
STAT5	-0.0273	$y = -0.0273x + 1.0375$
JUN	0.0135	$y = 0.0135x + 2.3096$
BCL2A1	0.0155	$y = 0.0155x - 0.069$
OPAL1	0.0274	$y = 0.0274x + 1.4576$
FLT3	0.0192	$y = 0.0192x + 2.4331$
MYC	-0.0149	$y = -0.1493x + 0.5771$
IL2RA	0.0233	$y = 0.0233x + 2.12$
CCND2	0.0569	$y = 0.0569x + 1.2399$
RXRA	-0.0179	$y = -0.0179x + 0.8115$
PDE4D	0.0375	$y = 0.0375x + 5.8397$
STAT1	0.0147	$y = 0.0147x + 0.2783$
CD10	0.0144	$y = -0.0144x + 0.9406$
CREB1	-0.0682	$y = -0.0682x + 0.8771$
FOS	0.0143	$y = 0.1437x - 2.4484$
CYLD	0.0242	$y = 0.0242x - 0.0481$

RAPGEF2	-0.0313	$y = -0.0313x + 2.0581$
SORT1	0.0109	$y = 0.0109x + 1.602$
HK2	-0.0331	$y = -0.3318x + 3.2572$
S100A8	-0.0308	$y = -0.0308x - 2.6053$
DOCK10	0.0756	$y = 0.0756x + 1.0737$
MYH9	0.0241	$y = 0.0241x - 2.6638$
PAPD5	0.0285	$y = 0.0285x + 1.0507$
CD2	0.0345	$y = 0.0345x + 0.2768$
CD3D	-0.0376	$y = -0.0376x + 2.3826$
CD8A	-0.0954	$y = -0.0954x + 5.0096$
PBX1	-0.0564	$y = -0.0564x + 5.4702$
FAT	0.0219	$y = 0.0219x + 2.9382$
NKG2-D	-0.0748	$y = -0.0748x + 1.274$
HOXA9	0.0198	$y = 0.0198x + 3.0426$
CD44	0.0792	$y = 0.0792x + 6.4947$
TNFRSF7	-0.0111	$y = -0.0111x + 0.5881$
PAX5	-0.0177	$y = -0.0177x + 1.2046$
DEFA1	0.0118	$y = 0.0118x - 0.7276$
CASP8AP2	-0.0144	$y = -0.0144x + 1.8556$
NOTCH1	0.0911	$y = 0.0911x + 0.192$

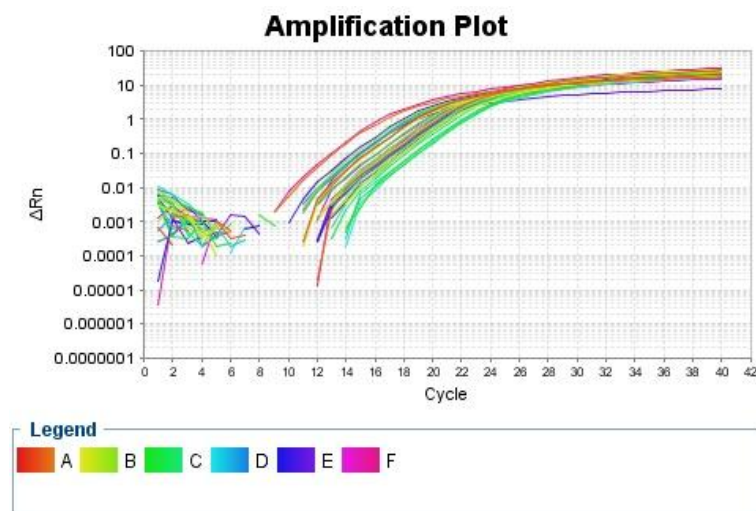


Fig. 8. Curvas de amplificación de los 47 genes evaluados con Sybr green. Se muestra homogeneidad en la etapa lineal de las curvas de amplificación. Las qPCRs se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el punto 8.5.7.

La especificidad de la amplificación para cada gen se muestra a través de la curva de disociación, la cual se realiza después de la PCR solamente cuando se emplea un fluoróforo de intercalación como lo es el Sybr green, para saber si la amplificación es

específica se debe observar en la curva de disociación solamente un pico a una T_m , lo cual indica que solamente se formó un amplicón, la aparición de picos extras indican inespecificidad.

Se probaron los 47 genes a evaluar: CCR5, IL10, WNT5, FZD3, CTNNB1, GSK3B, JNK, SOS1, BCL11A, JAK2, STAT5, JUN, BCL2A1, OPAL1, IL2RA, CCND2, RXRA, PDE4D, STAT1, CD10, CREB1, FOS, CYLD, RAPGEF2, SORT1, HK2, S100A8, DOCK10, MYH9, PAPD5, CD2, CD3D, CD8A, PBX1, FAT, NKG2-D, HOXA9, CD44, TNFRSF7, DEFA1, NOTCH1, CASP8AP2, PAX5, FLT3, MYC, RPL13A y HPRT1. Se amplificaron con cDNA del pool normal mediante qPCR, y al evaluar la curva de disociación para cada gen, se observó que 14 genes de los 47 mostraban picos inespecíficos.

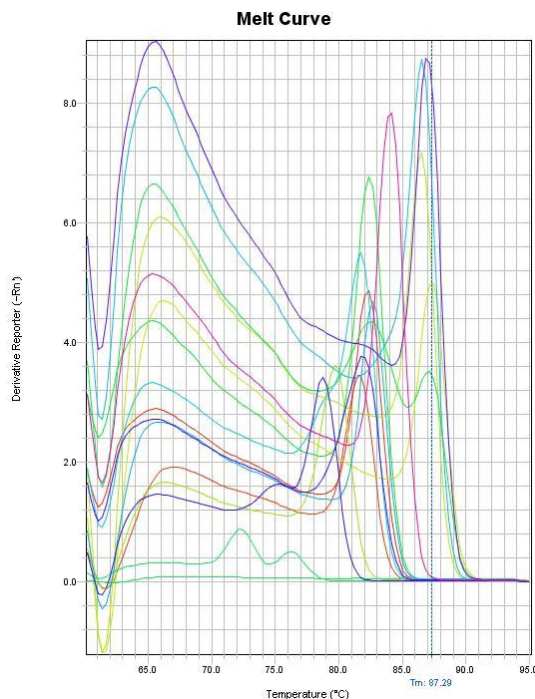


Fig. 9. Curva de disociación de 14 genes con picos inespecíficos.

Se muestra la presencia de varios picos en todas las curvas de disociación, lo que es indicativo de inespecificidad de los oligonucleótidos utilizados.

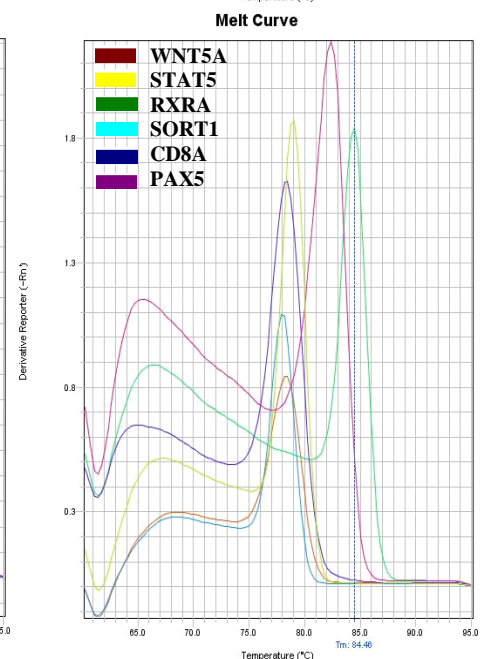
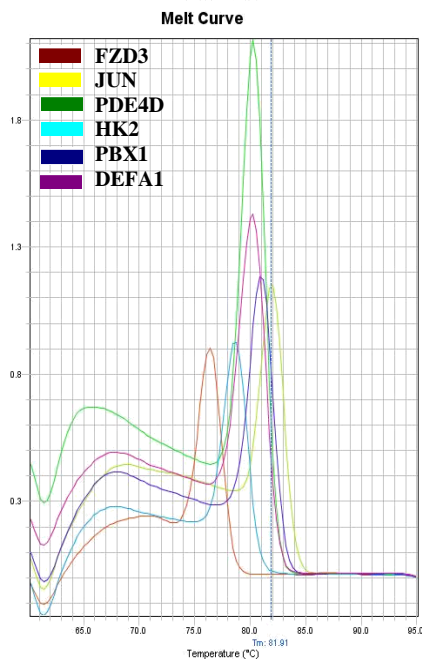
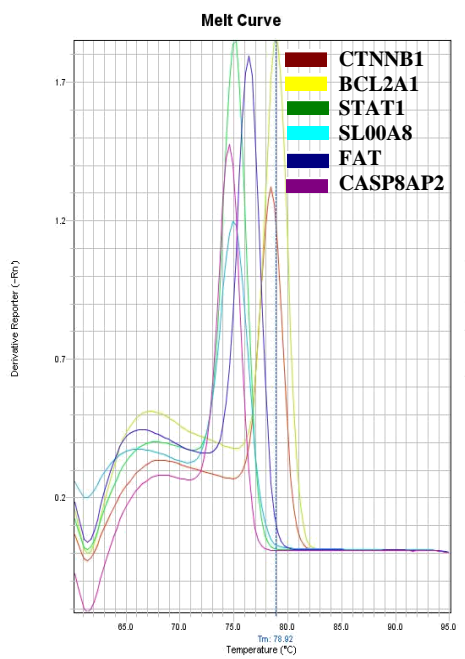
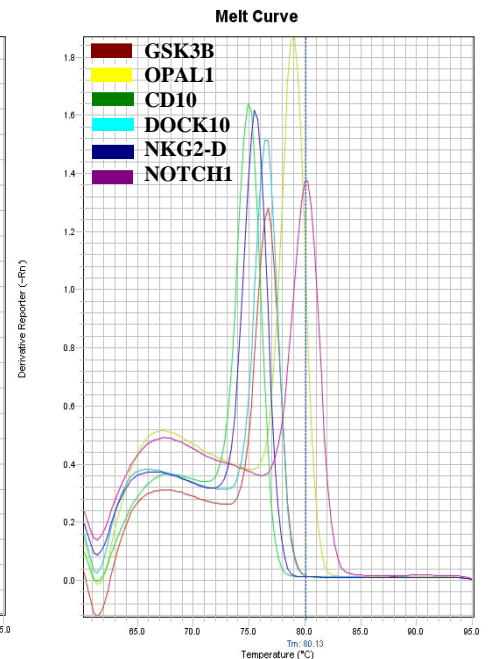
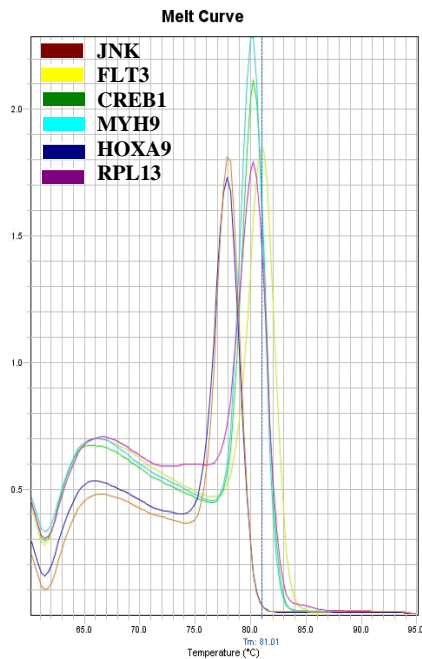
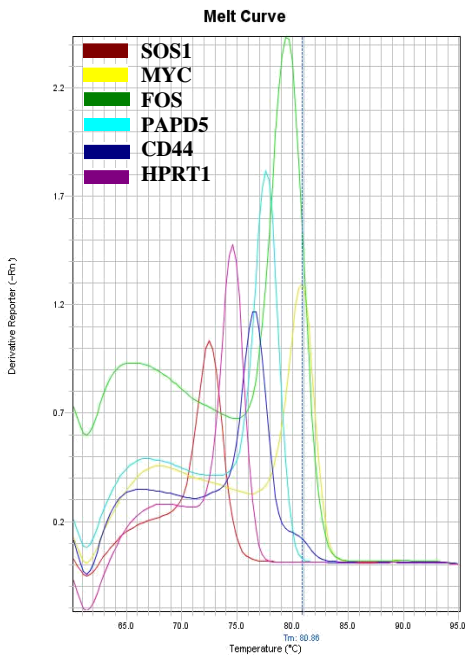
Por lo que se estandarizaron las condiciones de la qPCR hasta que en la curva de disociación para todos los genes se observara un solo pico, siendo estas condiciones las que se utilizaron para hacer todos los ensayos.

Condiciones:

Para 1 reacción: agregar 10ng totales de cDNA, 7.5uL de SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems, 1uL de iniciadores (2.5uM), y completar con H₂O libre de DNAsas/RNAsas hasta un volumen de 15uL.

Programa:

Temperatura		Tiempo
95°C		10 min.
95°C	15 seg.	40 ciclos
60°C	1 min.	
Agregar Curva de Disociación		
95°C		15 seg.
60°C		15 seg.
95°C		15 seg.



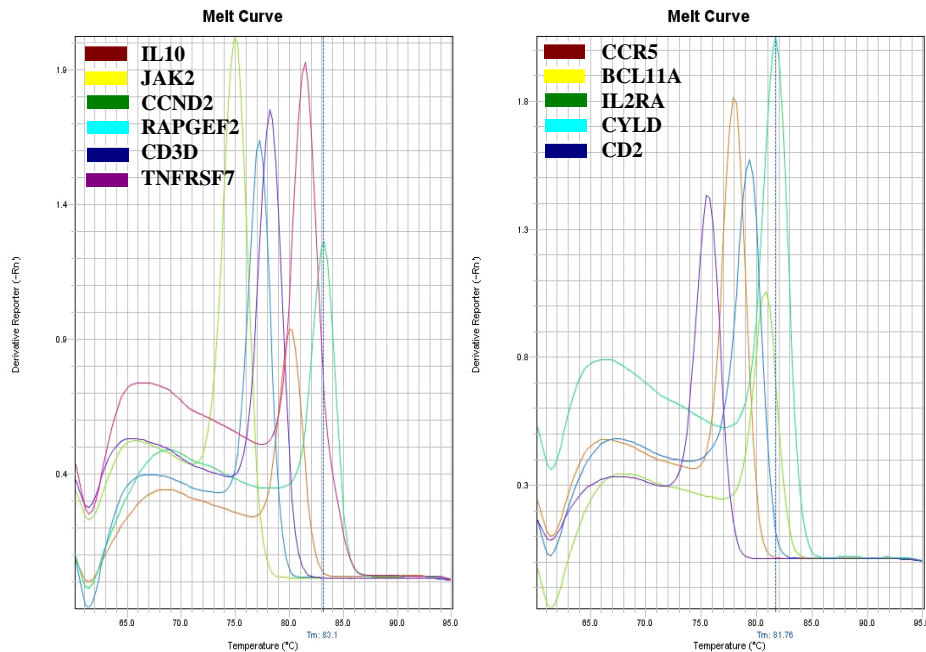


Fig. 10. Curva de disociación de los genes evaluados por qPCR.

Se muestra la presencia de un solo pico en todos los genes amplificados, lo que es indicativo de la especificidad en la amplificación.

9.3 Obj. 2. Para cumplir con el objetivo dos, se valoró la expresión de los posibles biomarcadores en muestras sucesivas de seguimiento de pacientes con leucemia.

Una vez optimizada la reacción de qPCR se procedió a su aplicación en muestras clínicas de pacientes con LLA a los cuales se les recolectaron 3 muestras, una al diagnóstico, otra al mes y una tercera a los 2 meses de iniciado el tratamiento, y se evaluaron en cada una de ellas un grupo de 47 genes seleccionados (CCR5, IL10, WNT5, FZD3, CTNNB1, GSK3B, JNK, SOS1, BCL11A, JAK2, STAT5, JUN, BCL2A1, OPAL1, IL2RA, CCND2, RXRA, PDE4D, STAT1, CD10, CREB1, FOS, CYLD, RAPGEF2, SORT1, HK2, S100A8, DOCK10, MYH9, PAPD5, CD2, CD3D, CD8A, PBX1, FAT, NKG2-D, HOXA9, CD44, TNFRSF7, DEFA1, NOTCH1, CASP8AP2, PAX5, FLT3, MYC, RPL13A y HPRT1) con la finalidad de determinar diferencias en los niveles de expresión respecto a los considerados normales (pool de controles normales (3 hombres y 3 mujeres sanos)). Las reacciones de qPCR para cada gen se realizaron por duplicado teniendo como criterio para su aceptación una desviación estándar < 0.05 en los valores de Ct obtenidos, los cuales se promediaron para generar un solo valor de Ct por gen por muestra. La comparación de las muestras de pacientes con respecto al pool de controles sanos se realizó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (donde $\Delta\Delta CT = (\text{Promedio de los Cts del gen evaluado en la muestra} - \text{Promedio de los Cts de los genes endógenos}) - (\text{Promedio de los Cts del gen evaluado en el pool de controles sanos} - \text{Promedio de los Cts de los$

genes endógenos)). Este cálculo se realizó para cada gen evaluado para cada muestra, el resultado de $2^{-\Delta\Delta CT}$ nos da el nivel de expresión para cada gen.

El análisis de los niveles de expresión de cada gen para cada muestra, se realizó mediante un análisis bilateral de la varianza por jerarquías de Friedman en el software Sigma Plot®, la regla de decisión empleada con un 95% de confianza para considerar a un gen diferencialmente expresado, fue que $\alpha = 0.05$ y que la razón de varianza (R.V.) fuera mayor o igual que el valor crítico de S.

Se realizó una comparación para cada gen entre su nivel de expresión medio y su nivel de expresión en las tres muestras (Una al diagnóstico y dos de seguimiento), dándonos como resultado los genes diferencialmente expresados en todos los pacientes mostrados en la Tabla 17.

Tabla 17. Genes diferencialmente expresados en relación al tiempo

Gen	Chi-2	P	Función
BCL11A	6.135	0.047	Protooncogen de células B relacionado con apoptosis
STAT5	7.161	0.028	Transductor de señales y activador de la transcripción
BCL2A1	28.021	0.001	Regulador anti y pro-apoptótico, involucrado en desarrollo, homeostasis y tumorigénesis
OPAL1	11.894	0.003	Gen predictor de leucemias agudas
FLT3	7.763	0.021	Regulador de hematopoyesis
RXRA	6.149	0.046	Receptor nuclear de hormonas, y regulador de la transcripción
FOS	8.374	0.015	Participa en la proliferación y diferenciación celular
SORT1	6.396	0.041	Receptor multi-ligando tipo I
HK2	11.032	0.004	Fosforila glucosa para producir glucosa-6-fosfato
SL00A8	9.085	0.011	Regulación de la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular
CD44	9.586	0.008	Antígeno celular CD44
PAX5	6.574	0.037	Codifica una proteína activadora específica para la diferenciación de linfocitos B
Chi-cuadrada con 2 grados de libertad			

Patrón de Expresión de los genes seleccionados por categoría en muestras de seguimiento

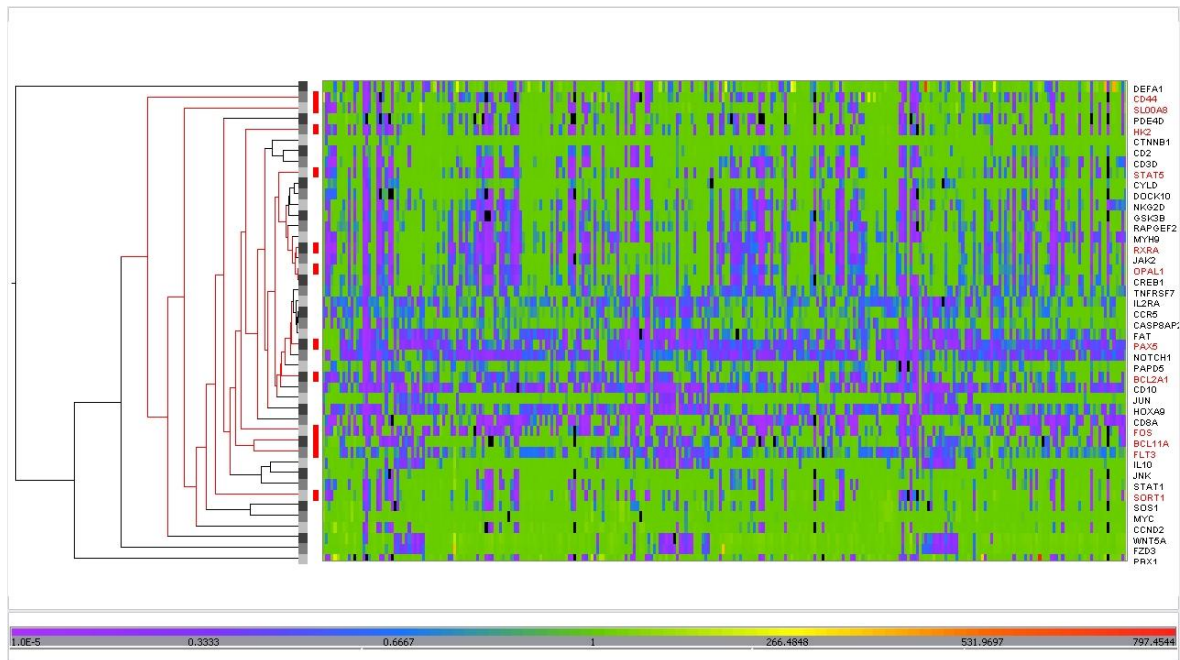


Fig.11. Mapa de Calor, se observan los niveles de expresión de los genes representados por colores, del lado derecho se encuentran enlistados los genes analizados en los tres tiempos en todos los pacientes, resaltándose en color rojo los genes que mediante el análisis estadístico nos dieron significativos. Los colores morado y azul representan subexpresión, el color verde representa expresión normal y los colores amarillo y rojo representan sobreexpresión.

9.4 Obj. 3. Para cumplir con el objetivo tres se correlacionó la expresión de los posibles biomarcadores con la progresión de la enfermedad, y se seleccionaron los biomarcadores útiles para la medición de la ERM.

El análisis de supervivencia consistió en la medición de un evento (como recaída o muerte) para cada paciente a través del tiempo (35 meses). Para dicho análisis se utilizó el software SAM el cual mediante la prueba de Cox calcula un valor para cada gen, si el valor es positivo (genes rojos en la gráfica de SAM) significa que la alta expresión de los genes correlaciona con alto riesgo de recaída, es decir que tendrá una supervivencia corta, y para valores negativos (genes verdes en la gráfica de SAM) significa que la alta expresión de los genes correlaciona con bajo riesgo de recaída, es decir que tendrá una supervivencia larga. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de la gráfica de SAM para análisis de supervivencia.

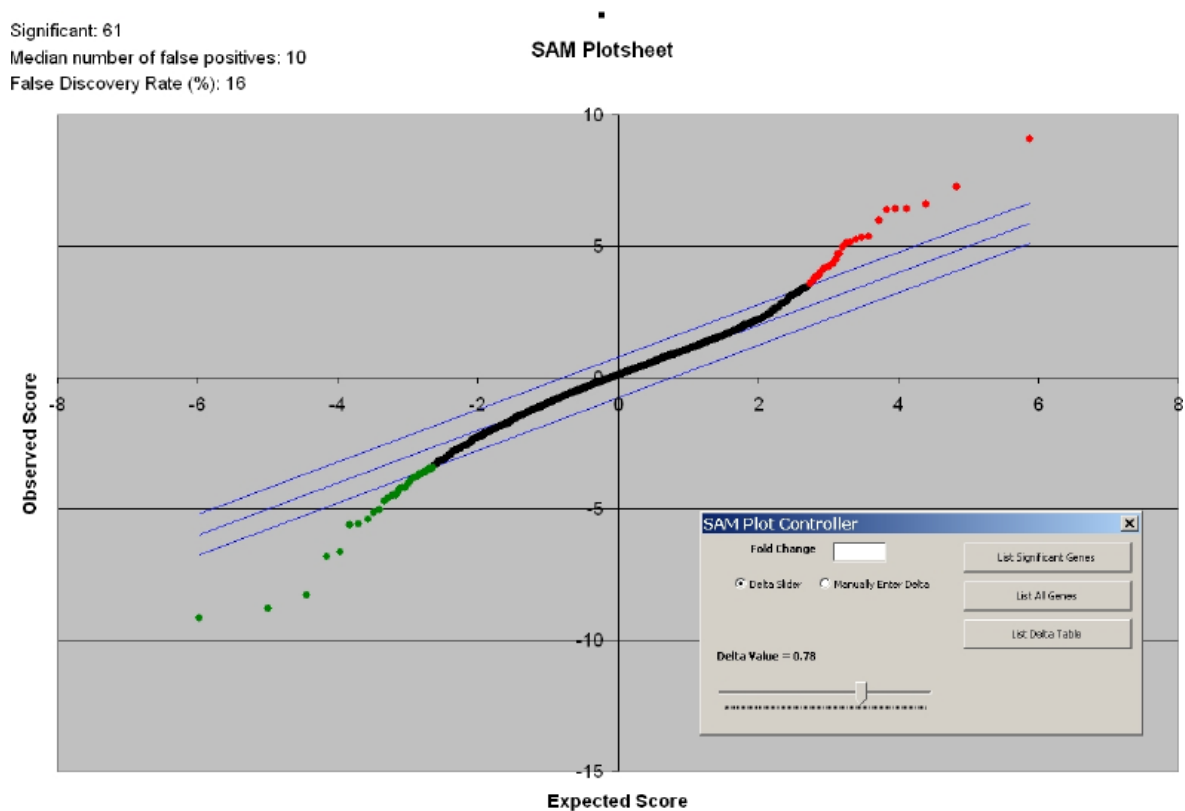


Fig. 12. Ejemplo de la gráfica de SAM para análisis de sobrevivencia, en ella se muestran los genes diferencialmente sobreexpresados en rojo y los genes diferencialmente subexpresados en verde, en la parte superior izquierda se indican los genes que son significativos, el numero de genes falsos positivos y su porcentaje (FDR).

Se analizó la sobrevivencia en todos los pacientes, separando por categorías entre niños y adultos, observándose que no hay genes significativos indicadores de riesgo a recaída en adultos, y que en los niños hay 4 diferentes genes significativos sobreexpresados en los tres diferentes tiempos de recolección de muestra medidos, siendo el gen FLT3 el que permanece constante en los tres tiempos, sugiriéndose como un probable biomarcador indicador de riesgo a recaída en niños. Los resultados del análisis se indican en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de Supervivencia utilizando SAM, separando por categorías entre Niño y Adulto, comparando en cada uno los tres diferentes tiempos.

Niños						
	Gen	ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
Tiempo 1	FLT3	U82002	5.41706619	78.4799639	14.4875401	0
	IL10	NM_000572	3.4456991	63.0511814	18.2985164	0
Tiempo 2	FLT3	U82002	2.5596443	19.4525595	7.59971198	0
Tiempo 3	FLT3	U82002	4.50761717	53.6301686	11.897676	0
	SL00A8	NM_002964	3.7163986	91.4451437	24.6058492	0
	BCL11A	AF080216	3.02090938	47.3793203	15.683794	0
Adultos						
	Gen	ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
Tiempos 1, 2 y 3	Ninguno	-	-	-	-	-

Así mismo se separaron los datos de los niños por género, evaluándose en cada categoría la supervivencia, observándose al gen FLT3 como único gen significativo indicador de riesgo de recaída durante el primer mes de enfermedad (Tiempo 1 (0 días), Tiempo 2 (30 días)) en niñas, en los niños se observaron además de FLT3 otros genes significativos: IL10, CD44, STAT5, SL00A8, BCL11A y SORT1 como indicadores de riesgo de recaída, estos resultados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Análisis de Supervivencia utilizando SAM, separando a los Niños por género en Mujeres y Hombres, comparando en cada categoría los tres diferentes tiempos.

Mujeres						
	Gen	ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
Tiempo 1	FLT3	U82002	2.63384646	16.8060918	6.38081682	0
Tiempo 2	FLT3	U82002	2.90808254	13.4185899	4.61423968	0
Tiempo 3	Ninguno	-	-	-	-	-
Hombres						
	Gen	ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value(%)
Tiempo 1	FLT3	U82002	5.30490713	61.5759721	11.607361	0
	IL10	NM_000572	5.01856273	72.2626819	14.3990791	0
	CD44	X66733	2.83265442	34.4866122	12.1746627	0
	STAT5	NM_003152	1.90272054	13.1226975	6.89680764	0
Tiempo 2	CD44	X66733	4.89450704	87.8419921	17.947056	0
Tiempo 3	FLT3	U82002	5.19761909	53.6371573	10.3195629	0
	SL00A8	NM_002964	4.60118764	103.373052	22.466602	0
	BCL11A	AF080216	3.9390271	53.1227772	13.4862685	0
	SORT1	NM_002959	3.02592971	85.0571088	28.1094133	0

9.5 Obj. 4. Para cumplir con el objetivo cuatro se caracterizó molecularmente al gen Pax5 como un posible biomarcador seleccionado.

Se secuenciaron los 10 exones que forman al gen de Pax5 (paired box 5)

Para amplificar cada uno de los exones se utilizaron los iniciadores listados en la **Tabla 9**.

Para encontrar la temperatura óptima de alineamiento para cada exón se estandarizó cada reacción tomando temperaturas cercanas a la Tm teórica de los iniciadores.

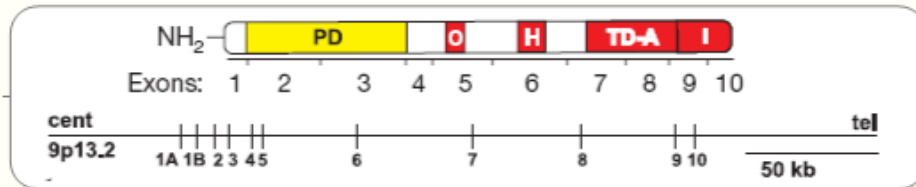
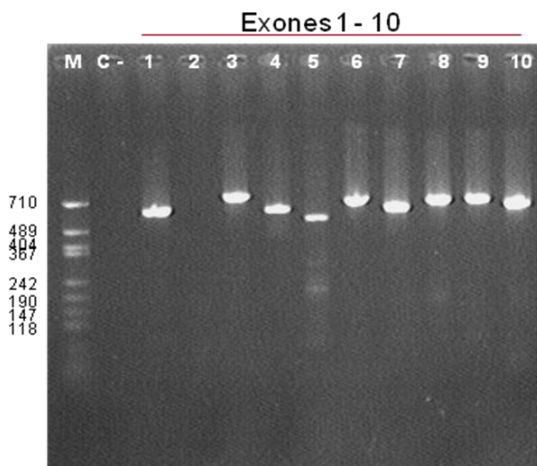


Fig. 13. Exones del gen de PAX5 (Paired Box 5)⁶². Se observa al gen Pax5 formado por 10 exones y un promotor.

Estandarización



MIX	[i]	[f]	1X (ml)
Buffer	5X	1X	2
MgCl2	25mM	2mM	0.8
dNTP's	10mM	0.2mM	0.2
TaqGold	5U/ml	1 U	0.2
Primers (Fw & Rv)	5 mM	0.5mM	1
H2O	---	---	4.3
DNA	200ng/uL	100 ng/ul	0.5
TOTAL			10 ml

Programa: Pax5

95°C x 3min
 95°C x 30seg
 58°C x 30seg
 72°C x 45seg x 37 ciclos
 72°C x 3min

Fig.14. Reacción de PCR para el gen Pax5. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carriles 3 al 12: exones 1 al 10 respectivamente.

En la Fig. 14 se observa que el exón 2 no amplifica y los exones 5 y 8 presentan bandas inespecíficas por lo que se procedió a alinearlos con un gradiente de temperaturas para seleccionar la T_m adecuada.

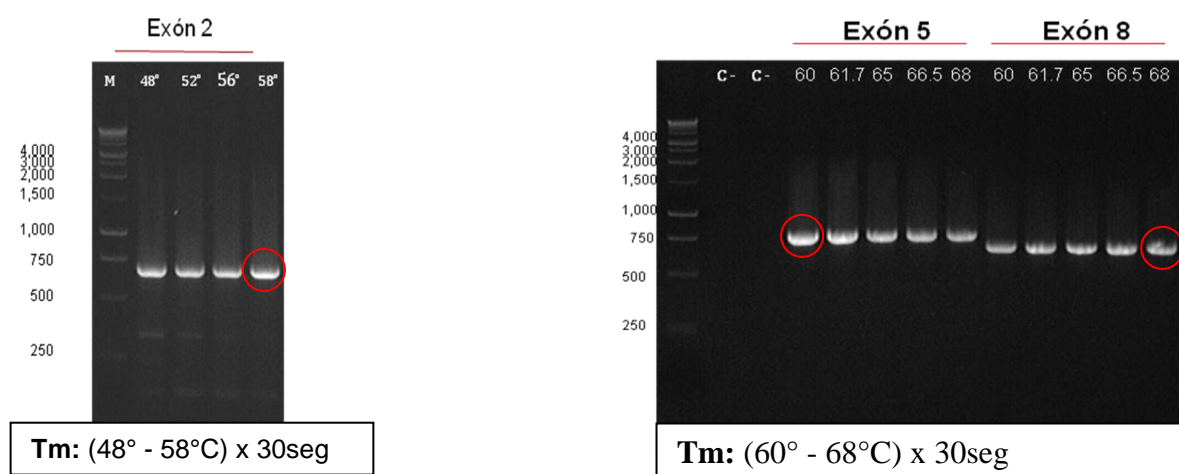


Fig. 15. Gradiente de temperaturas para los exónes 2, 5 y 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para el gel del Exón 2 el carril 1: Marcador de peso molecular, carriles 2 a 5: temperaturas de 48, 52, 56 y 58° C respectivamente. Para el gel de los exones 5 y 8 el carril 1: Marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: controles negativos, carriles 4 a 8: temperaturas de 60, 61.7, 65, 66.5 y 68°C para el exón 5 respectivamente, carriles 9 a 13: temperaturas de 60, 61.7, 65, 66.5 y 68°C para el exón 8 respectivamente.

En la figura 15 se observa que la T_m ideal para el exón 2 es de 58°C, para el Exón 5 es de 60°C, y para el exón 8 a 68°C.

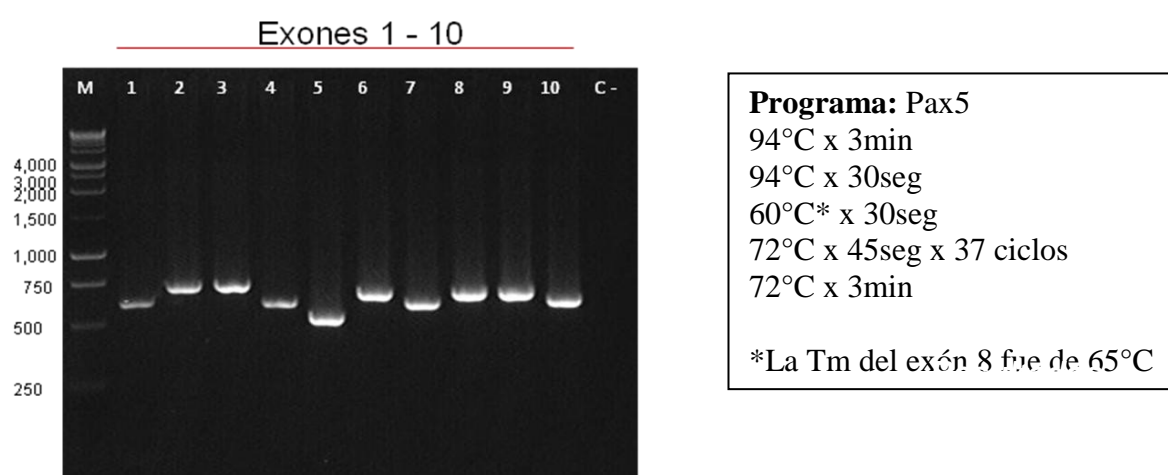


Fig. 16. Amplificación de los 10 exones del gen de Pax5 estandarizados. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de peso molecular, carriles 2 al 11: exones del 1 al 10 respectivamente, carril 12: control negativo.

Una vez estandarizadas las condiciones óptimas para cada exón, se procedió a la amplificación de exones a partir de las muestras seleccionadas, listadas en la **Tabla 7**.

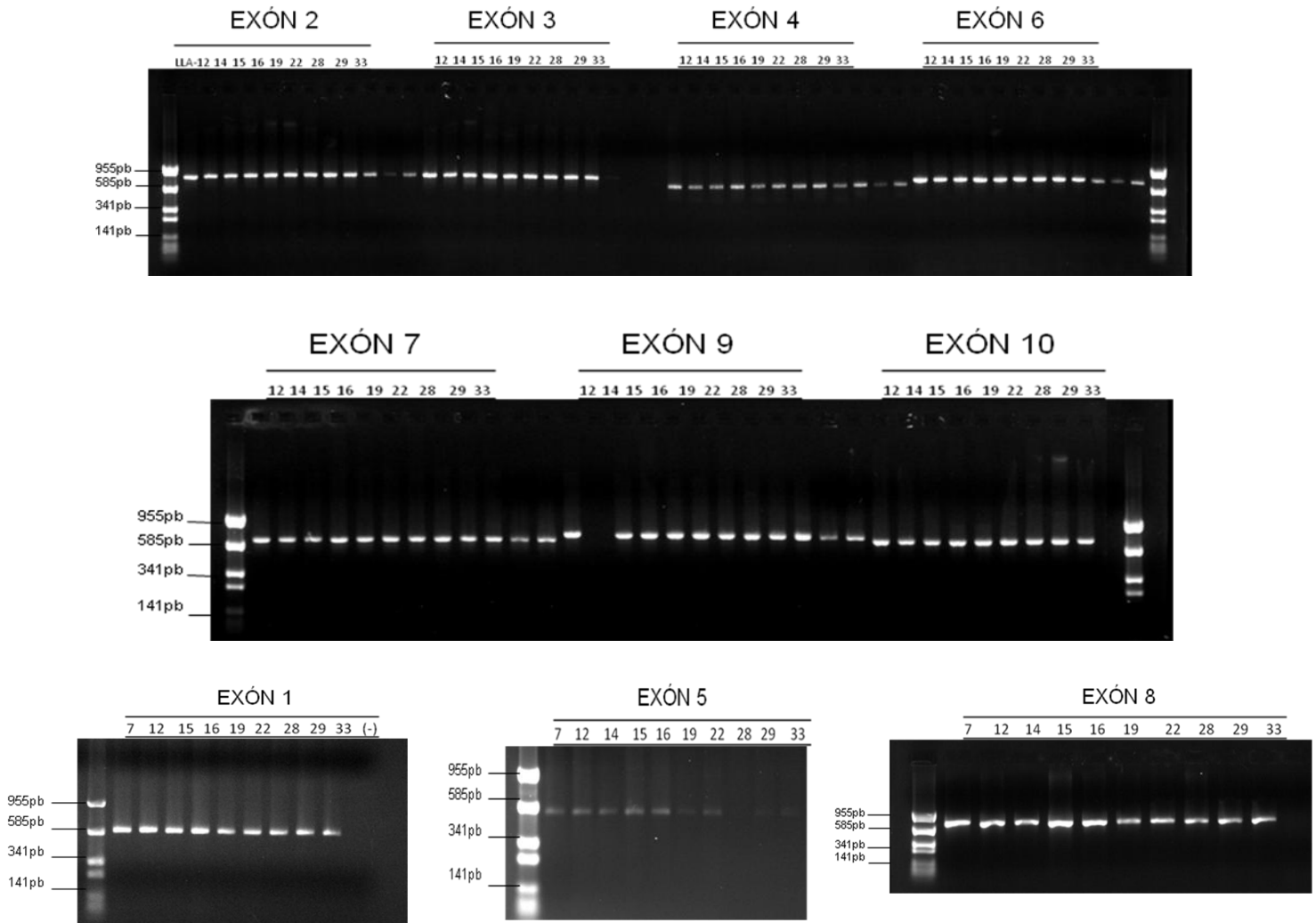


Fig. 17. Amplificación de los 10 exones a partir de las muestras seleccionadas. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestran los 10 exones amplificados para las 9 muestras seleccionadas.

Una vez estandarizada cada reacción y amplificada en las muestras seleccionadas, se realizó la purificación de los productos de PCR de cada una de las muestras para cada exón y se secuenciaron (Forward y Reverse para cada exón). Los esferogramas resultantes fueron alineados y editados utilizando los programas Chromas 2 y GeneStudio Pro™ con el fin de obtener la secuencia consenso para de cada muestra para cada exón y compararla con su secuencia de referencia, y observar cambios nucleotídicos en cada muestra evaluada. En la Fig. 18, se muestra el resultado obtenido

al alinear y comparar la secuencia (Forward y Reverse) de cada muestra con la secuencia de referencia para el exón 2, se observa claramente que hay un cambio nucleotídico de una G por una T en la posición 494pb en 7 de las 8 muestras secuenciadas.

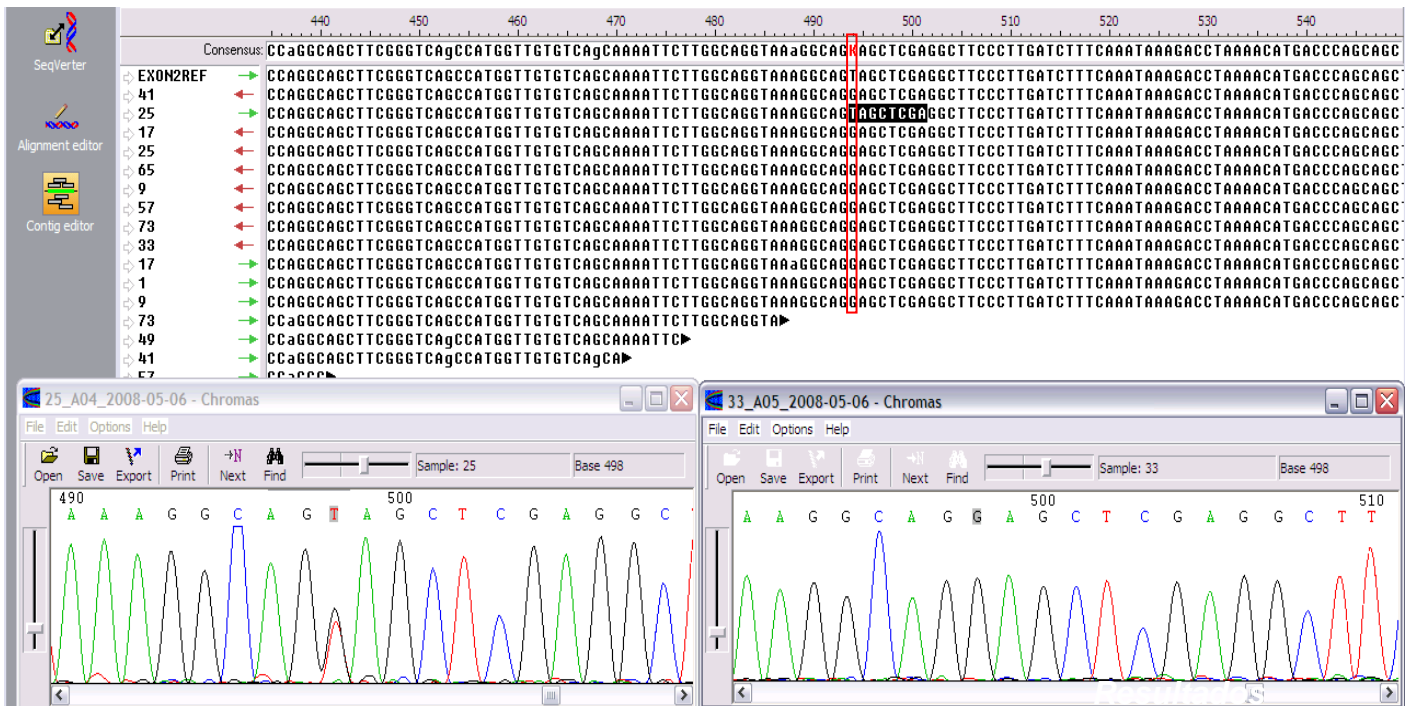


Fig.18 Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 2. Se observa un cambio nucleotídico de una G/T en la posición 494pb en 7 de 8 muestras seleccionadas.

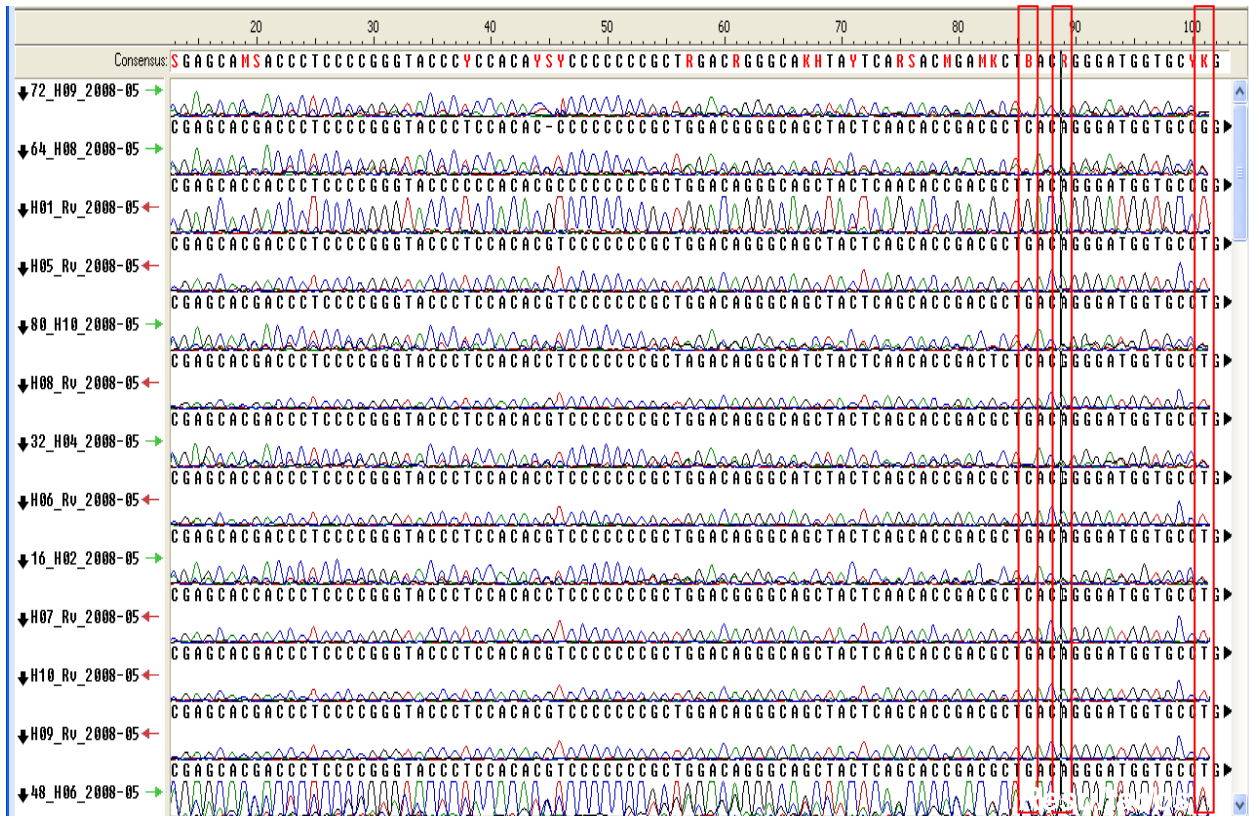


Fig.19. Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 8. Se observa un cambio nucleotídico de C/G en la posición 86 en 5 muestras, un cambio de G/A en la posición 89 en 3 muestras, y un cambio de G/T en la posición 101 en 2 muestras.

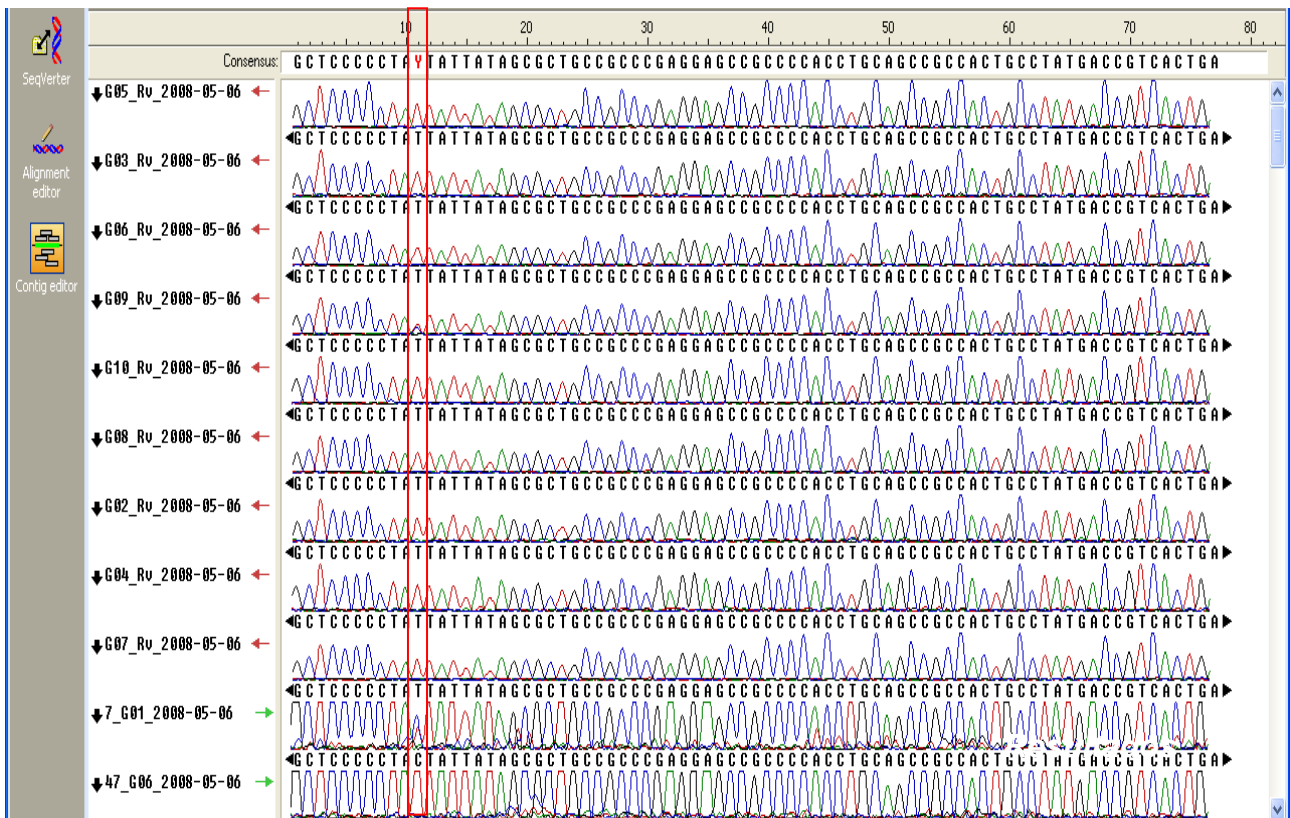


Fig.20. Comparación de los alineamientos de la secuencia de cada muestra con la secuencia de referencia para el Exón 10. Se observa un cambio nucleotídico de una C/T en la posición 11pb en 1 de 9 muestras seleccionadas.

En el resto de los exones no se encontraron diferencias entre las secuencias de las muestras seleccionadas con la secuencia de referencia.

Análisis en la secuencia aminoacídica de los cambios nucleotídicos encontrados

Para analizar si los cambios nucleotídicos encontrados en los exones 8 y 10 afectaban a nivel estructural la proteína codificada por este gen, se tradujeron las secuencias mutadas encontradas en dichos exones a secuencias aminoacídicas, y se compararon con su secuencia aminoacídica de referencia por medio del software ClustalW2 localizado en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), dicho análisis nos arrojó como resultado que dichas mutaciones puntuales no provocaban cambios aminoacídicos ni estructurales en la proteína (Ver fig. 22)

EXON 8

```
EXON 8 REF      RDLASTTLPGYPPHVPPAGQGSYSAPTLTGMVP
EXON 8 MUT1 G/C RDLASTTLPGYPPHVPPAGQGSYSAPTLTGMVP
EXON 8 MUT2 A/G RDLASTTLPGYPPHVPPAGQGSYSAPTLTGMVP
EXON 8 MUT3 T/G RDLASTTLPGYPPHVPPAGQGSYSAPTLTGMVP
*****
```

EXON 10

```
EXON 10 REF     SPYYYSAAARGAAPPAAATAYDRH
EXON 10 MUT1 C/T SPYYYSAAARGAAPPAAATAYDRH
*****
```

Fig. 21. Alineamiento de las secuencias mutadas de los exones 8 y 10 con su secuencia de referencia. No se observan cambios aminoacídicos en la proteína codificada.

10.0 DISCUSIÓN

La importancia de las enfermedades hematooncológicas radica en que algunas de ellas presentan elevada incidencia y mortalidad en población infantil o adulta joven, tal es el caso de la LLA, la cual aunque solo representa el 3% de los casos y el 5.8% de las defunciones, la mayor proporción de ella se presenta en edades tempranas, situación que tiene gran impacto en los niveles de salud y en el nivel socio-económico de la población, debido al número de años de vida potencialmente perdidos.²

En nuestra población de estudio los valores de frecuencia mayoritarios fueron el 70.40% de los pacientes fueron niños, el 55.44% mujeres, y el 91.83% de linaje B. Correspondiendo estas proporciones con las frecuencias de incidencia de LLA tanto en población mexicana como en otras regiones geográficas (Europa y EE.UU.)^{3,4}

Las muestras utilizadas se procesaron en un lapso menor de 4 horas después de su recolección con la finalidad de evitar la degradación del RNA y preservar su integridad, el procesamiento incluía centrifugación en gradiente, separación de células mononucleares, extracción de RNA, cuantificación y almacenamiento.

Los tiempos para la recolección de las muestras de seguimiento una vez tomada la muestra al momento del diagnóstico, fueron al mes (4 semanas) y a los dos meses (8 semanas) después de iniciado el tratamiento, esto se explica, debido a que al mes se finaliza la primera etapa del tratamiento, la cual es la inducción a la remisión, que tiene como finalidad reducir las células leucémicas, de tal manera que ya no sean detectables en la médula ósea ni en sangre periférica, por lo que este valor de corte es útil para determinar el riesgo de recaída al correlacionarlo con el resultado de ERM, igualmente el valor de corte a los 2 meses después de finalizada la inducción se relaciona con un riesgo mayor de recaída en la ERM.^{14, 15, 24, 66}

La estandarización tanto de los genes endógenos como de concentración, se realizó en muestras de pacientes en las cuales estaban incluidos muestras tanto de linaje T y B como de niños y adultos, ya que eran estas mismas muestras de pacientes el material de trabajo que sería utilizado para la evaluación de los niveles de expresión del grupo de genes seleccionados.

El método utilizado para el cálculo de los niveles de expresión de los genes endógenos fue el método $2^{-\Delta CT}$, el cual ya ha sido probado previamente para analizar datos de expresión relativa cuando se están evaluando genes candidatos para controles internos.⁶⁷

Al graficar (Fig. 5) los niveles de expresión de los 4 genes endógenos probados (GAPDH, RPL13A, B2M, HPRT1) en las 8 muestras de pacientes con LLA, podemos observar que los dos genes que menos varían en todos los pacientes son RPL13A y HPRT1, en comparación con GAPDH y B2M que mostraron una mayor discrepancia en sus niveles de expresión en el conjunto de muestras analizadas, siendo una menor variación lo que se busca al seleccionar los genes que servirán como controles internos, ya que esto es sinónimo de constancia en expresión independientemente del tratamiento y variación de cada paciente, por lo cual se seleccionaron los genes RPL13A y HPRT1 quedando demostrado estadísticamente (ANOVA de una vía) por sus niveles de p mayores, que estos eran los mejores dos genes endógenos a utilizar.

Para la selección de la concentración se espera que la mejor sea aquella que con una menor cantidad de cDNA muestre el mismo nivel de expresión para el gen a evaluar que aquella con una mayor cantidad de cDNA. Para este ensayo se utilizó un gen subexpresado y otro sobre expresado tratando de abarcar ambos rangos de expresión. En la Fig. 6, se observa que los niveles de expresión de Pax5 (gen reportado como subexpresado) en las muestras LLA-81 y LLA-87 se mantiene constante en las 4 diluciones, y que para las muestras LLA-44, LLA-69 y LLA-93 muestra una expresión constante en las diluciones de 15, 10 y 5ng, pero disminuye en la última dilución de 2.5ng, por lo que se concluye que la mínima concentración a la que Pax5 muestra una expresión constante es la de 5ng totales por pozo de reacción.

El gen DEFA1 (gen reportado como sobre-expresado) solo muestra una expresión constante en las cuatro diluciones de la muestra LLA-87, pero en las muestras LLA-69 y LLA-81 muestra un incremento de expresión conforme disminuye la concentración, esto se puede explicar debido a que para obtener los niveles de expresión por medio del método $2^{-\Delta\Delta CT}$, primero se hace una normalización del promedio del CT del gen a evaluar menos el promedio del CT del gen endógeno, así que tal vez al disminuir la concentración de cDNA se disminuya también la expresión del gen endógeno, y al disminuir su valor por ende hay un incremento en el resultado del nivel de expresión para DEFA1, por lo que se procedió a correlacionar linealmente los valores de Ct vs Log de la concentración para cada uno de los genes evaluados en las 4 diferentes diluciones de las muestras LLA-69 y LLA-81, mostrándose en dichas gráficas (Fig. 7) que tanto PAX5 como DEFA1 y RPL13A mantienen una correlación lineal cercana al 0.999 en las 3 muestras evaluadas (LLA-69, LLA-81 y el pool), lo cual significa que la expresión se mantiene constante en cualquiera de las 4 diluciones; según lo reportado en la literatura, la mejor concentración es aquella en la cual se mantiene una correlación lineal y da el mayor CT de todas las diluciones probadas, por lo cual bajo este criterio, la mejor

concentración sería la de 15ng, pero por cuestiones de cantidad de cDNA se seleccionó para trabajar la concentración de 10ng totales por pozo de reacción.

Se seleccionaron 47 genes a los cuales se les evaluó su nivel de expresión en muestras de seguimiento de pacientes con LLA por medio de qPCR, de éstos genes, 6 (PLCG2, CDKN2A, TMSL8, AP1B1, DEFA1, IL2RA) habían sido previamente propuestos como posibles biomarcadores en muestras analizadas al diagnóstico, mediante SNPs, y microarreglos de expresión en los trabajos descritos en antecedentes directos^{64, 65}, 5 genes (TP53, PAX5, FLT3, MYC, CASP8AP2) fueron referenciados de la literatura^{59, 61, 62}, y 2 genes endógenos (RPL13A, HPRT1) para ser utilizados durante la normalización de resultados.

Uno de los métodos más comunes para analizar datos obtenidos de qPCR es la cuantificación relativa, la cual relaciona la señal de PCR de un transcrito de un gen blanco en un grupo con tratamiento contra el mismo en un grupo sin tratamiento o sano, ambos valores relativos a la expresión de un gen control interno. El método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es una manera muy conveniente para analizar los cambios de expresión relativos en los genes, dándonos como resultado los niveles de expresión de cada gen, tomándose el valor de 1 como el valor de referencia de expresión normal, siendo todo valor por arriba de 1 sobre expresado y toda valor por debajo de 1 subexpresado.⁶⁸

El análisis bilateral de la variancia por jerarquías de Friedman es la prueba estadística no paramétrica que se utiliza con mayor frecuencia para comparar una misma variable en mediciones que se hacen sobre cada individuo en dos o más ocasiones distintas (puntos distintos en el tiempo).⁶⁹ siendo esta prueba la que se utilizó en el análisis de los resultados de los niveles de expresión para decidir que genes estaban diferencialmente expresados en las tres muestras (una al diagnóstico y dos de seguimiento) respecto a su media.

En la primera comparación en la que se incluyeron todas las muestras de todos los pacientes, se obtuvieron doce genes diferencialmente expresados, los cuales son **BCL11A, STAT5, BCL2A1, OPAL1, FLT3, RXRA, FOS, SORT1, HK2, SL00A8, CD44 y PAX5**, cuyo valor de p obtenido y función se encuentran descritos en la tabla 16, actuando entre las principales funciones como reguladores de la transcripción, activadores anti y pro-apoptóticos, reguladores de la hematopoyesis, predictores de leucemias, proliferación y diferenciación celular, entre otras, de estos genes los dos más significativos son BCL2A1 y OPAL1, el primero ya ha sido previamente correlacionada su

expresión con el genotipo de las células precursoras de linfocitos B, siendo un regulador crítico en el crecimiento y diferenciación de los linfocitos, reportándose como marcador en la delimitación de las etapas en el desarrollo de los precursores B en LLA.⁷⁰, y como factor de valor pronóstico favorable y de ELE en niños con LLA-B cuando se encuentra altamente expresado en pacientes de riesgo bajo,⁷¹ además también ha sido reportado como marcador pronóstico en otras enfermedades como Linfoma No-Hodgkin y Lupus Eritematoso.^{72, 73} OPAL1 ha sido reportado como marcador para el diagnóstico de LLA de linaje B.⁷⁴ y como un gen subexpresado en pacientes con LLA, lo que provoca una no diferenciación en los progenitores de linfocitos B.⁶² Ambos genes se relacionan con la diferenciación de linfocitos B y han sido propuestos como marcadores diagnósticos en LLA, pero no de seguimiento.

Al relacionar la expresión de estos 12 genes significativos con la recaída y/o muerte de los pacientes mediante un análisis de supervivencia se mostró que hay 7 genes significativos indicadores de riesgo a recaída pero solamente en niños, ya que en adultos no fue significativo ningún gen, estos 7 genes son: **FLT3, IL10, SL00A8, BCL11A, CD44, STAT5 y SORT1**, de los cuales FLT3 fue el único gen significativo en Niños, indicador de riesgo a recaída durante el primer mes de la enfermedad, observándose ligeramente sobreexpresado al diagnóstico, con una elevación en sus niveles de expresión al mes de progresión de la enfermedad.

El gen FLT3 es un regulador de la hematopoyesis⁷⁵, el cual ya ha sido previamente reportado como alterado en leucemias promielocíticas agudas⁷⁶. La mutación y sobreexpresión de este gen, se ha relacionado con un mal pronóstico en leucemias mieloides agudas, proponiéndose como marcador de riesgo para este tipo de leucemia⁷⁷⁻⁷⁹. Por los resultados obtenidos y lo anteriormente mencionado en este trabajo se propone al gen FLT3 como un marcador indicador de riesgo de recaída (mal pronóstico) cuando se encuentra sobreexpresado en niños.

Debido a que el gen de Pax5 resultó significativamente expresado en muestras de seguimiento de pacientes con LLA de linaje B, y que estudios previos realizados en nuestros antecedentes directos en los cuales se analizaron por hibridación genómica comparativa en microarreglo de 287 clonas de BACs de genes relacionados al cáncer, GenoSensor Array 300, Vysis/Abbott y por análisis de intensidad de hibridación con un microarreglos de SNP (500,000 SNP), GeneChip Human Mapping 500k (Affymetrix), muestras de DNA de pacientes con LLA, en donde se observó que el gen de Pax5 no presentaba alteraciones en el número de copias, es decir no presentó pérdidas ni ganancias

en su material genético,⁶⁴ pero si resultó subexpresado en muestras al diagnóstico de pacientes con LLA-B en un trabajo realizado por microarreglos (HG U133 Plus 2.0) y validado por qPCR,⁶⁵ lo cual correspondía con lo reportado en la literatura.⁶² Por lo anterior se concluyó que la alteración en la expresión de este gen en muestras de LLA podría deberse a mutaciones puntuales por lo que se procedió a caracterizarlo.

El gen de PAX5 (paired box 5) es un miembro de la familia de factores de transcripción PAX, los cuales tienen como característica central un dominio altamente conservado de unión al DNA, conocido como caja pareada, las proteínas de PAX son importantes reguladores en etapas tempranas de desarrollo celular, y alteraciones en la expresión de sus genes contribuyen a transformaciones neoplásicas. PAX5 codifica específicamente en linfocitos de linaje B, una proteína activadora (BSAP) que es expresada en etapas tempranas pero no tardías de diferenciación celular B, actúa activando transcripcionalmente a los genes CD19, MB-1 y BLNK, y reprimiendo transcripcionalmente a los genes MCSFR, NOTCH1 y FLT3. Este gen está localizado en el cromosoma 9p13, mide 195.946 Kb y está constituido por 10 exones (midiendo su secuencia codificante 3.65 Kb) y un promotor.

El gen de PAX5 es blanco frecuente de aberraciones en LLA de la niñez. En el 30% de los casos, los precursores de las células B muestran pérdidas monoalélicas o mutaciones puntuales, indicando que estas alteraciones podrían resultar en haploinsuficiencia, en reducidos niveles de proteína codificada o en la generación de alelos hipomórficos.⁶²

En este trabajo, la caracterización de PAX5 reveló una mutación puntual en la región intrónica vecina al exón 2 de una G/T en la posición 494pb en 11 muestras; en el exón 8 un cambio nucleotídico de C/G en la posición 86 en 5 muestras, un cambio de G/A en la posición 89 en 3 muestras, y un cambio de G/T en la posición 101 en 2 muestras; y en el exón 10 un cambio nucleotídico de una C/T en la posición 11pb en 1 de 9 muestras seleccionadas. Ninguno de los cambios nucleotídicos encontrados en dichos exones afectó la secuencia aminoacídica, ni la estructura de la proteína codificada por PAX5; por lo que por los resultados anteriores, es importante destacar que durante el desarrollo normal de las células B, PAX5 está sujeto a regulación alelo específica, con únicamente un alelo de PAX5 transcribiendo durante la fase temprana del desarrollo de las células B, y un cambio a expresión bi-alélica durante la diferenciación celular B, por lo que la pérdida o mutación en un alelo normal de PAX5 podría eliminar la habilidad para cambiar a una transcripción bi-alélica durante la diferenciación, lo cual podría contribuir directamente a un arresto de la diferenciación visto en LLA; aunque las alteraciones

heterocigotas de PAX5 pudieran tener únicamente efectos sutiles y en combinación con otras lesiones oncogénicas contribuir directamente a la leucahemogénesis.⁸⁰

Actualmente el diagnóstico y monitoreo de la ERM esta basado principalmente en criterios morfológicos, citoquímicos, histológicos e inmunohistoquímicos, técnicas que presentan un gran componente subjetivo, por lo que recientemente se han incluido técnicas de inmunofenotipificación mediante citometría de flujo, usando marcadores asociados a LLA, y FISH, en el monitoreo de la ERM, estas dos técnicas constituyen herramientas de gran utilidad por su rapidez, precisión y mayor sensibilidad, teniendo la capacidad para detectar una célula anormal en 1,000 a 10,000 células, obteniéndose los resultados de 24 a 48 horas y teniendo aplicabilidad a todos los pacientes,⁸¹ sin embargo, en este trabajo se propone a la técnica de qPCR como la mejor en el monitoreo de la ERM, ya que presenta un alto grado de sensibilidad pudiendo detectar una célula anormal en 10,000 a 1,000,000 células, obteniéndose los resultados en un máximo de 24 horas, siendo aplicable a todos los pacientes, pudiéndose analizar un amplio numero de marcadores y por su bajo costo.

Este trabajo es el primero que analiza muestras de seguimiento de pacientes con LLA en una población mexicana, permitiendo de esta manera evaluar a través del tiempo y del tratamiento, la utilidad y eficacia de los genes marcadores propuestos en el seguimiento de la respuesta al tratamiento, monitoreo de la ERM y el valor pronóstico en LLA enfocado en nuestra población.

11.0 CONCLUSIÓN

1. Es importante comprender que la LLA es una enfermedad muy heterogénea desde los puntos de vista clínico y biológico y que una evaluación y seguimiento inadecuado puede resultar catastrófico para el paciente, por lo cual, conocer cada tipo de leucemia y sus características morfológicas, biológicas, inmunológicas y genéticas, permitirán establecer un diagnóstico y monitoreo para cada grupo o subgrupo de la enfermedad, y a la vez determinar el tratamiento idóneo.
2. La importancia de la LLA radica en que presenta una elevada incidencia y mortalidad en población infantil o adulta joven, situación que tiene gran impacto en los niveles de salud y en el nivel socio-económico de la población, debido al número de años de vida potencialmente perdidos.
3. Se logró identificar 7 genes potenciales biomarcadores en niños, de los cuales solamente el gen FLT3 es constante en ambos géneros (niños y niñas), siendo el único gen significativo en niñas durante el primer mes de la enfermedad, proponiéndose como biomarcador pronóstico debido a que su alta expresión se relaciona con mayor riesgo de recaída y menor sobrevivencia, útil para el monitoreo de la ERM en niños.
4. La caracterización de PAX5 reveló una mutación puntual en la región intrónica vecina al exón 2 de una G/T en la posición 494pb en 11 muestras; en el exón 8 un cambio nucleotídico de C/G en la posición 86 en 5 muestras, un cambio de G/A en la posición 89 en 3 muestras, y un cambio de G/T en la posición 101 en 2 muestras; y en el exón 10 un cambio nucleotídico de una C/T en la posición 11pb en 1 de 9 muestras seleccionadas. Sin embargo, ninguno de los cambios nucleotídicos encontrados en dichos exones afectó la secuencia aminoacídica, ni la estructura de la proteína codificada por PAX5.
5. Para lograr alcanzar los porcentajes de ELE reportados en la literatura, se requiere no solo de conjuntar los parámetros biológicos y clínicos, sino de integrar genes biomarcadores propuestos en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, con la finalidad de conjuntar un tratamiento orientado para cada grupo de pacientes.

12.0 PERSPECTIVAS

Para una evaluación más completa y robusta de los niveles de expresión génica se requiere de estudios en los que se incluyan un mayor número de muestras de pacientes, evaluados con un mayor número de muestras tomadas a diferentes tiempos, para hacer una correlación completa de supervivencia evaluando diferentes etapas del estado clínico.

Es interesante secuenciar y evaluar la expresión del promotor del gen de Pax5, ya que su alteración podría deberse a mutaciones a nivel del promotor que afecten su expresión.

Es necesaria la caracterización de los genes FLT3, IL10, SL00A8, BCL11A, CD44, STAT5 y SORT1, para analizar las posibles alteraciones génicas contenidas en ellos que podrían causar su alteración a nivel de expresión, y una vez caracterizados transportarlos a la plataforma de citometría de flujo, ya que esta técnica es la más empleada en los laboratorios de hematología, para su evaluación como biomarcadores en el monitoreo de la ERM.

13.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Jaime Pérez, J.C. & Gómez Almaguer, D. in Hematología. La sangre y sus enfermedades 77-82 (McGraw-Hill Interamericana, México, 2005).
2. Tirado Gómez, L.L. & Mohar Betancourt, A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas. *Cancerología 2*, 109 - 120 (2007).
3. Juarez-Ocana, S. et al. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). *BMC Cancer 4*, 50 (2004).
4. Fajardo-Gutierrez, A. et al. Incidence of malignant neoplasms in children attending Social Security Hospitals in Mexico City. *Med Pediatr Oncol 29*, 208-12 (1997).
5. McKenzie, S.B. in Hematología Clínica (ed. McKenzie, S.B.) 453-480 (Manual Moderno, San Antonio; TX, 2000).
6. Bennett, J.M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol 33*, 451-8 (1976).
7. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Report of the workshop held in Leuven, Belgium, April 22-23, 1985. First MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet 23*, 189-97 (1986).
8. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias. Report of the Workshop held in Leuven, Belgium, September 15-17, 1986. Second MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet 30*, 1-15 (1988).
9. del Canizo, M. et al. Discrepancies between morphologic, cytochemical, and immunologic characteristics in acute myeloblastic leukemia. *American journal of clinical pathology 88*, 38-42 (1987).
10. Neame, P.B. et al. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood 68*, 1355-62 (1986).
11. Lee, G. in Philadelphia (Lea & Febiger, 1993).
12. Behm, F.G. in Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research (ed. Pui, C.-H.) 51 (Human Press, Totowa, New Jersey, 2003).
13. Gómez Almaguer, D. et al. Reunión Mexicana de Consenso sobre Tratamiento Actualizado de la Leucemia Aguda Linfoblástica en Pacientes Pediátricos, 2006. *Revista de Hematología 8*, S2-S18 (2007).
14. Zhang, M.J. et al. Long-term follow-up of adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission treated with chemotherapy or bone marrow transplantation. The Acute Lymphoblastic Leukemia Working Committee. *Ann Intern Med 123*, 428-31 (1995).
15. Larson, R.A. et al. A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood 85*, 2025-37 (1995).
16. Gaynor, J. et al. A cause-specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia: the Memorial Hospital experience since 1969. *J Clin Oncol 6*, 1014-30 (1988).
17. Hoelzer, D. et al. Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood 71*, 123-31 (1988).
18. Sancho, J.M. et al. Central nervous system recurrence in adult patients with acute lymphoblastic leukemia: frequency and prognosis in 467 patients without cranial irradiation for prophylaxis. *Cancer 106*, 2540-6 (2006).
19. Sancho, J.M. et al. Compassionate use of intrathecal depot liposomal cytarabine as treatment of central nervous system involvement in acute leukemia: report of 6 cases. *Haematologica 91*, ECR02 (2006).

20. Hilden, J.M. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* 108, 441-51 (2006).
21. Paredes, R. in Actualización en Leucemias (eds. Ruiz Argüelles, G. & San Miguel, J.) 41-44 (Editorial médica panamericana, 1997).
22. Campana, D. & Pui, C.H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85, 1416-34 (1995).
23. Greaves, M.F. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 349, 344-9 (1997).
24. Coustan-Smith, E. et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96, 2691-6 (2000).
25. Pui, C.H. Acute leukemia in children. *Curr Opin Hematol* 3, 249-58 (1996).
26. Raimondi, S.C. et al. Cytogenetics of childhood T-cell leukemia. *Blood* 72, 1560-6 (1988).
27. Hart, J.S., Trujillo, J.M., Freireich, E.J., George, S.L. & Frei, E., 3rd. Cytogenetic studies and their clinical correlates in adults with acute leukemia. *Ann Intern Med* 75, 353-60 (1971).
28. Freireich, E.J. et al. Cytogenetics for detection of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 6, 500-6 (1992).
29. Lion, T. Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 10, 1843 (1996).
30. Hochhaus, A. et al. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 88, 2236-40 (1996).
31. Kasprzyk, A. & Secker-Walker, L.M. Increased sensitivity of minimal residual disease detection by interphase FISH in acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy. *Leukemia* 11, 429-35 (1997).
32. Nylund, S.J., Ruutu, T., Saarinen, U. & Knuutila, S. Metaphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in the follow-up of 60 patients with haemopoietic malignancies. *Br J Haematol* 88, 778-83 (1994).
33. White, D.M., Crolla, J.A. & Ross, F.M. Detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia using fluorescence in-situ hybridization. *Br J Haematol* 91, 1019-24 (1995).
34. el-Rifai, W., Larramendy, M.L., Bjorkqvist, A.M., Hemmer, S. & Knuutila, S. Optimization of comparative genomic hybridization using fluorochrome conjugated to dCTP and dUTP nucleotides. *Lab Invest* 77, 699-700 (1997).
35. Zhao, L. et al. Detection of residual leukemic cells in patients with acute promyelocytic leukemia by the fluorescence in situ hybridization method: potential for predicting relapse. *Blood* 85, 495-9 (1995).
36. Tkachuk, D.C. et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* 250, 559-62 (1990).
37. Amiel, A. et al. Detection of minimal residual disease state in chronic myelogenous leukemia patients using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 76, 59-64 (1994).
38. Sinclair, P.B., Green, A.R., Grace, C. & Nacheva, E.P. Improved sensitivity of BCR-ABL detection: a triple-probe three-color fluorescence in situ hybridization system. *Blood* 90, 1395-402 (1997).
39. Dewald, G.W. et al. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 91, 3357-65 (1998).
40. Engel, H. et al. Minimal residual disease in acute myelogenous leukaemia and myelodysplastic syndromes: a follow-up of patients in clinical remission. *Br J Haematol* 99, 64-75 (1997).
41. Campana, D., Coustan-Smith, E. & Janossy, G. Immunophenotyping in haematological diagnosis. *Baillieres Clin Haematol* 3, 889-919 (1990).

42. Stelzer, G.T., Shults, K.E., Wormsley, S.B. & Loken, M.R. Detection of occult lymphoma cells in bone marrow aspirates by multi-dimensional flow cytometry. *Prog Clin Biol Res* 377, 629-35 (1992).
43. Farahat, N. et al. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 101, 158-64 (1998).
44. Ciudad, J. et al. Immunophenotypic analysis of CD19+ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 83, 1069-75 (1998).
45. Ciudad, J. et al. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 16, 3774-81 (1998).
46. van Wering, E.R. et al. Immunophenotypic changes between diagnosis and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 9, 1523-33 (1995).
47. Rowley, J.D. Chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. *Ann Clin Lab Sci* 13, 87-94 (1983).
48. Rabbitts, T.H. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-9 (1994).
49. Evans, W.E., Relling, M.V., Boyett, J.M. & Pui, C.H. Does pharmacokinetic variability influence the efficacy of high-dose methotrexate for the treatment of children with acute lymphoblastic leukemia: what can we learn from small studies? *Leuk Res* 21, 435-7 (1997).
50. Cimino, G., Rapanotti, M.C., Sprovieri, T. & Elia, L. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 83, 350-7 (1998).
51. Pongers-Willemsse, M.J. et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13, 110-8 (1999).
52. Radich, J.P. et al. Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 346 patients. *Blood* 85, 2632-8 (1995).
53. Radich, J. et al. Detection of bcr-abl transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation. *Blood* 89, 2602-9 (1997).
54. Serrano, J. et al. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 95, 2659-65 (2000).
55. van Dongen, J.J. et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 352, 1731-8 (1998).
56. Bedi, A. et al. BCR-ABL gene rearrangement and expression of primitive hematopoietic progenitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81, 2898-902 (1993).
57. Yeoh, E.J. et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1, 133-43 (2002).
58. Kohlmann, A. et al. Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 396-405 (2003).
59. Willenbrock, H., Juncker, A.S., Schmiegelow, K., Knudsen, S. & Ryder, L.P. Prediction of immunophenotype, treatment response, and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia using DNA microarrays. *Leukemia* 18, 1270-7 (2004).
60. Kuchinskaya, E. et al. Children and adults with acute lymphoblastic leukaemia have similar gene expression profiles. *Eur J Haematol* 74, 466-80 (2005).
61. Flotho, C. et al. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* 108, 1050-7 (2006).
62. Mullighan, C.G. et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758-64 (2007).

63. Martin, S.B. et al. Gene expression overlap affects karyotype prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21, 1341-4 (2007).
64. Macías García, B.A. in *Bioquímica y Medicina Molecular* 119 (Facultad de Medicina UANL., Monterrey, 2007).
65. Lugo Trampe, A. in *Bioquímica y Medicina Molecular* 99 (Facultad de Medicina UANL, Monterrey, 2008).
66. Flotho, C. et al. A set of genes that regulate cell proliferation predict treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (2007).
67. Schmittgen, T.D. & Zakrajsek, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46, 69-81 (2000).
68. Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-8 (2008).
69. Wayne W., D. in *Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud* (ed. Wayne W., D.) 295-399 (Limusa Wiley, 2008).
70. Vaskova, M. et al. CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis. *Tissue Antigens* 71, 57-66 (2008).
71. Troeger, A. et al. High expression of CD40 on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia blasts is an independent risk factor associated with improved survival and enhanced capacity to up-regulate the death receptor CD95. *Blood* 112, 1028-34 (2008).
72. Kok, M., Bonfrer, J.M., Korse, C.M., de Jong, D. & Kersten, M.J. Serum soluble CD27, but not thymidine kinase, is an independent prognostic factor for outcome in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Tumour Biol* 24, 53-60 (2003).
73. Wei, C. et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178, 6624-33 (2007).
74. Tiacci, E. et al. PAX5 expression in acute leukemias: higher B-lineage specificity than CD79a and selective association with t(8;21)-acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 64, 7399-404 (2004).
75. Weisel, K.C., Yildirim, S., Schweikle, E., Kanz, L. & Mohle, R. Regulation of FLT3 and its ligand in normal hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 88, 203-11 (2009).
76. De Lourdes Chauffaille, M., Borri, D., Proto-Siqueira, R., Moreira, E.S. & Alberto, F.L. Acute promyelocytic leukemia with t(15;17): frequency of additional clonal chromosome abnormalities and FLT3 mutations. *Leuk Lymphoma* 49, 2387-9 (2008).
77. Schlenk, R.F. & Dohner, K. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 16, 98-104 (2009).
78. Sritana, N. & Auewarakul, C.U. KIT and FLT3 receptor tyrosine kinase mutations in acute myeloid leukemia with favorable cytogenetics: two novel mutations and selective occurrence in leukemia subtypes and age groups. *Exp Mol Pathol* 85, 227-31 (2008).
79. Grosjean-Raillard, J. et al. Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Apoptosis* 13, 1148-61 (2008).
80. Nutt, S.L. et al. Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat Genet* 21, 390-5 (1999).
81. Zwick, D., Cooley, L. & Hetherington, M. Minimal residual disease testing of acute leukemia by flow cytometry immunophenotyping: a retrospective comparison of detection rates with flow cytometry DNA ploidy or FISH-based methods. *Lab Hematol* 12, 75-81 (2006).

Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Protocolo:

“Búsqueda de marcadores moleculares para el monitoreo de la Enfermedad Residual Mínima en pacientes con Leucemias Agudas”

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por éste medio y de manera oral, se le invita a usted (o al padre o tutor en el caso de menores de edad) a participar en el protocolo de investigación: “Búsqueda de marcadores moleculares para el monitoreo de la Enfermedad Residual Mínima en pacientes con Leucemias Agudas”, en el cual, de manera sencilla y entendible se describe brevemente a continuación:

Las leucemias agudas, ya sea Mieloide o Linfoide se presentan tanto en niños como en adultos, y una vez diagnosticada, se procede al tratamiento. Actualmente, durante la etapa de tratamiento se monitorea la respuesta a éste cada vez que se le toma una muestra de sangre. Los métodos de monitoreo tradicionales si bien son eficaces, no pueden predecir recaídas ni respuestas al tratamiento por si solos, además de que necesita un incremento dramático en el número de células leucémicas para determinar que el tratamiento no está funcionando, y que es necesario incrementar la intensidad o cambiar el esquema de tratamiento. En la actualidad existe un método para el monitoreo de la respuesta al tratamiento que se utiliza ampliamente en los países de primer mundo, el cual permite predecir recaídas y respuesta al tratamiento de 2 a 4 semanas de anticipación, pero presenta como principal desventaja el costo y tiempo que éste implica. También, existe una variante de éste método que es aplicable en hasta un 40% de los pacientes con Leucemias Agudas, el cual es de un costo mucho menor y con una eficiencia del 100% respecto al monitoreo, sin embargo, no se realiza actualmente en nuestro país. Para el 60% de los pacientes que no son evaluables por ésta metodología es necesario buscar la manera de poder monitorear la respuesta al tratamiento, por lo que en éste estudio se plantea el desarrollo de un método sencillo y de bajo costo, además de eficaz para monitorear al paciente. Entre las ventajas que presentan éste tipo de estudios se encuentran: el diagnóstico con precisión de la Leucemia Aguda, predicción de recaídas y respuesta al tratamiento con anticipación, lo que permite administrar un tratamiento personalizado basado en éstos hallazgos, es decir, administrar un tratamiento más intenso a los pacientes con predisposición a recaídas o que no responden al tratamiento; o disminución en la intensidad y frecuencia de aplicación del tratamiento en los pacientes que si responden a éste; todo esto con anticipación, de manera que el paciente no llegue a presentar síntoma alguno de recaída. Al paciente de recién diagnóstico se le tomarán por única ocasión tres pequeños tubos de muestra, y para la siguiente toma sucesiva, así como para los pacientes con tratamiento en curso y en seguimiento, un tubo de muestra extra a la que de manera rutinaria se le venía tomando en cada cita. Los resultados

que se obtengan de las muestras se irán anexando al expediente, y reportando al médico tratante, para que el tome decisiones con base en ellos, con beneficio para el paciente y la institución tratante, pues tendrá un tratamiento más eficaz y menos prolongado, disminuyendo también costos de tratamiento para la institución tratante y los familiares, junto con todo lo que ello implique.

Una vez enterado de la importancia del proyecto, se le exhorta a leer las siguientes cláusulas:

- Se me ha explicado que padezco un tipo de leucemia aguda y que se me propone participar en un proyecto de investigación que tiene como objetivo monitorear mi enfermedad con nuevas tecnologías.
- Se me ha informado que se tomarán muestras de sangre periférica de manera sucesiva y por el tiempo que dure el estudio. Estas muestras son adicionales al estudio que requiere mi enfermedad, y como cualquier toma de sangre, puede causar moretones y pequeños sangrados que se resolverán rápidamente siguiendo las indicaciones del médico.
- Los resultados de este estudio ayudarán a diagnosticar mejor mi enfermedad y el de otros pacientes a mediano plazo.
- Se me explicó que fui elegido de manera aleatoria y que los estudios no interfieren en el curso de mi enfermedad ni en mi tratamiento.
- Se me aclaró que puedo abandonar el estudio cuando yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico y hospital.
- Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.
- El estudio me es proporcionado gratuitamente por el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Este estudio y sus procedimientos me han sido explicados a mi entera satisfacción, en mi propio idioma, y se me ha proporcionado una copia de este informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a mi entera satisfacción. Por lo tanto he decidido participar voluntariamente en el proyecto titulado: “Búsqueda de marcadores para el monitoreo de la Enfermedad Residual Mínima en pacientes con Leucemia Aguda”

Datos a llenar por el Investigador

Nombre del Paciente: _____ Edad: _____ Sexo: M F

Fecha: _____ Primera Muestra Seguimiento (Inicio de Tx: _____)

Población de Origen: _____ Seguirá todo el Tx en el CUCC: Si No

Dx: _____ IFT: _____ Código: _____

Estudio de cariotipo o FISH previo: Si (Resultado: _____) No

Nombre y firma del paciente o responsable legal: _____

Nombre, y firma del testigo 1: _____

Nombre, y firma del testigo 2: _____

Nombre y firma del Investigador Responsable: Dra. Rocío Ortiz López _____

Para preguntas o comentarios comunicarse con:

Dra. Rocío Ortiz López,
MC. Ángel Lugo Trampe,
QCB. Idalia Garza Veloz

Al teléfono 8348 5287 o al 8329 41 74, ext. 2592

O bien escribir un correo electrónico a:

Idalia_garza@hotmail.com, lugoweb_2@hotmail.com, rortiz@fm.uanl.mx