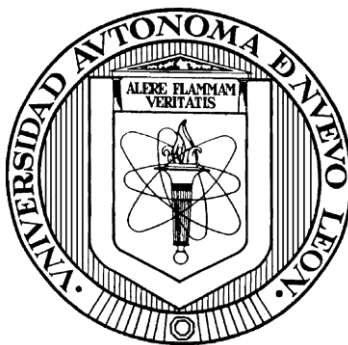


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Por

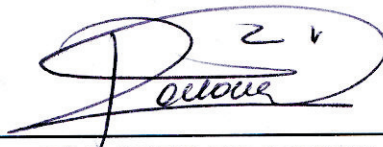
MC. ÁNGEL LUGO TRAMPE

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

Marzo, 2008

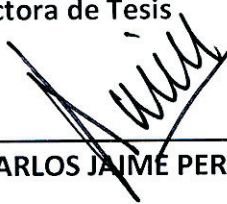
ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA

Aprobación de la Tesis:



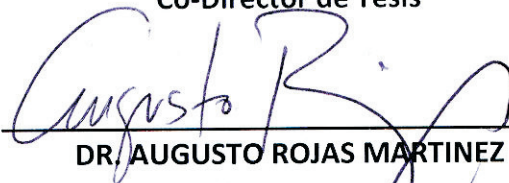
DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ

Directora de Tesis



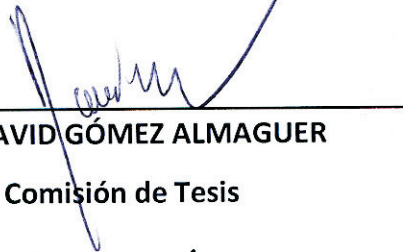
DR. JOSÉ CARLOS JAIME PEREZ

Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ

Comisión de Tesis



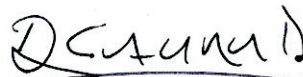
DR. DAVID GÓMEZ ALMAGUER

Comisión de Tesis



DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRÍGUEZ

Comisión de Tesis



Dionicio A. Galarza Delgado

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Servicio de Hematología del Centro Universitario contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y con el Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Vo. Bo.

DRA. ROCIO ORTIZ LÓPEZ
Directora de Tesis

INDICE

	Página
Lista de Figuras	
Lista de Cuadros	
Abreviaturas	
Resumen	
1. Antecedentes	1
1.1 Definición	1
1.2 Epidemiología	1
1.3 Etiología	3
1.4 Diagnóstico y Clasificación	4
1.4.1 Morfología	5
1.4.2 Citoquímica e Inmunofenotipificación	5
1.4.3 Anormalidades Citogenéticas y Moleculares	8
1.5 Pronóstico	10
1.5.1 Enfermedad Residual Mínima y Estimación del Riesgo	11
1.5.1.1 Detección de ERM por Citometría de Flujo	14
1.5.1.2 Detección de ERM basada en la PCR	14
1.5.1.3 Estimación del Riesgo Aplicando el Monitoreo de la ERM	17
1.5.1.4 Genes Candidatos como Marcadores para el Monitoreo de la ERM Identificados con Microarreglos de Expresión Génica	19
2. Justificación	22
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. Material y Métodos	24
4.1 Estrategia Experimental	24
4.2 Sujetos de Estudio	25
4.2.1 Criterios de Inclusión	25

	Página
4.2.2 Criterios de Exclusión	25
4.2.3 Criterios de Eliminación	25
4.3 Toma de Muestras	25
4.4 Procesamiento de la Muestra	26
4.4.1 Separación de Células Mononucleares	26
4.4.2 Purificación de Tipos Celulares	27
4.4.3 Extracción de DNA Genómico	28
4.4.4 Extracción de RNA Total	29
4.4.5 Verificación de Calidad del RNA	31
4.4.5.1 Preparación de la Matriz en Gel	31
4.4.5.2 Desnaturalización de la Muestra	31
4.4.5.3 Preparación y Corrimiento de la Electroforesis Capilar	31
4.4.6 Marcaje de Muestras e Hibridación con Microarreglos	32
4.4.6.1 Dilución de Controles de RNA Poly-A	33
4.4.6.2 Síntesis de la Primera Hebra de cDNA	34
4.4.6.3 Síntesis de la Segunda Hebra de cDNA	35
4.4.6.4 Limpieza del cDNA de Doble Cadena	36
4.4.6.5 Reacción de Transcripción In vitro	37
4.4.6.6 Purificación y Cuantificación del cRNA Biotinilado	37
4.4.6.7 Fragmentación del cRNA	39
4.4.6.8 Hibridación de las Muestras	39
4.4.6.9 Lavado, Tinción y Escaneado del Microarreglo	41
4.5 Procesamiento y Análisis de los Resultados de Microarreglos de Expresión Génica	43
4.6 Análisis de Vías de los Genes Diferencialmente Expresados	45
4.7 Validación por qPCR-Array de Genes Diferencialmente Expresados	46
4.7.1 Preparación del cDNA	46
4.7.2 PCR Cuantitativa en Arreglo (qPCR-Array)	47

	Página
5. Resultados	49
5.1 Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los pacientes con LLA capturados.	49
5.2 Selección de muestras para la realización de perfiles de expresión génica	49
5.3 Marcaje de hibridación de muestras, y escaneado de microarreglos	51
5.4 Normalización de datos de microarreglos con replicados técnicos	52
5.5 Normalización global de datos de microarreglos de expresión génica	52
5.6 Selección de genes expresados diferencialmente	54
5.6.1 Selección de genes diferencialmente expresados	57
5.6.1.1 Selección por linaje: LLA-T & LLA-B	57
5.6.1.2 Selección por grupos de edad: Niños y Pediátricos & Adultos	57
5.6.1.3 Selección por edad y LLA de linaje T	59
5.6.1.4 Selección por edad y LLA de linaje B	60
5.6.1.5 Selección de acuerdo al pronóstico terapéutico	61
5.6.1.6 Selección en pacientes de buen pronóstico terapéutico	62
5.6.1.7 Selección en pacientes de mal pronóstico terapéutico	62
5.7 Análisis de vías	65
5.8 Validación por qPCR-ARRAY de genes diferencialmente expresados	71
5.8.1 Optimización de qPCR-ARRAY	73
5.8.2 Comparación de niveles de expresión	77
5.8.2.1 Comparación por linaje: LLA-T & LLA-B	77
5.8.2.2 Comparación por grupos de edad: niños & adultos	79
5.8.2.3 Comparación por sexo: hombres & mujeres	80
5.8.2.4 Comparación por hallazgos en el cariotipo	80
5.8.2.5 Comparación por grupos de riesgo de recaída: alto & habitual	82
5.8.2.6 Clustering de resultados de qPCR-ARRAY	83

	Página
6. Discusión	85
7. Conclusiones	91
8. Perspectivas	92
9. Bibliografía	93
10. Anexos	99

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de la LLA de Acuerdo al Inmunofenotipo	7
Cuadro 2. Anormalidades Moleculares en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	8
Cuadro 3. Características de las Técnicas Utilizadas para el Monitoreo de la ERM en LLA	17
Cuadro 4. Principales Estudios del Monitoreo de la ERM vado en PCR en LLA	20
Cuadro 5. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los pacientes	50
Cuadro 6. Características de las muestras de pacientes con LLA seleccionadas para la determinación de su perfil de expresión génica	51
Cuadro 7. Reporte del control de calidad de un microarreglo HG U133 Plus 2.0	53
Cuadro 8. Grupos de variables comparadas en microarreglos	57
Cuadro 9. Resumen de genes diferencialmente expresados	63
Cuadro 10. Genes con mayor expresión diferencial en la comparación de niños & adultos en LLA-T y en LLA-B	64
Cuadro 11. Genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-T agrupados según función alterada	66
Cuadro 12. Funciones y padecimientos alterados asociados a genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-T	66
Cuadro 13. Genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-B agrupados según función alterada	67
Cuadro 14. Funciones y padecimientos alterados asociados a genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-B	68
Cuadro 15. Características de oligonucleótidos empleados para validar los niveles de expresión por PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-ARRAY)	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Morfología de Blastos en la Leucemia Linfoblástica Aguda	6
Figura 2. Comparación de los niveles de sensibilidad de los métodos utilizados para el monitoreo de la Enfermedad Residual Mínima.	13
Figura 3. Estrategia General	24
Figura 4. Electroferograma de RNA Total Eucariota	32
Figura 5. Electroferograma de cRNA Fragmentado Adecuadamente	39
Figura 6. Electroforesis capilar del RNA total de las muestras seleccionadas	51
Figura 7. Gráficos de dispersión de replicas técnicas	54
Figura 8. Distribución de datos después de aplicar el método “Quantile Normalization”	55
Figura 9. Distribución de datos después de aplicar el método de Loess de normalización global.	56
Figura 10. Diagrama de clasificación de las muestras analizadas	56
Figura 11. Clustering jerárquico no supervisado. Selección por linaje: LLA-T & LLA-B	58
Figura 12. Clustering jerárquico no supervisado. Selección por grupos de edad: niños, pediátricos y adultos	59
Figura 13. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados por por grupos de edad en LLA-T	60
Figura 14. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados por grupos de edad en LLA-B	61
Figura 15. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con buen pronóstico terapéutico: LLA-T & LLA-B	62
Figura 16. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con mal pronóstico terapéutico: LLA-T & LLA-B	63
Figura 17. Interacción entre genes diferencialmente expresados. Genes asociados a la vía del desarrollo del sistema hematológico	70
Figura 18. Curva de amplificación de genes evaluados con SYBR Green	73

Figura 19. Curvas de disociación de algunos genes evaluados por PCR cuantitativa	74
Figura 20. Efecto de la concentración de RNA total procesado en la qPCR-ARRAY.	75
Figura 21. Niveles de expresión génica normalizada de genes identificados en la comparación por linaje	77
Figura 22. Gráficas tipo volcán de los genes con expresión diferencial que mostraron tendencia por linaje	78
Figura 23. Niveles de expresión normalizada de los genes con expresión diferencial con tendencia por grupos de edad	79
Figura 24. Gráficas tipo volcán de los genes con expresión diferencial con tendencia por grupos de edad	81
Figura 25. Ejemplo de resultados obtenidos en la comparación de niveles de expresión diferencial entre hombres y mujeres	82
Figura 26. Niveles de expresión diferencial de genes con tendencia a agruparse de acuerdo a hallazgos en el cariotipo	82
Figura 27. Sub-expresión del gen DEFA1-3 asociada a pacientes de alto riesgo.	83
Figura 28. Representación global de resultados de qPCR-ARRAY	84

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
µg	Microgramo
µl	Microlitro
CALLA	Antígeno Común de LLA
cDNA	DNA codificante
CF	Citometría de Flujo
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
cRNA	RNA transcrito in vitro
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetra-acético
ERM	Enfermedad Residual Mínima
EUA	Estados Unidos de América
FAB	Franco-Americana-Británica
FISH	Hibridación in situ Fluorescente
IFT	Inmunofenotipificación
IgH	Cadena Pesada de Inmunoglobulinas
IVT	Transcripción in vitro
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	LLA de linaje B
LLA-NK	LLA de células NK
LLA-T	LLA de linaje T
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
log ₂	Logaritmo de base 2
ml	Mililitro
mM	Milimolar

Abreviatura	Significado
MPO	Mieloperoxidasa
MTHFR	Metil-Tetrahidrofolato Reductasa
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Phi+	Cromosoma Filadelfia Positivo
qPCR-ARRAY	PCR Cuantitativa en arreglo
RIN	Número de Integridad de RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a PCR
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCR	Receptor de Células T

RESUMEN

MC. Ángel Lugo Trampe

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Marzo del 2008

Área de Estudio: Genética Molecular

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

Número de Páginas: 98

Título del Estudio: "ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA"

Introducción. La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una enfermedad muy heterogénea que presenta gran variabilidad, tanto en la biología como en el pronóstico, por lo que el entendimiento de los eventos que llevan a su desarrollo otorgará las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Los nuevos métodos de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad y los esquemas de tratamientos actuales, han mejorado dramáticamente la supervivencia en los pacientes con LLA. El seguimiento de la ERM requiere la detección de pequeñas cantidades de células malignas, particularmente en muestras de sangre, durante y después del tratamiento, para lo cual se usan técnicas muy sensibles que permitan: **a)** identificar por ejemplo una célula maligna entre 10^3 células blancas (sensibilidad mínima de 10^{-3}), **b)** discriminar entre células malignas y normales sin resultados falsos positivos, **c)** utilizar marcadores estables, específicos de la leucemia, que no generen resultados falsos negativos al perderse durante el curso del tratamiento, **d)** utilizar marcadores cuantificables y **e)** que no involucren metodologías costosas, sofisticadas e imprácticas para uso clínico rutinario. En los últimos 5 años se han realizado esfuerzos en la búsqueda de genes marcadores que presenten niveles de expresión que permitan el pronóstico de respuesta al tratamiento y el monitoreo de la ERM, lo que a llevado a la identificación de genes que han sido propuestos como marcadores, aunque éstos estudios se han centrado en poblaciones étnicamente diferentes a las de México, así como también los esquemas para su tratamiento, lo que pudiera en parte responder las diferencias en la respuesta terapéutica. Por lo que en éste proyecto nos propusimos utilizar la tecnología de microarreglos de expresión génica, con la finalidad de analizar los perfiles de expresión génica de pacientes con LLA del noreste mexicano, y seleccionar genes con niveles de expresión significativos que pudieran ser utilizados posteriormente para determinar su utilidad como marcadores pronóstico y para el monitoreo de la ERM; además de identificar vías regulatorias alteradas y su probable implicación en la leucemogénesis.

Material y Métodos. Se recuperaron muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes con LLA de recién diagnóstico y sin haber iniciado tratamiento, que acudieron al Servicio de Hematología del Centro Universitario contra el Cáncer, en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad autónoma de Nuevo León, durante el periodo de Febrero 2005 – Agosto 2007. A partir de las células mononucleares purificadas por linaje con perlas magnéticas de pacientes con LLA, se realizó la extracción de RNA total, el cual fue transcrito in vitro, marcado, hibridado en microarreglos de expresión génica, lavado y escaneado siguiendo las instrucciones de la casa comercial Affymetrix, para el microarreglo utilizado (HG U133 Plus 2.0). Los niveles de expresión génica obtenidos fueron normalizados y posteriormente comparados entre grupos con el software *R* y módulos de *Bioconductor*, de acuerdo a las variables de: linaje de la leucemia, grupos de edad, sexo y grupos de riesgo. Se realizó análisis de vías con el software Ingenuity®, a partir de los genes seleccionados y sus respectivos niveles de expresión génica, para seleccionar genes involucrados en procesos de regulación de la expresión génica y diferenciación celular. Los niveles de expresión de los genes identificados en conjunto con 8 genes previamente reportados por otros investigadores, fueron validados por qPCR. Los niveles de expresión obtenidos por qPCR fueron normalizados y comparados con un grupo control sano por el método $\Delta\Delta Ct$, y la prueba estadística t. Los resultados fueron graficados para identificar asociación en las diferencias de expresión entre los grupos de pacientes comparados.

Resultados. Se recuperaron muestras de 48 pacientes, de los cuales se les determinó el perfil de expresión génica con microarreglos a 11 pacientes, con replicado técnico. Se identificaron 46 genes diferencialmente expresados al comparar pacientes con LLA de linaje T y B; 3 genes diferencialmente al comparar niños & adultos; 263 genes al comparar niños & adultos con LLA-T, y 529 al comprar niños & adultos con LLA-B. No se identificaron genes expresados diferencialmente al comparar pacientes de acuerdo al riesgo de recaída: alto

& habitual. El análisis de vías basado en los genes con expresión diferencial evidenció a la vía Wnt – β Catenina constantemente alterada, destacando su alteración en la vía del desarrollo del sistema hematológico. Como resultado se seleccionaron 36 genes con expresión diferencial, involucrados en procesos de regulación de expresión génica y diferenciación celular, los cuales fueron validados por qPCR, en conjunto con 8 potenciales genes marcadores previamente reportados y 4 genes endógenos para la normalización de los niveles de expresión. Los ensayos de validación confirmaron la sub-expresión 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 sub-expresión en pacientes con hiperdiploidía y Phi+. El gen DEFA1-3 mostró sub-expresión exclusivamente en el grupo de pacientes con alto riesgo de recaída; mientras que los pacientes con riesgo habitual solamente mostraron sobre-expresión, además de algunos pacientes de alto riesgo.

Contribuciones y Conclusiones. Este trabajo es el primero en México enfocado al estudio de los perfiles de expresión génica en LLA, en el cual se han identificado vías y genes con niveles de expresión alterados, algunos de los cuales ya han sido previamente reportados; mientras que otros se han identificado en otros tipos de leucemia y no han sido validados ni evaluada su capacidad pronóstica y/o utilidad para ser empleados para el monitoreo molecular de la ERM. Nuestros resultados muestran la heterogeneidad ya observada previamente en perfiles de expresión; además descarta el empleo de variables como la edad y el sexo como factores que alteren los niveles de expresión génica. Identificamos la expresión diferencial de los genes AP1B1, PLCG2, WBP5, SNF1LK, RGS1 y DEFA1-3, y los proponemos como potenciales marcadores pronósticos de respuesta al tratamiento, y para el monitoreo de la ERM en LLA. La sub-expresión de las defensinas 1-3 en pacientes con alto riesgo de recaída aporta indicios que apoyan la hipótesis de la probable implicación de un agente viral como agente etiológico de la LLA, dado el papel antiviral de éstas.

Dra. Rocío Ortiz López
Directora de Tesis

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 DEFINICIÓN.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), también conocida como leucemia linfocítica aguda, es una neoplasia maligna de células linfoides, o linfoblastos, caracterizada por un rápido y descontrolado crecimiento. Es predominantemente una enfermedad de la niñez, representando un tercio de todas las malignidades de éste grupo etáreo.¹ Ambos linajes precursores (las células T o B) pueden desencadenar la LLA. La LLA de células B (LLA-B) representa cerca del 88% de todos los casos.² La incidencia de LLA es cinco veces mayor que la de las leucemias agudas no-linfoblásticas. En sujetos adultos, la enfermedad representa un 15% de las leucemias agudas, pero las tasas de respuesta al tratamiento y de supervivencia en este grupo son inferiores a las observadas en leucemias mieloides agudas.³

La LLA está caracterizada por hallazgos morfológicos, inmunológicos, citogenéticos y moleculares, algunos de los cuales tienen importantes implicaciones clínicas tanto para el diagnóstico como para la predicción de respuesta a un régimen de tratamiento específico. Con los métodos actuales, las caracterizaciones de LLA permiten predicciones hasta un 95% de los pacientes con LLA en términos de la presentación y respuesta clínica, particularmente en pacientes pediátricos, pero este panorama es más incierto en sujetos adultos. Incluso, la caracterización de la LLA en las diferentes etapas de la vida puede tener un significado distinto en términos de pronóstico; por ejemplo, la presencia de cromosoma Filadelfia en niños con LLA se considera de buen pronóstico, mientras que este mismo hallazgo es de pobre pronóstico en sujetos adultos. Se postula que varios factores propios del huésped (como la edad) y anormalidades cromosómicas recurrentes son las posibles razones de la heterogeneidad clínica observada en LLA.⁴

1.2 EPIDEMIOLOGÍA.

La LLA representa aproximadamente menos del 1% de los cánceres del adulto, y el 25% de los cánceres infantiles. En EUA, tomando en cuenta todos los grupos etáreos, la LLA

representa menos del 0.4% de todos los cánceres, 13.6% de todas las leucemias, y el 29.6% de todas las leucemias linfocíticas. La tasa de incidencia ajustada por edad para LLA es diferente varias veces entre países, con las tasas más altas en España, entre hispanos en Los Ángeles, en Caucásicos en Quebec y Ontario, y en Nueva Zelanda. Las tasas más bajas se encuentran en países en desarrollo, entre negros de EUA, judíos israelíes y chinos e indios asiáticos, cuyas tasas pueden ser varias veces más bajas que los países más ricos y desarrollados.^{5,6}

En niños, la LLA es la malignidad más común, alcanzando su incidencia máxima entre los 2 y 5 años, excepto en África y en el Oeste Medio. Las tasas más altas de ocurrencia de LLA infantil ocurren en Costa Rica, y entre los hispanos en Los Ángeles.^{7,8} En EUA, la LLA representa cerca del 25% de todos los cánceres infantiles y el 79.5% de todas las leucemias infantiles, y el 99% de todas las leucemias linfocíticas. Sin importar que sea el tipo de cáncer más común en niños, éste permanece como una enfermedad rara tanto en niños como en la población en general (3.6 y 1.4 casos por 100,000 por año, respectivamente).⁹

En contraste, la LLA representa sólo el 20% de las leucemias agudas en los adultos. Aunque la mayoría de los adultos en tratamiento por LLA se encuentran entre los 30-35 años de edad, se observa que la incidencia de LLA aumenta progresivamente después de los 50 años de edad.¹⁰

En EUA la LLA es más frecuente en caucásicos que en afroamericanos (incidencias de 1.5 y 0.8 por 100,000 habitantes en blancos y negros, respectivamente).¹¹

Menos de la mitad de los adultos con leucemia sobreviven 5 años después de su diagnóstico, pero cerca de dos tercios de los casos de adultos con LLA sobreviven al menos 5 años después de su diagnóstico. La sobrevivencia de la leucemia infantil es mucho mejor que en adultos, con más de tres cuartos de todos los niños con leucemia y más de 4/5 de los casos de LLA sobreviven al menos 5 años posteriores al diagnóstico.⁹ La LLA infantil es una de las historias de éxito más interesantes en la historia de la quimioterapia, mostrando una mejora notable debido a tratamientos innovadores, con una tasa de sobrevivencia a 5 años del 3% en 1964;¹² incrementándose a 57% entre 1975-1977, y a 87% entre 1996-2002.⁹

En EUA, la LLA representa menos del 1.1% del total de muertes relacionadas al cáncer, y el 28.9% de todas las muertes por leucemia. En niños estadounidenses, sin embargo, la LLA representa cerca del 16% de la mortalidad por cáncer y el 50% de todas las muertes por leucemia.⁹

La tasa de incidencia de LLA es más alta en hombres que en mujeres, y ésta diferencia es más pronunciada entre blancos (70% más leucemia en hombres y 60% más LLA en hombres) que entre negros (30% y 15%, respectivamente). En niños, la tasa de incidencia para todas las leucemias, y para LLA, son ligeramente más altas en hombres que en mujeres, con cerca de un 30%.⁹

En EUA, para la leucemia, en hombres, mujeres y todos combinados, los caucásicos tienen una incidencia más alta que los negros (30 – 40%), y éste mismo patrón se observa aún más fuertemente en LLA (85 y 215%).⁹

1.3 ETIOLOGÍA.

Aunque la causa de LLA es desconocida, es poco probable que la transformación leucémica sea el resultado de un solo evento mutacional, sino que más bien es la culminación de la acumulación de múltiples procesos mutacionales que involucran complejas interacciones entre la susceptibilidad del huésped, el daño cromosómico por exposición de las células progenitoras susceptibles a carcinógenos (físicos, químicos y virales). Los estudios de concordancia de LLA en gemelos monocigotos muestran un porcentaje del 5%, indicativo de la importancia de los factores ambientales en la etiología de la LLA.¹³ Recientemente se ha publicado en un estudio con gemelos idénticos portadores de la translocación TEL-AML1 hallazgos que indican la existencia de un primer evento genético que predispone a las células como pre-leucémicas, y la persistencia de células troncales leucémicas aún cuando las células leucémicas circulantes han sido erradicadas.¹⁴

Entre las anomalías genéticas que predisponen a LLA se incluyen el síndrome de Down y la ataxia-telangiectasia.^{15, 16} También existe evidencia de ciertos polimorfismos en el gen de la metil-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que están asociados a este tipo

de leucemia.^{17, 18} Entre los factores adquiridos después de la concepción y asociados a LLA, se incluyen anormalidades citogenéticas somáticas, toxinas ambientales y causas infecciosas.⁶

Entre las toxinas ambientales sólo existe una clara relación entre la exposición a radiaciones ionizantes y el desarrollo de LLA.¹⁹ Un estudio de asociación entre tabaquismo y LLA sugiere un riesgo incrementado de esta leucemia en fumadores mayores de 60 años.²⁰ Entre los agentes infecciosos, los retrovirus han sido implicados en la leucemogénesis en animales experimentales; sin embargo, solo se ha demostrado una clara asociación entre infección por virus Epstein-Barr y LLA-B o leucemia de Burkitt.^{21, 22}

Las leucemias secundarias a quimioterapia y radioterapia se caracterizan por anormalidades citogenéticas específicas y generalmente, son de pobre pronóstico. Los agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II también están implicados a leucemias probablemente iatrogénicas; sin embargo, éstas leucemias son principalmente mieloides (> 90%), pero actualmente se observa un incremento de LLA en sujetos tratados con inhibidores de la topoisomerasa II.²³

1.4 DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN.

El diagnóstico de la LLA es dependiente de la identificación y caracterización de células blásticas en sangre periférica o médula ósea. Generalmente se basa en características morfológicas, citoquímicas e inmunológicas de los blastos. Sin embargo, frecuentemente son necesarios estudios citogenéticos y moleculares para confirmar el diagnóstico, predecir el comportamiento clínico, y estratificar pacientes para su terapia.²⁴⁻

²⁸ La clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) de las LLA, la cual reconoce tres subclases de LLA (L1, L2 y L3), está basada estrictamente en la morfología y citoquímica del blasto²⁹, mientras que el esquema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) también incorpora la inmunofenotipificación y citogenética.²⁶

Clínica y biológicamente, las LLA y los linfomas linfoblásticos son consideradas como una sola entidad, y los términos son comúnmente intercambiables. Sin embargo, el término “linfoma” es empleado cuando la enfermedad está localizada en nódulos linfoides

o tejido blando, mientras que “leucemia” se emplea cuando la enfermedad se encuentra en médula ósea o sangre.³⁰

1.4.1 MORFOLOGIA

Los linfoblastos en pacientes con LLA tienden a ser heterogéneos en tamaño y forma. A diferencia de la reciente clasificación de la OMS, la clasificación FAB de las LLA enfatiza la presencia de subgrupos de linfoblastos precursores: L1, que es más común en niños que en adultos (85% vs. 30%), y L2, que es más común en adultos que en niños (60% vs. 15%). En ambas clasificaciones (OMS y FAB) se reconoce a los subtipos más maduros de células B como células Burkitt L3.^{29, 31}

Los linfoblastos precursores L1 son pequeños con escaso citoplasma, cromatina fina y con nucléolo indistinto (>90% del total de blastos) (Figura 1). Los linfoblastos precursores L2, por otro lado, son típicamente células medianas a grandes con una alta relación núcleo-citoplasma, nucléolo prominente, y membrana nuclear irregular (Figura 1). Aunque la reproducibilidad de la clasificación de linfoblastos precursores L1 y L2 es pobre, distinguir ambas morfologías es muy útil para el diagnóstico por su valor descriptivo. Varios estudios sugieren que pacientes con tipo celular L1 tienen una mejor respuesta a la terapia, con mejor supervivencia libre de enfermedad que los pacientes con morfología celular L2.^{29, 32-35} Los blastos L3 (Burkitt) tienen una morfología distinta, con tamaño uniforme, núcleo redondeado y una cromatina finamente agrupada. La característica diagnóstica de éste tipo celular es que es profundamente basófilo y con citoplasma vacuolado.³⁵

1.4.2 CITOQUÍMICA E INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

La clave diagnóstica citoquímica de la LLA es la carencia de actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y negatividad para la esterasa inespecífica (NSE).³⁵ La prueba funcional de MPO en la citoquímica sigue siendo el estándar de oro para determinar actividad de MPO, aunque algunos laboratorios están incrementando el uso de la tinción de Cloroacetato Esterasa e inmunotinción, especialmente para la detección con citometría de flujo.³⁶

La negatividad para MPO y NSE podría dar la posibilidad de un diagnóstico de LLA, sin embargo es necesaria una posterior evaluación por citometría de flujo. Generalmente, los siguientes marcadores son útiles y los más usados por los laboratorios: CD34, TdT, CD1a, CD2, CD19, CD3, CD7, CD4, CD8, CD10, CD13, CD14, CD22, CD33, CD64, CD117, cCD79a y la inmunoglobulina de superficie (Ig)M (ver Cuadro 1). La MPO debería ser evaluada por citometría de flujo solamente si fue negativa en la tinción citoquímica.

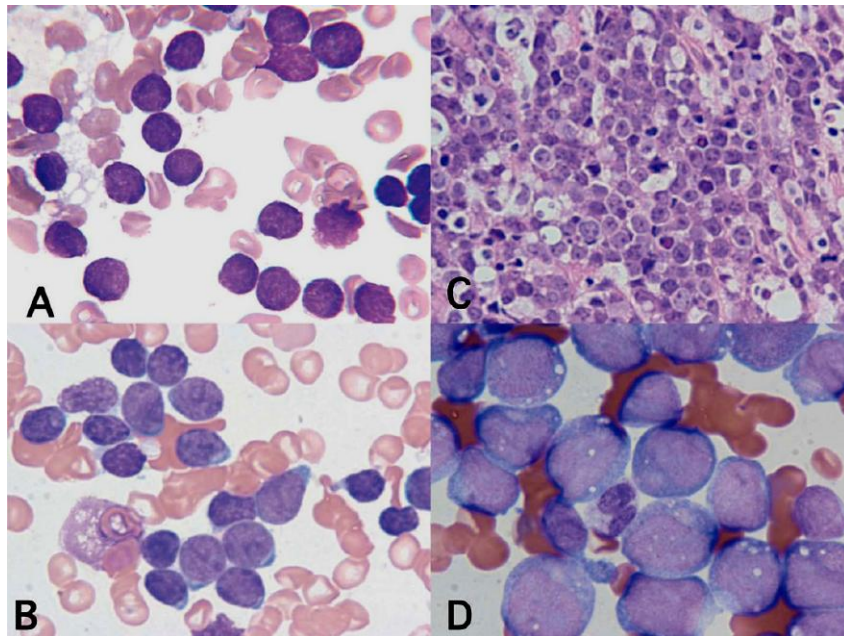


Figura 1. Morfología de los blastos en la Leucemia Linfoblástica Aguda. (A) Blastos L1; (B) blastos L2; (C) morfología de “cielo estrellado” en una biopsia de médula ósea en un caso con leucemia L3; (D) blastos L3. Figura tomada de *Albitar, M et al, 2008*.³⁵

La expresión de la Desoxinucleotidiltransferasa Terminal (TdT) junto con CD19+ ó cyCD79a y CD22+ de superficie o plasmática son diagnósticos para LLA de precursores de células B (ver Cuadro 1), independientemente de la expresión de CD13 y CD33. La expresión de CD10 (Antígeno Común de LLA, CALLA) además de los marcadores anteriores es diagnóstico de LLA de precursor B intermedio. Aunque la expresión de CD19 es diagnóstica para el linaje B, ésta se detecta en el 80% de los casos de Leucemias Mieloides Agudas (LMA) portadores de la translocación t(8;21); sin embargo, los casos son positivos para MPO y son fácilmente distinguibles de LLA.³⁷ El marcador CD20 es expresado en

aproximadamente el 55% de los pacientes con LLA de precursores de células B y más frecuentemente en pacientes con Leucemia de Burkitt. Las células blásticas que carecen de la expresión de TdT son clasificadas como Burkitt (L3) si muestran una morfología de tipo L3 (ver Figura 1).³⁵

Cuadro 1. Clasificación de LLA de acuerdo al inmunofenotipo.

Marcadores pertinentes disponibles para estudios inmunohistoquímicos
General: TdT, CD34
Célula-B: CD20, CD79a
Célula-T: CD3, CD4, CD8, CD5, CD45RO
Mieloide: MPO, CD68, lisozima, glicoforina A, Factor VIII, CD61
Otros: queratina, NSE, miogenina, CD99
Marcadores comúnmente usados para flujo-inmunofenotipificación en leucemia aguda
General: CD34, HLA-DR, TdT, CD45
Marcador de células-B: CD10, CD19, cCD22, CD20, CD79a, CD24
Marcador de células-T: CD1a, CD2, cCD3, CD4, CD8, CD5, CD7
Mieloide: MPO, CD117, CD13, CD33, CD11c, CD14, CD15
Fenotipos LLA-B
Pro-B: TdT+, CD19/22/79A+, CD10-, cμ-, slg-
Precursor-B común: TdT+, CD19/22/79A+, CD10+, slg-
Pre-B: TdT+, CD19/22/79A+, CD10+, cμ+, slg-
Burkitt: TdT-, CD19/22/79A+, CD10+, slg+
Fenotipos LLA-T
Timocito pro/inmaduro: TdT+, cCD3+, CD2/5/7+/-
Timocitos común: TdT+, cCD3+, CD2/5/7+, CD4+/CD8+, CD1a+
Timocito maduro: TdT+/-, CD3+, CD2/5/7+, CD4+ o CD8+, CD1a-

La determinación de marcadores mediante citometría de flujo (inmunofenotipificación, IFT) en conjunto con hallazgos citomorfológicos son cruciales para la identificación de las LLA atípicas:

- LLA Burkitt-Like (Burkitt Atípica): TdT-, CD19+, e IgM+
- LLA con eosinofilia
- LLA aplásica e hipoplásica
- LLA granular
- LLA de células en espejo de mano
- LLA de células NK: CD56+
- LLA bifenotípica y bilinaje: CD13+ y/o CD33+
- LLA mieloperoxidasa positiva: MPO+

1.4.3 ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES

Aproximadamente el 45% de los casos de LLA muestran anomalías citogenéticas en estudios de cariotipo, siendo entonces el estudio citogenético una valiosa herramienta diagnóstica y pronóstica para evaluar a los pacientes con LLA. Además, la mayoría de estas anomalías pueden ser detectadas empleando modernos métodos tales como la Hibridación in situ Fluorescente (FISH), Hibridación Genómica Comparativa (CGH) y Transcripción Reversa acoplada con Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). El FISH y la RT-PCR son empleadas para detectar la Enfermedad Residual Mínima (ERM) y monitorear a los pacientes durante y después de la terapia; la RT-PCR cuantitativa permite el monitoreo de la Enfermedad Residual. Las anomalías citogenéticas más comunes se listan en el Cuadro 1.³⁵

Cuadro 2. Anormalidades moleculares en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Anormalidad cromosómica	Gen	Lesión Citogenética	% de Adultos con LLA	% de Niños con LLA
8q24	Myc-Ig	T(8;14), t(8;22), t(2;8)	5	2
>46 cromosomas	NA	Hiperdiploidía	5	25
<46 cromosomas	NA	Hipodiploidía	5	6
12p12	ETV6-AML1	T(12;21)(p12;q22)	1	22
19p13.3	E2A-PBX1	t(1;19), t(17;19)	3	5
11q23	MLL	t(4;11)(q21;q23) t(9;11)(p21;q23) t(11;19)(q23;q13.3), t(3;11)(q22;q23), t(X;11)(q13;q23)	8	10
9q34	BCR-ABL	t(9;22)(q34;q11)	25	3
14q11	Antígeno Receptor de Células T	t(14q11)	20	15
5q35	HOX11L2	t(5;14)(q35;q32)	1	2.5
1p32	TAL-1	t(1;14)(p32;q11)	12	7
10q24	HOX11	t(10;14)(q24;q11), t(7;10)(q35;q24)	8	1
9p21	p16 ^{INK4a} , p15 ^{INK4b}	Del(9p21-22)	15	20
9q32	TAL-2	t(7;9)(q34;q32)	Rara	Rara
13q14	mIR15/mIR16	Del(13q14)	3	2
11q22	ATM	Del(11q22-23)	28	16
6q23	Desconocido	Del(6q), t(6;12)(q23;p13)	6	5

El FISH es una técnica que emplea sondas de DNA marcadas fluorescentemente y que pueden ser hibridadas tanto en cromosomas en metafase e interfase. Presenta como principal ventaja la especificidad de secuencia y es extremadamente útil en el diagnóstico de translocaciones, muchas de las cuales no son evidentes en un cariotipo. Tiene las desventajas de que requiere cultivo celular para su ensayo en metafases y que es una metodología cuantificable subjetiva que depende del criterio del observador.

El CGH es una metodología que permite evidenciar ganancias o pérdidas de material genómico (evento llamado desbalance cromosómico) que resultan invisibles en un cariotipo, pero que tiene la limitante de no poder demostrar la existencia de translocaciones. Es un método de análisis masivo o de alto rendimiento (*High Throughput*, en inglés), en el que el DNA del paciente es marcado con fluorescencia e hibridado con una matriz, ya sea de clonas ordenadas de DNA genómico humano (denominado "BAC-CGH"), en un microarreglo de oligonucleótidos (denominado "Oligo-CGH"), o en una variante de éste último diseñado inicialmente para genotipificación, y cuyo análisis posterior demostró que también es útil para identificar desbalances genómicos con la mayor resolución actualmente posible, con una resolución cercana a 1 Kpb (denominado "SNP-CGH").

Los microarreglos de expresión génica son una metodología útil para determinar simultáneamente los niveles de expresión génica, y su potencial depende de la densidad de transcritos representados en el microarreglo. En muchos casos estos microarreglos contienen secuencias de cDNA u oligonucleótidos que permiten detectar diferentes patrones de empalme alternativo. Los microarreglos de expresión permiten conocer los cambios en el perfil de expresión bajo diferentes condiciones o estados patológicos, y otorgan información que permite identificar en varios casos las vías metabólicas o de control celular que se encuentran alteradas. Se utiliza principalmente para la búsqueda de marcadores genéticos de una condición patológica, enfocándose en un subconjunto de genes y recientemente también ha servido para determinar algunos perfiles preferenciales de expresión génica asociados a la evolución de determinadas patologías como el cáncer de mama, lo que se ha denominado "firma genómica" (*genomic signature*, en inglés).

Esta metodología ha sido empleada para subclasificar la LLA y estratificar pacientes de acuerdo al riesgo y respuesta a la terapia.³⁸ El uso de los microarreglos de expresión ha brindado conocimiento útil e interesante en la biología de la LLA. Ha probado su utilidad como una herramienta de descubrimiento, y algunos reportes han mostrado que la clasificación y subclasificación obtenida por microarreglos puede ser adaptada empleando herramientas diagnósticas estándar tales como la RT-PCR cuantitativa. Sin embargo, numerosos aspectos técnicos relacionados a la reproducibilidad y practicidad necesitan ser resueltos antes de que se acepte para su uso clínico.³⁹⁻⁴³

También se ha descrito que la clasificación y sub-agrupamiento de las LLA empleando microarreglos de expresión correlaciona perfectamente con resultados de anomalías en el cariotipo y en la IFT.^{43, 44} En un estudio en el que se analizan con microarreglos a 10 pacientes con LLA, se encontró sobreexpresión de los genes TRB, CD3D (altamente representados en LLA-T), MME (sobreexpresado en LLA con t(9;22)) y del factor de crecimiento tisular conectivo (CTGF) como un marcador específico para LLA con t(4;11).³⁸ En un estudio más reciente se reporta el uso de microarreglos para la clasificación de 23 casos de LLA, observándose un grupo de 29 genes sobreexpresados. Algunos de ellos codifican para proteínas empleadas como marcadores en la IFT (CD19 y CD3), y en sus resultados el gen CD74 muestra ser útil para distinguir entre los tipos B y T de LLA; el “agrupamiento jerárquico” de 19 genes (ZW10, LDLC, PTPN9, HMGCL, HSA277841, MYB, CNR2, ILT8, MAPK4, UBL4, SH120, MDS023, GGPS1, ATF1, APPBP2, ZNF146, ZNF202, FADD y TP53) demostró ser predictivo para remisión a largo plazo.⁴⁵

1.5 PRONÓSTICO

La curación es el objetivo primordial en cualquier tipo de leucemia, sobre todo en pacientes jóvenes. La subclasificación de la LLA según el cariotipo ha contribuido enormemente a determinar el pronóstico de la enfermedad. La mayoría de los avances en el tratamiento actual en LLA se han alcanzado a partir de la adaptación exitosa de las estrategias de tratamiento de LLA en niños. El tratamiento de la LLA incorpora múltiples drogas dentro de un régimen en secuencia específica en dosis e intensidad, y se divide en

cuatro fases: 1) inducción; 2) consolidación intensificada; 3) mantenimiento prolongado; y 4) profilaxis del Sistema Nervioso Central. La terapia de combinación intensiva en LLA siguiendo éste patrón ha resultado en una tasa de remisión completa del 80% - 90%, y una tasa de supervivencia libre de leucemia del 30% - 40%. Varios grupos en EUA y alrededor del mundo están investigando modificaciones en éstos bloques de tratamiento en un esfuerzo por mejorar aún más el éxito terapéutico. Estas estrategias no sólo incluyen drogas quimioterapéuticas conocidas, también incorporan nuevas drogas dirigidas (anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina-cinasas), asegurando la posición del trasplante de células troncales como parte de la consolidación en la primera remisión y el uso del monitoreo molecular de la ERM, estableciendo de ésta manera un nuevo sistema pronóstico que permite la aplicación de una terapia personalizada basada en el riesgo.

1.5.1 ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA Y ESTIMACIÓN DEL RIESGO.

En pacientes con LLA la remisión se define como la restauración de la hematopoyesis normal, con un porcentaje de blastos menor al 5% en médula ósea (límite de blastos considerado normal en un sujeto sano). La presencia de células leucémicas por debajo del límite del 5 % es denominada Enfermedad Residual Mínima (ERM);⁴⁶ así, un paciente declarado en ERM puede albergar hasta 10^{10} células leucémicas/ml.

Tanto en niños como en adultos con LLA, se piensa que las recaídas resultan a partir de las células leucémicas residuales que permanecen cuando se ha alcanzado remisión morfológica y existe un remanente por debajo de los límites de detección que emplean los métodos rutinariamente empleados (la microscopia convencional y la citogenética). Varias técnicas sensibles han sido empleadas para monitorear la persistencia de la clona leucémica durante el tratamiento, en un intento por identificar pacientes que están en remisión morfológica y citogenética, pero en los que existe persistencia subclínica, y tienen un riesgo de recaída incrementado. El estudio de la ERM en LLA tiene el potencial de proveer datos sobre la eficacia clínica de las estrategias de tratamiento estándares, y también de las nuevas estrategias, enfocadas a incrementar la tasa de curación.

En los países desarrollados, los protocolos de tratamiento modernos logran inducir ERM en virtualmente todos los casos de LLA (> 95%), pero aproximadamente del 20-30% experimentan recaída. En los países en vías de desarrollo el rango de ERM varía de 30-70% de los casos.^{47, 48} Actualmente se emplean las características clínicas y biológicas para estimar el riesgo de la recaída, pero no son totalmente confiables. La asignación de éste riesgo incluye características clínicas (edad y sexo), estudios básicos de laboratorio (cuenta de células blancas y presencia o ausencia de leucemia en fluido cerebro espinal), características de los blastos leucémicos (inmunofenotipo, citogenética, diagnóstico molecular para la presencia de translocaciones) y respuesta a la terapia.

Las primeras características de riesgo fueron identificadas a partir de estudios epidemiológicos que correlacionaban las características clínicas con los resultados finales del paciente. Por ejemplo, se encontró que los lactantes (< 1 año) tenían una menor supervivencia que los niños entre 2 y 10 años de edad. La caracterización inmunofenotípica de los blastos leucémicos posteriormente reveló que los pacientes con LLA-T tenían un mayor riesgo de recaída que los pacientes con LLA-PreB. Más recientemente, un estudio que correlaciona hallazgos por análisis citogenético y diferencias en los perfiles de expresión génica permitió la identificación de distintos subtipos de LLA-B, las cuales incluyen diversas translocaciones, como: t(9;22)(BCR-ABL), t(1;19)(E2A-PBX1), t(12;21)(TEL-AML1), rearrreglos en el gen MLL en el cromosoma 11q23 y cariotipos hiperdiploides con más de 50 cromosomas.⁴³

El monitoreo secuencial de la respuesta celular a la quimioterapia *in-vivo* promete ser una estrategia importante para determinar el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, el examen morfológico de la sangre periférica o de las células de la médula ósea, que es el método tradicional para identificar la enfermedad residual, es subjetiva y tiene una sensibilidad muy limitada (Figura 2).⁴⁹

El monitoreo de la ERM es utilizado para una exacta estratificación de la terapia. La estratificación incluye intensificación del tratamiento en pacientes con alto riesgo de recaída y reducción en pacientes de bajo riesgo.⁴⁹

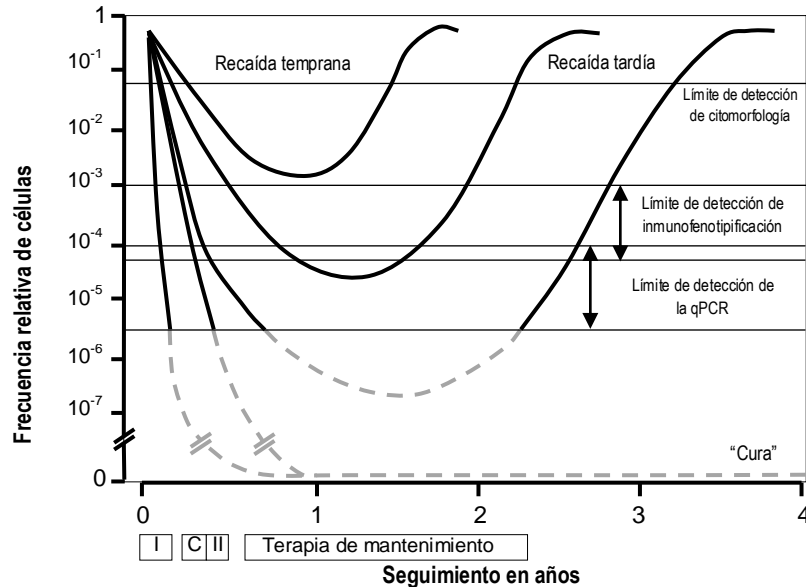


Figura 2. Diagrama de frecuencia de células leucémicas en sangre periférica o médula ósea de pacientes con LLA, durante y después de la quimioterapia y durante el desarrollo de recaídas. Se muestran los límites de detección de las técnicas morfológicas, así como el límite de detección de la inmunofenotipificación por citometría de flujo y de las técnicas de PCR. Obsérvese que únicamente la qPCR permite detectar recaídas cuando los niveles de blastos tienen valores menores de 10^{-5} células blancas. I: tratamiento de inducción; C: tratamiento de consolidación; II: tratamiento de reinducción. (Figura modificada, originalmente publicada por Szczepanski *et al*).⁴⁸

Las técnicas de detección de la ERM confían en la habilidad para identificar un marcador único de células leucémicas. Los dos métodos que típicamente han sido empleados para la detección y monitoreo de la ERM incluyen a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Citometría de Flujo (CF). Las técnicas de PCR se han utilizado para el monitoreo de fusiones génicas específicas de leucemia (p.e. BCR-ABL), o clonas con rearrreglos específicos de los genes de la Cadena Pesada de Inmunoglobulinas (abreviado IgH en inglés) o del Receptor de Células T (abreviado TCR en inglés). Para el monitoreo de la ERM por CF, al momento del diagnóstico de debe de identificar la presencia de un Inmunofenotipo (IFT) aberrante en la superficie celular de los blastos leucémicos. Éstas técnicas tienen una mayor sensibilidad que los análisis citogenéticos estándares, ya que son capaces de detectar desde 1 a 10^4 células leucémicas en un fondo de 10^6 células

normales. Las características generales de cada una de éstas técnicas se describen en el Cuadro 3.

1.5.1.1 DETECCIÓN DE ERM POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo multiparamétrica es una metodología ampliamente aplicable y fiable para el monitoreo de la ERM en LLA con presencia de un inmunofenotipo inusual o aberrante expresado en la superficie celular de los linfoblastos. Estos inmunofenotipos aberrantes pueden ser el resultado de la expresión de linaje cruzado (p.e. presencia de antígenos mieloides en una célula progenitora linfoide), expresión asincrónica de antígenos de maduración linfoide (p.e. cuando dos o más antígenos normalmente no expresados en la misma etapa de diferenciación hematopoyética son co-expresados en el linfoblasto), sobre-expresión de antígenos, ausencia de antígenos de maduración normales, y/o expresión ectópica de antígenos.⁴⁹⁻⁵¹

La detección de ERM por CF puede ser utilizada en la mayoría de los casos de LLA de linaje T y B, es rápida, relativamente sensible, y cuantitativa, con la habilidad de detectar una célula leucémica en un fondo de $10^3 - 10^4$ células normales. Entre las desventajas de ésta técnica se incluyen la carencia de estandarización entre laboratorios, con variación significativa dependiendo de la experiencia del operador, difícil de distinguir entre progenitores normales de blastos leucémicos residuales, y la inestabilidad de la expresión antigénica de la clona leucémica, cuyo IFT cambia durante el tratamiento y puede resultar en ERM falso negativo.^{52, 53} Por otro lado, la selección inapropiada de antígenos para distinguir células leucémicas y normales pueden dar como resultado resultados de ERM falso positivos.

1.5.1.2 DETECCION DE ERM BASADA EN LA PCR

La amplificación por PCR de una secuencia específica de DNA o DNA complementario (cDNA) única para la clona leucémica, puede permitir la identificación de una célula maligna entre $10^4 - 10^6$ células normales, haciéndola en general, un método más sensible que la CF para determinar la ERM. Dos tipos secuencias de blancos pueden ser

empleadas para detectar ERM en pacientes con LLA: las regiones de unión de los rearrreglos de los genes IgH y TCR; o las regiones fusionadas de rearrreglos cromosómicos. Además a los blancos comúnmente usados, varios estudios han sugerido que el gen supresor del tumor de Wilms (WT1), aberrantemente expresado en la mayoría de los casos de LMA y LLA, puede servir también como un blanco útil para el análisis de la ERM.⁵⁴⁻⁵⁶

La delección e inserción aleatoria de nucleótidos durante los rearrreglos de los genes IgH y TCR genera secuencias únicas que pueden servir como marcadores específicos de clonas leucémicas que pueden ser identificados al momento del diagnóstico y utilizados para análisis seriales de ERM. La secuencia nucleotídica de la región de unión puede ser empleada en el diseño de oligonucleótidos específicos por paciente para la amplificación por PCR y detección de la ERM durante el tratamiento y seguimiento de la leucemia.⁵⁷ Los rearrreglos génicos específicos de clona de los genes IgH y TCR pueden ser identificados durante el diagnóstico en el 80 – 95% de los casos empleando varios conjuntos de oligonucleótidos.^{57, 58} Subsecuentemente, son diseñados oligonucleótidos y sondas basados en la secuencia del rearrreglo de la clona leucémica, para la detección y monitoreo de la ERM de manera personalizada.

Los rearrreglos cromosómicos específicos de leucemia también son útiles como secuencias blanco para detectar y monitorear la ERM. Para ello, son diseñados oligonucleótidos flanqueando la región fusionada a manera de obtener un producto de PCR que contiene la secuencia fusionada. En la mayoría de los casos, las translocaciones cromosómicas y sus puntos de ruptura están repartidos en regiones de más de 2 Kpb, con lo que se excede la longitud máxima que puede ser eficientemente amplificada; razón por la cual las fusiones génicas son identificadas sobre RNAm. El RNAm derivado de la expresión del gen fusionado obtenido durante la translocación (tales como BCR-ABL [t(9;22)] y MLL-AF4[t(4;11)]) puede ser empleado como secuencia blanco para realizar la PCR, retrotranscribiéndolo previamente para obtener cDNA (RT-PCR). La RT-PCR de genes fusionados es altamente sensible y específica, y menos laboriosa que el método basado en los rearrreglos génicos de IgH y TCR. Sin importar éstas ventajas, la aplicación de éste método

de monitoreo de la ERM es relativamente baja, ya que solamente un tercio de los casos, tanto de niños como adultos con LLA albergan una fusión génica recurrente.

Los primeros estudios de ERM basados en PCR eran cualitativos, o en el mejor de los casos empleaban métodos semicuantitativos. Estos métodos de PCR son de punto final, esto es, que el análisis del amplicón es analizado después de la amplificación por PCR se ha completado. Últimamente, la PCR cuantitativa (abreviado qPCR en inglés; también llamada PCR cuantitativa en tiempo real) ha sido introducida y llegado a ser el nuevo estándar para el análisis de la ERM basado en PCR.^{59, 60} La qPCR está disponible para detección cuantitativa de la ERM empleando tanto los rearrreglos de los genes IgH y TCR, o las regiones fusionadas resultantes de translocaciones cromosómicas.

Los métodos basados en PCR son altamente sensibles y específicos, y ampliamente aplicables a la mayoría de los pacientes con LLA. Recientemente se publicaron métodos estandarizados para el análisis por qPCR de la ERM, con resultados que pueden ser comparables entre diferentes laboratorios.^{61, 62}

Antes de emplear los resultados de ERM para dirigir la terapia, se debe establecer un conjunto de marcadores útiles que otorguen fuerza pronóstica a los resultados de medición de ERM a los diferentes intervalos de la terapia, la significancia clínica de las fluctuaciones de ERM durante la remisión clínica, la relación de los resultados de ERM con la presentación de características clínicas y biológicas de LLA y el valor predictivo de los resultados de ERM con relación a otras medidas de la respuesta temprana a la terapia.⁶³

Cuadro 3. Características de las técnicas actualmente utilizadas para el monitoreo de ERM en LLA.

	Inmunofenotipificación por Citometría de Flujo	Análisis por PCR de aberraciones cromosómicas	Análisis por PCR de los genes IgH/RCT
Sensibilidad	$10^{-3} - 10^{-4}$	$10^{-4} - 10^{-6}$	$10^{-4} - 10^{-5}$
Aplicabilidad			
Precursores de LLA-B			
Niños	80 – 90%	40 – 50%	95%
Adultos	70 – 80%	35 – 45%	90%
LLA-T			
Niños	>95%	10 – 25%	>95%
Adultos	>95%	5 – 10%	90%
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad adecuada • Aplicable a la mayoría de los pacientes • Rápida (2 – 3 días) y relativamente barata • Capaz de distinguir células leucémicas vivas de muertas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Relativamente fácil y barata • Sensible y específica de leucemia • Blanco estable durante el curso de la enfermedad • Rápida: 2 – 3 días • Disponible para el monitoreo de grupos de pacientes uniformes (p.e. LLA Phi+) • Mínimo muestra requerida 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicable virtualmente a todos los pacientes, si los rearrreglos génicos IGH, IGH-Kde, TCRG, y TCRD son usados como blancos • Sensible y específica de paciente (personalizada) • Rápida durante el seguimiento: 2 -3 días (sí la región de unión está identificada y se utiliza PCR cuantitativa) • Mínimo muestra requerida
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis complejo, dependiente de la pericia del operador. • Difícil distinguir entre progenitores normales de blastos residuales en leucemia de precursores de células B • El operador tiene que estar disponible localmente, ya que el análisis solamente se puede realizar con células frescas. • Dada la inestabilidad de la expresión antigénica en células leucémicas (cambio de linaje, pérdida de antígenos) durante o después del curso del tratamiento (cambio de IFT), es necesario obtener al menos 2 IFT aberrantes por paciente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Útil en sólo una minoría de pacientes • Probabilidad de contaminación cruzada de los productos de PCR resultando en falsos positivos • Riesgo de degradación del RNA e ineficiencia durante la retrotranscripción (lo que puede reducir la sensibilidad del método, resultando en falsos negativos) • Carencia de reproducibilidad de resultados cuando existe un bajo número de transcritos 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo prolongado de diagnóstico: identificación de las regiones de unión y evaluación de la sensibilidad • Relativamente costosa • Necesidad de dos blancos para PCR por paciente, dado que existe la posibilidad de cambio clonal • Riesgo de degradación del RNA e ineficiencia de la retrotranscripción. • Carencia de reproducibilidad de resultados cuando existe un bajo número de transcritos.

1.5.1.3 ESTIMACION DEL RIESGO APLICANDO EL MONITOREO DE LA ERM

La medición de la ERM durante la terapia de pacientes pediátricos con LLA ha demostrado la habilidad para proveer información crucial sobre la respuesta al tratamiento y el riesgo de recaída. Un gran número de estudios se han llevado a cabo en los cuales se ilustra el valor pronóstico de la medición de la ERM durante las primeras semanas de la

terapia. El grupo del St.Jude Children's Hospital evaluó la ERM al día 19 del inicio de la terapia de inducción de remisión en una cohorte de 100 niños, empleando CF.⁶⁴ Encontraron marcadores fenotípicos únicos para monitorear al ERM en el 90% de los niños empleando su panel de anticuerpos. De manera interesante, 51 de los 110 pacientes estudiados alcanzaron una remisión profunda al día 19 de la terapia de inducción, definida con un nivel del ERM $<0.01\%$; el éxito del tratamiento para éste grupo de pacientes, con una incidencia de recaída acumulada a 3 años de $1.9\pm 1.9\%$ comparada con $28.4\pm 6.4\%$ de pacientes con ERM $\geq 0.01\%$ ($p < 0.01\%$). El valor pronóstico de la cuantificación de la ERM también ha sido observado en otros estudios en que emplean la CF para monitorear la ERM durante la primera semana de la terapia de inducción.^{63, 65-67}

En contraste, durante los últimos años los centros pediátricos europeos han comenzado a adoptar protocolos estandarizados para la cuantificación de la ERM basados en técnicas de PCR de los rearrreglos de los genes IgH y TCR.^{61, 62} En una publicación histórica, Cave *et al*⁶⁸ demostraron que la medición del nivel del ERM en la remisión temprana era el predictivo más importante del éxito clínico en 178 niños tratados en un gran estudio cooperativo francés, en el que emplearon una técnica semicuantitativa mostraron que la detección de altos niveles de ERM (definida como $>10^{-2}$) después de remisión morfológica fue altamente predictiva de recaída; mientras que pacientes con bajos niveles de ERM tuvieron éxito similar a los pacientes en los que no se detectó ERM. De hecho, otros investigadores han sugerido que no es esencial erradicar toda la ERM, con el fin de alcanzar una Enfermedad Libre de Evento (abreviado DFS en inglés) prolongada.⁶⁹ Estos estudios demuestran que la medición de la ERM en un solo punto del tratamiento puede no proveer suficiente información del pronóstico clínico, y que la medición serial aumenta la capacidad predictiva de la prueba. En otro estudio que involucró 240 niños con LLA, van Dongen *et al*⁷⁰ encontró que la combinación de información semicuantitativa de ERM a diferentes puntos durante el tratamiento permitió la identificación de tres grupos de riesgo. El 43% de los pacientes estuvieron en el grupo de bajo riesgo con una tasa de recaída de sólo 2%; 43% estuvieron en el grupo de riesgo intermedio con una tasa de recaída del 23%; y un 15% del grupo de alto riesgo tuvieron una tasa de recaída del 75%.

Otros estudios confirman la importancia de las mediciones seriales y cuantitativas de la ERM.⁷¹⁻⁷⁶ Estos y otros estudios de ERM basados en PCR se muestran en el Cuadro 4.

También se han comparado los resultados de medición de la ERM en sangre periférica o médula ósea, con resultados similares a monitorear la ERM.^{64, 77-79} A la fecha, los datos sugieren que el monitoreo sanguíneo puede arrojar resultados comparables al nivel de ERM en médula ósea en pacientes con LLA de linaje T, empleando los métodos basados en CF y PCR.^{64, 78} Sin embargo, los resultados de monitoreo de ERM de precursores de LLA de linaje B parecen no ser uniformes; mientras un estudio muestra niveles equivalentes de ERM en sangre y médula ósea,⁷⁷ dos estudios demostraron que los niveles de ERM en médula ósea fueron más altos que en sangre.^{64, 78} Basados en los datos actuales, el monitoreo de ERM de médula ósea sigue siendo el “estándar de oro” para el monitoreo de la ERM en LLA de precursores de linaje B.

1.5.1.4 GENES CANDIDATOS COMO MARCADORES PARA EL MONITOREO DE LA ERM IDENTIFICADOS CON MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Desde que Golub *et al*⁸⁰ empleó los microarreglos de expresión génica para clasificar a un grupo de leucemias en LMA y LLA, se han venido realizando varios estudios, en los que se demuestra la utilidad de los datos de expresión génica obtenidos por microarreglos para clasificarlos. Se ha reportado también su potencial clasificatorio con resultados en los que los perfiles de expresión génica coinciden con anomalías en el cariotipo,^{43, 44} y se han tomado como predictivos de riesgo de recaída. Se ha propuesto a la sobre-expresión del gen OPAL1 como predictivo de una respuesta favorable,⁸¹ sin embargo existe otro reporte que la sobre-expresión no se asocia consistentemente con una respuesta favorable, concluyendo que la expresión es dependiente del tratamiento.⁸²

Más recientemente Flotho *et al*^{83, 84} identificaron que la baja expresión de CASP8AP2 es predictivo de una baja sobrevida libre de evento ($p = 0.02$) y una elevada tasa de recaída ($p = 0.01$). Altos niveles de expresión de CASP8AP2 llevan a las células a apoptosis; por lo que la medición de los niveles de expresión de CASP8AP2 permite identificar a los pacientes con células leucémicas altamente susceptibles a la quimioterapia.

Cuadro 4. Principales estudios del monitoreo de la ERM basado en PCR en LLA

Estudio	N	Método	Tiempos	Recaída/ERM		Conclusiones
				ERM (+)	ERM (-)	
Brisco 1996 ⁸⁵	27A *	IgH/TCR	Días 34–43	11/18 (61%)	3/9 (33%)	LLA en adultos es más resistente a las drogas que los niños
Roberts 1997 ⁶⁹	24N *	IgH/TCR (Cuantitativa)	Hasta 35 meses después de terminar la terapia	5/20 (25%)	0/2 (0%)	La cura de la LLA puede no requerir la eliminación de todas las células leucémicas
Feroni 1997 ⁷³	30A *	IgH/TCR (Cualitativa)	Después de la inducción	2/5 (40%)	2/5 (40%)	La resolución de la ERM en LLA ocurre más rápidamente en niños comparado con adultos La identificación de ERM temprana en LLA del adulto puede no correlacionar
			3 Meses	5/8 (62%)	1/5 (20%)	
			6 Meses	4/5 (80%)	1/10 (1%)	
Cave 1998 ⁶⁸	178N *	IgH/TCR (Cuantitativo)	Después de la inducción	25/63 (39%)	7/88 (7%)	ERM > 1% al final de la inducción, ó MRD > 0.1% después de 6 meses de la inducción alto riesgo de recaída
			Después de la Consolidación	15/32 (46%)	8/95 (8%)	
			6 Meses después de la Consolidación	21/38 (55%)	25/215 (11%)	
Van Dongen 1998 ⁷⁰	240N *	IgH/TCR moTAL-1 (Cualitativo)	Después de la inducción	40/98 (40%)	2/71 (2%)	ERM al día 33 y 78 define el riesgo de recaída: Alto riesgo: ERM > 1% al día 33 ó ERM > 0.1% al día 78 Bajo Riesgo: ERM < 0.01% al día 78 Sobrevida Libre de Evento: Alto riesgo = 16%; bajo riesgo = 98%
			4 – 6 meses	32/47 (68%)	18/166 (10%)	
			12 meses	18/21 (85%)	14/166 (8%)	
			Final del tratamiento	5/6 (83%)	9/148 (6%)	
Goulden 1998 ⁷¹	66N *	IgH/TCR (Cualitativo)	Después de 6 meses	23/33 (69%)	5/29 (17%)	Fuerte correlación entre clarificación de la ERM temprana en terapia y mejora de la Sobrevida Libre de Evento en LLA infantil
			Después de terminar la terapia	18/28 (64%)	6/30 (20%)	
Grumayer 2000 ⁸⁶	68N *	IgH/TCR (Cualitativa)	Día 15	16/54 (29%)	0/14 (0%)	ERM < 0.01% al día 15 de la terapia de inducción identifica a un grupo de pacientes con excelente pronóstico
Nyvold 2002 ⁷⁴	104N *	IgH/TCR (Cualitativa)	Día 15	2/34 (5%)	9/36 (25%)	ERM < 0.01% al día 29 identifica a pacientes con un pronóstico extremadamente favorable
			Día 29	15/60 (25%)	0/40 (0%)	
Marshall 2003 ⁷⁶	83N *	IgH/TCR (Cuantitativo)	1 Mes	22/28 (78%)	11/57 (19%)	ERM en los meses 1 y 24 del diagnóstico pueden identificar casi a todos los pacientes que recaerán durante o después de completar la terapia
			12 Meses	7/20 (35%)	12/59 (20%)	
			24 Meses	8/22 (36%)	14/54 (25%)	

*.- N = Niños A = Adultos

También se ha propuesto al gen PAX5 como un potencial gen para ser empleado en el monitoreo de la ERM, el cual fue seleccionado mediante un estudio exploratorio de pacientes con LLA empleando microarreglos de Genotipificación.⁸⁷ Sin embargo, anteriormente ya se habían observado diferencias en los niveles de expresión de PAX5, mostrando una mayor expresión en LLA de linaje B comparado con el linaje T en cuya expresión es baja o nula,^{88, 89} observándose incrementada su expresión en pacientes con LLA *de novo* y en recaída en comparación con pacientes en remisión ($p=0.011$ y $p=0.006$, respectivamente).

Los genes identificados como marcadores para el monitoreo de la ERM mediante el estudio de los perfiles de expresión pueden ser transferidos a una metodología más accesible y realizable en los laboratorios de hemato-oncología, como lo demuestran los resultados de Chen *et al*,⁹⁰ quienes identificaron la expresión diferencial del gen codificante para CD58 en pacientes con LLA, y el cual monitorearon por citometría de flujo en 104 pacientes en remisión clínica, encontrando ERM en el 9% de ellos. En otro estudio monitorean por CF a CD58 en pacientes con LLA-B y lo encuentran sobre-expresado en el 93.5% de los sujetos estudiados, observándose concordancia entre los niveles de ERM por CF y qPCR.⁹¹ Con éstos resultados se demuestra que el estudio de los perfiles de expresión génica en LLA puede llevar al descubrimiento de nuevos marcadores para el monitoreo de la ERM.

CAPITULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

Dado que no existen claramente genes marcadores que pueden ser utilizados para el monitoreo molecular de la ERM, que además puedan ser aplicados genéricamente en LLA, amén de las características genéticas heterogéneas de nuestra población, la cual es muy diferente a las poblaciones caucásicas empleadas en la mayoría de los reportes en los que se estudian perfiles de expresión en LLA con la finalidad de obtener genes marcadores útiles para el monitoreo de la ERM.

Nos propusimos utilizar la tecnología de Microarreglos de Expresión Génica, con la finalidad de analizar los perfiles de expresión génica de pacientes con LLA y seleccionar genes con niveles significativos de expresión diferencial, que pudieran ser utilizados posteriormente evaluados para determinar su utilidad en el monitoreo de la ERM. Además de identificar vías regulatorias alteradas y su probable implicación en la leucemogénesis.

De manera que, éste fue el primer paso en la búsqueda de nuevos genes útiles para el monitoreo de la ERM en LLA, que permitirán el seguimiento molecular en un mayor número de pacientes del que permiten los métodos basados en secuencias únicas (translocaciones), y con un menor costo y labor que los métodos basados en secuencias clonales (IgH y TCR). Además de realizarse en una población étnica diferente a la utilizada en estudios norteamericanos y europeos.

La finalidad del proyecto del que ésta investigación forma parte, es que en un futuro sea posible detectar remisiones incompletas de manera temprana, monitorear la ERM en un mayor número de pacientes de manera rápida y sensible, con marcadores constantes y confiables, para brindar al médico tratante la capacidad de tomar decisiones terapéuticas de manera oportuna.

CAPITULO III

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo General:

Analizar las diferencias en los perfiles de expresión génica de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda para identificar potenciales marcadores moleculares para el monitoreo de la Enfermedad Residual Mínima.

3.1.2 Objetivos específicos:

3.1.2.1 Caracterizar y clasificar citogenética, inmunofenotípica y molecularmente a la población de pacientes con LLA de reciente diagnóstico que acuden al Servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

3.1.2.2 Seleccionar potenciales genes marcadores útiles para el seguimiento de la ERM en LLA con base en el análisis de los perfiles de expresión génica de pacientes con LLA.

3.1.2.3 Validar el perfil de expresión de los genes seleccionados mediante RT-qPCR y evaluar su expresión en una cohorte de muestras de sujetos con LLA de reciente diagnóstico.

CAPITULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

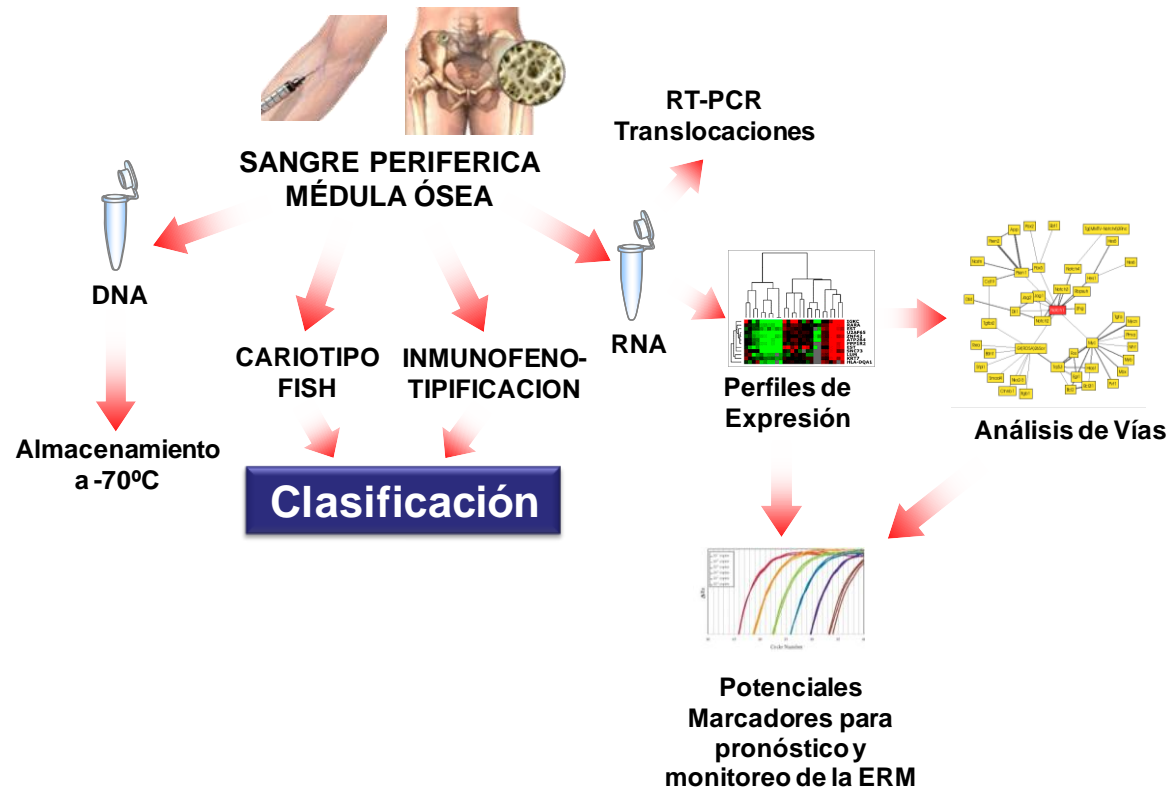


Figura 3. Estrategia General. Se esquematiza el flujo de trabajo realizado en ésta investigación. Se partió de muestras de sangre periférica y/o médula ósea, a partir de las cuales se obtuvieron DNA genómico, RNA total, se envió una alícuota para su inmunofenotipificación y otra para la realización del cariotipo. A partir del RNA total de muestras seleccionadas que cumplieran los criterios para determinarles los perfiles de expresión con microarreglos se procesaron, para obtener los perfiles de expresión, los cuales fueron analizados con software especializado y se identificaron vías de expresión y/o regulación alteradas y se seleccionaron genes diferencialmente expresados, de los cuales se validó su expresión mediante qPCR.

4.2 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) con diagnóstico de LLA y que no hubieran recibido tratamiento. Para establecer el diagnóstico, los pacientes se estudiaron y clasificaron mediante pruebas estándares del Laboratorio Clínico realizadas en el CUCC: morfología celular, pruebas citoquímicas e IFT. Una vez diagnosticados, los pacientes con LLA les fue explicado el estudio e 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 solicitaron la participación voluntaria de un grupo de 6 sujetos adultos clínicamente sanos. El protocolo de investigación fue sometido a evaluación por el Comité de Ética de la institución previo al inicio de la toma de muestras.

4.2.1 Criterios de inclusión.

- Pacientes con diagnóstico de LLA que acudieron al servicio de Hematología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” en el periodo Febrero 2005 – Agosto 2007 y que aceptaron participar en el estudio.
- No haber comenzado con el tratamiento.

4.2.2 Criterios de exclusión.

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

4.2.3 Criterios de eliminación.

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

4.3 Toma de Muestras.

De cada sujeto de investigación se obtuvieron los datos clínicos y una muestra de (15 ml) de sangre periférica, de la cual 10 ml fue anticoagulada con EDTA, y los 5 ml

restantes con Heparina de Sodio. La muestra heparinizada fue enviada el mismo día de la toma al Laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la UANL, para la realización del Cariotipo. La sangre con EDTA se almacenó inmediatamente a 4°C y fue la que se utilizó para la extracción de DNA genómico (DNAg) y de RNA total. Inmediatamente después de la toma de la muestra, y en un periodo de tiempo menor a 1 hora se comenzó el procesamiento de las muestras, con la finalidad de obtener lo más intacto posible al perfil de expresión génica.

4.4 Procesamiento de la muestra

4.4.1 Separación de células mononucleares

- 1) Agregar 3 ml de Histopaque®-1077 (Invitrogen®) a un tubo cónico de 15 ml, y esperar a que alcance la temperatura ambiente.
- 2) Cuidadosamente colocar por encima del Histopaque®-1077 de 3 – 5 ml de sangre periférica total, o médula ósea, con un pipeteador automático. Centrifugar a 1000 rpm 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 15 ml.
- 4) Agregar 10 ml de Buffer de lavado (PBS + 0.1% BSA + 2 mM EDTA, en agua DEPC) a 4°C y mezclar 10 veces por inversión. Centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos y 4°C.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla de células mononucleares en 5 ml de Buffer de lavado. Centrifugar nuevamente a 1000 rpm durante 10 minutos y 4°C.
- 6) Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla de células mononucleares en 1 ml de Buffer de lavado. Mantener en hielo hasta comenzar el procedimiento de separación de células con perlas magnéticas; el tiempo para su procesamiento deberá ser menor a una hora.

4.4.2 Purificación de tipos celulares

Proceder a partir de células mononucleares separadas por centrifugación en gradiente con Histopaque®-1077, y resuspendidas en 1 ml de Buffer de lavado. En los casos en que la cantidad de células obtenidas del paso de separación de células mononucleares por centrifugación en gradiente sea muy pequeña (pastilla de células mononucleares inferior a 2 mm de altura en tubo cónico de 15 ml, antes de resuspender), omitir la purificación de tipos celulares y proceder directamente a la extracción del RNA total.

- 1) Tomar una alícuota de 100 – 200 µl de perlas magnéticas (Dynabeads®) del vial stock, recubiertas con el anticuerpo correspondiente al linaje leucémico reportado por el laboratorio de hematología. Para el caso de linaje B emplear las perlas recubiertas con anti-CD19, mientras que para el linaje T emplear perlas recubiertas con anti-CD2. Colocar la alícuota de perlas en un microtubo de 1.7 ml con 1 ml de buffer de lavado. Este procedimiento es para eliminar la azida de sodio que preserva a los anticuerpos. Homogenizar perfectamente por pipeteo y colocar el microtubo en la gradilla magneto durante 1 minuto. Tomar cuidadosamente con una micropipeta el sobrenadante y descartarlo. Retirar el microtubo de la gradilla y resuspender las perlas adheridas a la pared del microtubo con 1 ml de buffer de lavado a 4°C.
- 2) Tomar todo el contenido del microtubo y agregarlo al tubo cónico de 15 ml con las células mononucleares previamente separadas y lavadas. Incubar durante una hora con rotación, a 4°C.
- 3) Una vez transcurrido el periodo de incubación, colocar el tubo cónico de 15 ml en la gradilla magneto durante 1 minuto. Con un pipeteador automático y una pipeta Pasteur retirar todo el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo cónico de 15 ml. Retirar el tubo cónico de la gradilla magneto y agregar 5 ml de buffer de lavado a 4°C para resuspender y lavar las células adheridas a las perlas magnéticas.
- 4) Colocar nuevamente el tubo cónico en la gradilla magneto durante 1 minuto. Con un pipeteador automático y una pipeta Pasteur retirar el sobrenadante y

descartarlo. Retirar el tubo de la gradilla magneto y agregar 1 ml de buffer de lavado a 4°C y resuspender.

- 5) Tomar una alícuota de 500 µl de células resuspendidas y purificadas en el paso 5; y colocarlas en un criovial cónico. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 ml de RNAlater (AMBION®). Etiquetar adecuadamente y almacenar inmediatamente a -70°C.
- 6) Proceder a la extracción del RNA total con 400 µl de células purificadas en el paso 4, y a la extracción de DNA genómico con los 100 µl restantes. En caso de no procesarlos inmediatamente, realizar el procedimiento del paso 5.

El sobrenadante recuperado durante el paso 3 debe de mantenerse a 4°C y proceder de igual manera a partir del paso 2 en caso de realizar la purificación celular con nuevas perlas magnéticas. En el caso de las células recuperadas en los sobrenadantes empleando una o dos purificaciones de tipos celulares, almacenarlas en RNAlater para estudios posteriores.

4.4.3 Extracción de DNA genómico

En éste paso se procedió de acuerdo a las instrucciones descritas por el estuche QIAamp® DNA Blood Midi Kit (QIAGEN®). Brevemente, los pasos fueron los siguientes:

- 1) Pipetear 100 µl de Proteasa y agregarla al fondo de un tubo cónico de 15 ml.
- 2) Agregar entre 300 – 500 µl de sangre ó 100 µl de células purificadas con perlas magnéticas por tipo celular, y completar a 1 ml de con PBS en agua DEPC. Mezclar suavemente.
- 3) Agregar 1.2 ml de Buffer AL y mezclar suavemente por inversión 15 veces. Después agitar vigorosamente por al menos 1 minuto. Incubar a 70°C x 10 min.
- 4) Agregar 1 ml de Etanol Absoluto al 100% y mezclar por inversión 10 veces, y a continuación vortexear vigorosamente hasta homogenizar la solución.
- 5) Agregar toda la solución anterior a una columna QIAamp Midi colocada en un tubo cónico de 15 ml. Cerrar el tubo y centrifugar a 3000 rpm x 3 min.

- 6) Desechar el eluido y colocar la columna nuevamente en el tubo de 15 ml. Agregar 2 ml de Buffer AW1 a la columna. Cerrar el tubo y centrifugar a 5000 rpm x 1 minuto (después de centrifugar no desechar el eluido todavía).
- 7) Agregar a la columna 2 ml de Buffer AW2. Cerrar y centrifugar a 5000 rpm x 15 minutos.
- 8) Colocar la columna en un tubo cónico de 15 ml nuevo y eliminar el tubo anterior del eluido (si la columna está salpicada de líquido, secarla).
- 9) Agregar 200 μ l de Buffer AE o Agua MQ a temperatura ambiente. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 5,000 rpm x 2 minutos.
- 10) Tomar el eluido y colocarlo nuevamente en la membrana e incubar por otros 5 minutos (o en su defecto, agregar 100 μ l de Buffer AE, realizar el mismo procedimiento que el eluido anterior) y centrifugar a 5,000 rpm x 4 minutos.
- 11) Transferir el eluido a un tubo cónico de 1.5 con tapa de rosca, perfectamente rotulado con los siguientes datos: Clave consecutiva, Muestra (por ejemplo: DNA(SP) o DNA(MO), dependiendo si la muestra es de Sangre Periférica o Médula Ósea, tipo celular y Fecha.
- 12) Almacenar a -20°C .

4.4.5 Extracción de RNA total

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

- 1) Centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm una alícuota de las células purificadas con perlas magnéticas, o preservadas en RNAlater. Eliminar la mayor cantidad de líquido posible, ya que afectará la extracción, obteniendo un bajo rendimiento.
- 2) Agregar Buffer RLT (para lisar las células) y vortexear muy bien hasta disolver la pastilla de células y cualquier agregado de células. Agregar 350 μ l a $\leq 5,000,000$ de células, y 600 μ l si son entre 5 y 10 millones de células. Asegurarse que el lisado obtenido no sea viscoso o gelatinoso; de ser así procesar con mayor volumen de

buffer RLT (doble o triple según se requiera), cambiando respectivamente los volúmenes y número de columnas).

- 3) Agregar un volumen de etanol al 70% y mezclar por pipeteo. 350 o 600 μ l, dependiendo del volumen inicial de RLT.
- 4) Transferir un máximo de 700 μ l de la mezcla del paso 3 a una columna Rneasy; cerrar la tapa y centrifugar x 15 segundos a máxima velocidad (\geq 10,000 rpm). Descartar el eluido. Si el volumen de mezcla es mayor a 700 μ l, agregar el resto de la muestra en la misma columna y repetir la centrifugación.
- 5) Agregar 700 μ l de Buffer RW1, cerrar la tapa de la columna y centrifugar x 15 segundos a máxima velocidad (\geq 10,000 rpm). Descartar el eluido.
- 6) Opcional:
 - 1.- Preparar solución de DNAsa I, agregando 10 μ l de solución stock de DNAsa I a 70 μ l de Buffer RDD. Mezclar por inversión. Spin breve.
 - 2.- Agregar 80 μ l de solución de DNAsa I a la columna e incubar x 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 30°C).
- 7) Agregar 500 μ l de Buffer RPE a la columna. Cierre la tapa de la columna. Centrifugar x 15 segundos a máxima velocidad (\geq 10,000 rpm). Descartar el eluido.
- 8) Repetir el lavado anterior con 500 μ l de Buffer RPE. Cerrar la tapa de la columna y centrifugar x 3 minutos a máxima velocidad (\geq 10,000 rpm). Descartar el eluido.
- 9) Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml, libre de RNAsas. Agregar directamente de 20 - 25 μ l de AGUA LIBRE DE RNAsas, directamente sobre la membrana. Cerrar la tapa de la columna. Incubar un minuto a temperatura ambiente y centrifugar por un minuto a máxima velocidad. Recuperar el eluido, ya que contiene el RNA.
- 10) Tomar el eluido y agregarlo nuevamente a la columna y centrifugar nuevamente por un minuto a máxima velocidad.
- 11) Cuantificar y etiquetar el tubo.

4.4.6 Verificación de Calidad del RNA

ANTES DE COMENZAR:

Atemperar los reactivos del estuche RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies®); preparar y limpiar el equipo de electroforesis capilar (Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies®). Descongelar los RNAs y mantenerlos en hielo. Ajustar un termomixer a 70°C.

4.4.6.1 Preparación de la matriz en gel

- 1) Colocar 550 μ l del gel matriz (RNA 6000 Nano gel matrix) en uno de los filtros incluidos en el estuche.
- 2) Centrifugar a 1,500 g por 10 minutos.
- 3) Alicuotar el gel matriz en fracciones de 65 μ l.
- 4) Mezclar el colorante concentrado (RNA 6000 Nano Dye).
- 5) Agregar 1 μ l del colorante concentrado a los 65 μ l de matriz filtrada. Mezclar en vortex.
- 6) Centrifugar durante 10 minutos a 14,000 rpm. Usar la mezcla preparada el mismo día.

4.4.6.2 Desnaturalización de la muestra

Desnaturalizar las alícuotas de RNA a 70°C durante 2 minutos. Inmediatamente después colocar en hielo. Centrifugar brevemente y colocar nuevamente en hielo.

4.4.6.3 Preparación y corrimiento de la electroforesis capilar

- 1) Colocar el Chip en la estación de carga.
- 2) Cargar 9 μ l de la mezcla gel-colorante recién preparada en el pozo marcado con una G en negro, y presurizar con la jeringa de la estación de carga durante exactamente 30 segundos. Liberar el seguro que bloquea al embolo de la jeringa y esperar hasta que no se mueva. Agregar 9 μ l de la mezcla gel-colorante a los dos pozos marcados con G.

- 3) Cargar 5 μ l del marcador (RNA 6000 Nano Marker) en el pozo marcado con una “escalera”, y 5 μ l en cada uno de los 12 pozos para muestras. En los pozos que no se usen agregar 6 μ l del marcador.
- 4) Cargar 1 μ l del marcador escalera (RNA 6000 ladder) en el pozo marcado como “escalera”.
- 5) Cargar 1 μ l de muestra en cada pozo para muestra.
- 6) Mezclar el chip en la estación de mezcla (vortex) durante 1 minuto a 2400 rpm.
- 7) Colocar el chip en el equipo Bioanalyzer 2100 y presionar “Start” en el software del equipo para comenzar la electroforesis capilar.
- 8) Una vez terminada la corrida tomar nota de la claridad de las bandas en el electroferograma correspondientes a las subunidades 28S y 18S, así como valores de la relación 28S/18S y de integridad (RIN). Ver Figura 4.

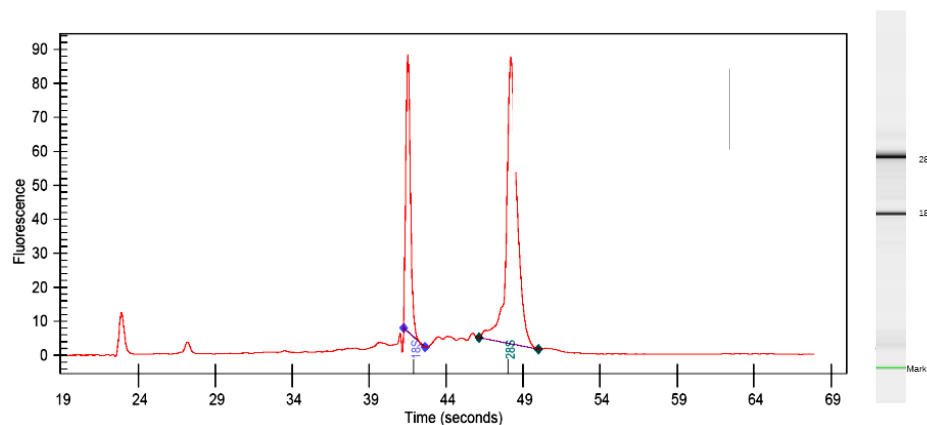


Figura 4. Electroferograma de RNA total eucariota. En la figura se observa un electroferograma de alta calidad en el que se muestran los dos picos correspondientes a las bandas 28S y 18S del RNA ribosomal. Del lado derecho se muestra la interpretación del electroferograma como una electroforesis. Nótese la ausencia de bandas o barrido entre las 28S y 18S. Cerca del marcador se observa un pequeño pico (~ 100 pb) correspondiente a las subunidades 5S y 5.8S del rRNA, tRNAs y fragmentos de RNAs pequeños.

4.4.7 Marcaje de muestras e hibridación con microarreglos

En éste paso se procedió de acuerdo a las instrucciones descritas en el manual técnico de Affymetrix™ para análisis de expresión y procesamiento de una muestra de RNA eucariota. El microarreglo utilizado fue el HG-U133 Plus 2.0. Los pasos realizados fueron los siguientes:

ANTES DE COMENZAR:

- 1) Asegurarse de que la calidad del RNA que se procesará es adecuada (medida en el Bioanalyzer debe tener un RIN mayor o igual a 8, y en el electroferograma se deben observar dos picos bien definidos en 18S y 28S).
- 2) La concentración de la muestra debe ser preferentemente entre 5 y 10 ug de RNA, para asegurar una buena calidad de hibridación.
- 3) Esta concentración debe encontrarse en un volumen no mayor a 7 µl.

I. Dilución de controles de RNA Poly-A.

1. Agregar 2 µl de Poly-A Control Stock en 38 µl de Poly-A Control Dilution Buffer (Dilución 1:20). Vortexear y centrifugar 3 segundos.
2. Tomar 2 µl de la dilución anterior y agregar 98 µl de Poly-A Control Dilution Buffer (Dilución 1:50).

De acuerdo a la concentración de RNA inicial, preparar la siguiente dilución de los controles de Poly-A:

Total de Muestra	3ª Dilución	
1 µg	1:50	2 µl de la segunda dilución en 98 µl de Buffer de controles.
5 µg	1:10	5 µl de la segunda dilución en 45 µl de buffer de controles.
10 µg	1:5	5 µl de la segunda dilución en 20 µl de buffer de controles.

Agregar 2 µl de la última dilución (según lo preparado de acuerdo a la tabla anterior) a la muestra de RNA.

Si la muestra contiene una concentración de 1-3 µg de RNA, la dilución anterior es útil para 25 reacciones.

Si la muestra contiene una concentración de 4-7 µg de RNA, la dilución anterior es útil para 10 reacciones.

Si la muestra contiene una concentración de 8 µg de RNA, la dilución anterior es útil para 5 reacciones.

Calcular el volumen inicial de Poly-A Control Stock de acuerdo al número de reacciones que va a alicuotar.

II. SINTESIS DE LA PRIMERA HEBRA DE cDNA

1. Mezclar y centrifugar los reactivos del estuche antes de realizar la mezcla de reacción, y capturar los siguientes programas en el termociclador:

* One Cycle Incubation	70°C x 10 minutos 4°C x 4 minutos
* One Cycle cDNA syn	42°C x 1 hora 2 minutos 42°C x infinito

2. Realizar la siguiente mezcla de reacción, de acuerdo con la concentración inicial de RNA.

Si la concentración total de RNA es de 1-8 µg:

REACTIVO	VOLUMEN
RNA	7 µl **
Controles Poly-A diluidos	2 µl
T7-oligo (dT) primer	2 µl
Agua libre de RNAsas	1 µl **
VOLUMEN FINAL	12 µl

Si la concentración total de RNA es de 8.1-15 µg:

REACTIVO	VOLUMEN
RNA	7 µl **
Controles Poly-A diluidos	2 µl
T7-oligo (dT) primer	2 µl
Agua libre de RNAsas	0 µl **
VOLUMEN FINAL	12 µl

** Si el volumen de muestra es distinto al indicado en la tabla anterior, ajustar el volumen de agua libre de RNAsas, para obtener los volúmenes finales de la tabla, de acuerdo a la siguiente fórmula:

1-8 µg	8.1 a 15 µg
VOL de Agua= 12 – (Vol de Muestra + 4)	VOL de Agua= 11 – (Vol de Muestra + 4)

3. Mezclar y centrifugar por 3 segundos.
4. Colocar la muestra en el termociclador y correr el programa de incubación.

Mientras se incuba la muestra, prepare la siguiente mezcla, según el número de muestras a procesar:

REACTIVO	VOLUMEN
5X 1st Strand Reaction Mix	4 μ l
DTT 0.1 M	2 μ l
dNTPs 10 mM	1 μ l
VOLUMEN FINAL	7 μl

5. Agregar los 7 μ l de la mezcla anterior a cada muestra, cuando ésta esté a 4°C. Mezclar utilizando vortex y centrifugar.
6. Correr el segundo programa del termociclador, hasta que llegue a 42°C, y cuando esté a 42°C, colocar la muestra e incubar por 2 minutos. Tener lista la enzima SuperScript II y al terminar los 2 minutos, pausar el programa y agregar los siguientes volúmenes:

1-8 ug	8.1-15 ug
1 μ l de SuperScript II	2 μ l de SuperScript II

7. Incubar durante 1 hora a 42°C y dejar a 4°C al menos por dos minutos.

III. SINTESIS DE LA SEGUNDA HEBRA DEL cDNA

- 1) Introducir los siguientes programas en el termociclador:

Síntesis de segunda hebra	16°C x 2 horas 4°C x ∞
T4 DNA polimerasa	16°C x 10 minutos 4°C x ∞

- 2) Preparar la siguiente mezcla de reacción por muestra:

REACTIVO	VOLUMEN
Agua libre de RNAsas/DNAsas	91 μ l
5X Second Strand Reaction Mix	30 μ l
dNTPs, 10 mM	3 μ l
<i>E. coli</i> DNA ligasa	4 μ l
<i>E. coli</i> DNA polimerasa I	4 μ l
RNAse H	1 μ l
VOLUMEN TOTAL	133 μl

- 3) Agregar la mezcla anterior a las muestras de primera hebra sintetizadas anteriormente, para obtener un volumen final de 150 μ l. Incubar la muestra durante 2 horas a 16°C.
- 4) Cuando termine la primera incubación, retirar la muestra del termociclador. Agregar 2 μ l de T4 DNA polimerasa e incubarlo durante 10 minutos a 16°C.
- 5) Al terminar la incubación, agregar 10 μ l de EDTA 0.5 M y proceder inmediatamente a limpiar las muestras. No dejar las muestras a 4°C por mucho tiempo.

IV. LIMPIEZA DE LAS MUESTRAS

- 1) Preparar el buffer de cDNA añadiendo 24 ml de etanol a la botella de buffer según se indica en el estuche.
- 2) Transferir las muestras a un microtubo de 1.5 ml.
- 3) Agregar 600 μ l de cDNA Binding Buffer a la mezcla de cDNA y mezclar con vortex durante 3 segundos. La muestra debe de ser de color amarillento. Si la muestra es color naranja o violeta, agregar 10 μ l de acetato de sodio 3M pH 5.0 y mezclar hasta que se torne amarilla.
- 4) Agregar 500 μ l de la mezcla a la cDNA Cleanup Spin Column, que deberá estar colocada en un tubo recolector de muestra de 2 ml. Centrifugar durante un minuto a $>800 \times g$ (10,000 rpm).
- 5) Agregar el resto de la muestra y centrifugar como en el paso anterior. Descartar el líquido filtrado.
- 6) Colocar la columna dentro de un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Agregar 750 μ l de cDNA Wash Buffer. Centrifugar durante un minuto a 10,000 rpm. Descartar el líquido filtrado.
- 7) Abrir la tapa de la columna (asegurarse que la tapa se coloca a contrareloj de la rotación de la centrifuga) y centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad. Descartar el líquido filtrado.

- 8) Colocar la columna en un tubo de recolección de 1.5 ml y agregar 14 μ l de cDNA Elution Buffer. Incubar durante un minuto a temperatura ambiente y centrifugar durante un minuto a máxima velocidad (14,000 rpm).
- 9) Proceder inmediatamente a la reacción de transcripción *in vitro* (IVT).

V. REACCION DE IVT

- 1) Si se partió de una concentración inicial de 1 – 8 μ g de RNA se utilizarán los 12 μ l del purificado. Preparar la siguiente mezcla:

REACTIVO	VOLUMEN
cDNA purificado	12 μ l
10X IVT Labeling Buffer	4 μ l
IVT Labeling NTP mix	12 μ l
IVT Labeling Enzyme Mix	4 μ l
Agua libra de RNAsas	8 μ l
VOLUMEN FINAL	40 μl

- 2) Si se partió de una concentración inicial de 8.1 – 15 μ g de RNA se utilizarán sólo 6 μ l del purificado. Preparar la siguiente mezcla:

REACTIVO	VOLUMEN
cDNA purificado	6 μ l
10X IVT Labeling Buffer	4 μ l
IVT Labeling NTP mix	12 μ l
IVT Labeling Enzyme Mix	4 μ l
Agua libra de RNAsas	14 μ l
VOLUMEN FINAL	40 μl

- 3) Mezclar e incubar la muestra a 37°C durante 16 horas en termociclador.

Si no se va a purificar la muestra inmediatamente después de la reacción IVT, almacenar las muestras de cRNA (molécula que resulta de la transcripción *in vitro* del RNA original) a -20°C ó -70°C.

VI. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL cRNA BIOTINILADO

Tener listo etanol absoluto al 100% y al 80% (v/v) antes de comenzar. Este procedimiento deberá realizarse a temperatura ambiente y sin interrupción.

Antes de iniciar, preparar el IVT cRNA Wash Buffer agregando 20 ml de etanol absoluto al buffer, según se indica en el estuche. Guardar 5 µl del IVT cRNA Wash Buffer para analizarlo en el equipo Bioanalyzer.

- 1) Agregar 60 µl de agua libre de RNAsas a la reacción IVT que recién terminó su incubación de 37°C x 16 horas. Mezclar con vortex durante 3 segundos.
- 2) Agregar 350 µl de IVT cRNA Binding Buffer a la muestra y mezclar durante 3 segundos.
- 3) Agregar 250 µl de etanol absoluto al 100% al lisado y mezclar bien por pipeteo.
- 4) Agregar 700 µl de la mezcla anterior a la columna de limpieza incluida en el estuche de IVT cRNA, previamente colocada en un tubo de recolección de 2 ml, y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm. Descartar el líquido filtrado.
- 5) Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección y agregar 500 µl de IVT cRNA Wash Buffer. Centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm y descartar el líquido filtrado.
- 6) Agregar 500 µl de etanol al 80% a la columna y centrifugar durante 15 segundos a 10,000 rpm.
- 7) Abrir la tapa de la columna y centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad. Descartar el líquido filtrado.
- 8) Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml y agregar 11 µl de agua libre de RNAsas a la membrana de la columna. Asegurarse de que se agregue el agua directamente en la membrana. Centrifugar un minuto a máxima velocidad.
- 9) Realizar una dilución de 1:100 y de 1:200.
- 10) Cuantificar el cRNA obtenido en el Nanodrop.

Emplear la siguiente fórmula para calcular el producto real de RNA:

$$\text{cRNA} = \text{cRNA IVT} - (\text{total RNA})(\text{porcentaje usado de cDNA en la IVT})$$

Porcentaje de cDNA 1 – 8 µg de RNA inicial: la ecuación se multiplica por 1.

Porcentaje de cDNA 8.1 – 15 µg de RNA inicial: la ecuación se multiplica por 0.5.

Se recomienda realizar un análisis en el Bioanalyzer si hay más de 6 muestras.

VII. FRAGMENTACIÓN DEL cRNA

- 1) Preparar la siguiente mezcla de fragmentación:

REACTIVO	VOLUMEN
cRNA	20 μ g (1 – 21 μ l)
5X Fragmentation Buffer	8 μ l
Agua libre de RNAsas	Aforar a 40 μ l

- 2) Incubar a 94°C durante 35 minutos. Colocar el hielo posterior a la incubación.
- 3) Realizar un análisis de la fragmentación en el bioanalizador, procesando de igual manera que una muestra de RNA total. Ver Figura 5.

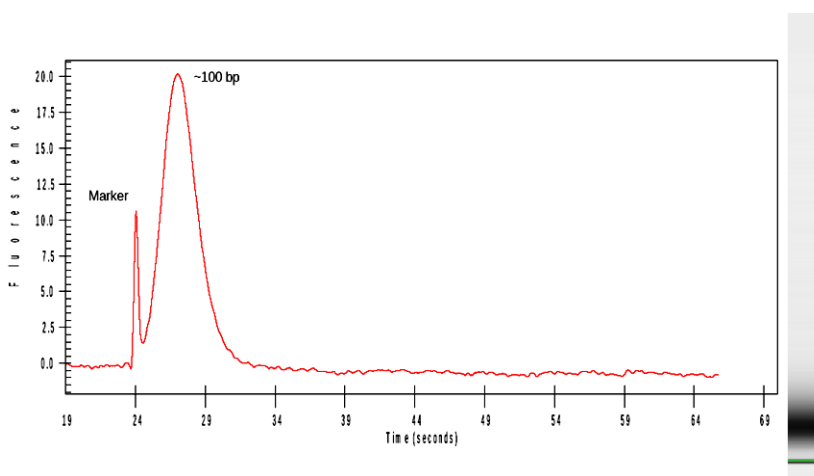


Figura 5. Electroferograma de cRNA fragmentado adecuadamente. En la figura se observa el electroferograma resultante de un cRNA fragmentado de manera apropiada para ser hibridado en un microarreglo. Del lado derecho se observa la interpretación como electroforesis del electroferograma.

VIII. HIBRIDACIÓN DE LAS MUESTRAS

- 1) Preparar 50 ml de buffer de hibridación 2X:

REACTIVO	VOLUMEN
MES 12X	8.3 ml
NaCl 5 M	17.7 ml
EDTA 0.5 M	4 ml
Tween 20 al 10%	0.1 ml
Agua libre de RNAsas	10.9 ml

Proteger de la luz, y guardarlo a 4°C.

- 2) Sacar los microarreglos para que se atemperen.
- 3) Calentar durante 5 minutos los Eukaryotic Hyb Controls a 65°C antes de comenzar la preparación de la mezcla de hibridación.
- 4) Preparar el coctel de hibridación de la siguiente manera:

REACTIVO	VOLUMEN
cRNA fragmentado	15 µg
Control Oligonucleotide B12	5 µl
20X Hyb Eukaryotic Controls	15 µl
Herring Sperm DNA	3 µl
BSA 50 mg/ml	3 µl
2X Hyb Buffer	150 µl
DMSO	30 µl
Agua libre de RNAsas	Aforar a 300 µl
VOLUMEN FINAL	300 µl

IMPORTANTE:

Antes de comenzar a calentar el Cocktail de Hibridación a 99°C durante 5 minutos. También agregar 200 µl de Buffer de Hibridación 1X al microarreglo para hidratarlo, e incubar en el horno de hibridación a 45°C durante 10 minutos con rotación.

- 5) Transferir el Cocktail de Hibridación a otra placa para calentarlo a 45°C durante 5 minutos. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos para remover cualquier material insoluble.
- 6) Retirar el microarreglo del horno de hibridación y desechar la solución con que se hidrató.
- 7) Tomar cuidadosamente el Cocktail de Hibridación clarificado, evitando cualquier material insoluble del fondo del tubo y colocarlo dentro del microarreglo. Sellar muy bien los orificios del microarreglo.
- 8) Dejar hibridando en el horno a 45°C durante 16 horas a 60 rpm.
- 9) Durante el periodo de incubación preparar las soluciones necesarias para los siguientes pasos de lavado y tinción.

IX. LAVADO, TINCIÓN Y ESCANEADO DEL MICROARREGLO

Antes de comenzar, preparar las siguientes soluciones:

Buffer de Lavado A: Solución de Lavado No-Astringente
(SSPE 6X, Tween-20 0.01%)

REACTIVO	VOLUMEN
SSPE 20X	300 ml
Tween-20 10%	1.0 ml
Agua MQ	Aforar a 1000 ml
Filtrar a través de un filtro de 0.2 µm	

Buffer de Lavado B: Solución de Lavado Astringente
(100 mM MES, [Na⁺] 0.1M, Tween-20 0.01%)

REACTIVO	VOLUMEN
MES 12X	83.3 ml
NaCl 5M	5.2 ml
Tween-20 10%	1.0 ml
Agua MQ	Aforar a 1000 ml
Filtrar a través de un filtro de 0.2 µm	

Almacenar a 4°C y proteger de la luz

Buffer de Tinción 2X

(Concentración Final 1X: MES 100 mM, [Na⁺] 1M, Tween-20 0.05%)

REACTIVO	VOLUMEN
MES 12X	41.7 ml
NaCl 5M	92.5 ml
Tween-20 10%	2.5 ml
Agua MQ	Aforar a 250 ml
Filtrar a través de un filtro de 0.2 µm	

Almacenar a 4°C y proteger de la luz

Stock IgG de Cabra 10 mg/ml

REACTIVO	VOLUMEN
Anticuerpo IgG de Cabra	50 mg
NaCl 150 mM	5 ml

Almacenar a 4°C. Si se prepara un volumen mayor, alicuotar en volúmenes de 5 ml y almacenar a -20°C hasta su uso. Una vez descongelado almacenar a 4°C.

- 1) Una vez terminado el tiempo de hibridación, retirar del horno de hibridación y registrar el experimento en el software GCOS. El proceso de registro involucra registrar el experimento, y los microarreglos con el nombre de la muestra hibridada y el tipo de muestra; el procedimiento se simplifica escaneando el código de barras de cada microarreglo.
- 2) Una vez registrado el experimento, encender la Estación de Lavado y seleccionar el experimento. Purgar la Estación de Lavado, colocando Buffer de Lavado No-Astringente en el reservorio A y comenzar el protocolo correspondiente en el software GCOS.

Antes de continuar preparar las siguientes soluciones:

Solución SAPE

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Buffer de Tinción 2X	600 μ l	1X
50 mg/ml de BSA	48 μ l	2 mg/ml
1 mg/ml de Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)	12 μ l	10 μ g/ml
Agua MQ	540 μ l	-
Volumen Total	1200 μl	

Mezclar muy bien y dividir en dos alícuotas de 600 μ l.

Solución de Anticuerpos

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
Buffer de Tinción 2X	300 μ l	1X
50 mg/ml de BSA	24 μ l	2 mg/ml
10 mg/ml del Stock de IgG de Cabra	6 μ l	0.1 mg/ml
0.5 mg/ml de anticuerpo biotinilado	3.6 μ l	3 μ g/ml
Agua MQ	266.4 μ l	-
Volumen Total	600 μl	

- 3) Retirar completamente el Cocktail de Hibridación del microarreglo hibridado y llenar completamente con Buffer de Lavado No-Astringente.
- 4) Cargar el programa de tinción adecuado según el estuche de marcaje utilizado, como se indica en el manual del equipo.
- 5) Insertar apropiadamente los microarreglos en los módulos correspondientes en la estación de lavado.

- 6) Retirar cualquier vial microcentrifugo en los contenedores de muestra de la estación de lavado.
- 7) Colocar un vial conteniendo 600 µl de solución SAPE en los contenedores 1 y 3.
- 8) Colocar un vial conteniendo 600 µl de solución de anticuerpo anti-streptavidin biotinilado en el contenedor 2.
- 9) Presionar hacia abajo las agujas de los contenedores para comenzar la corrida.
- 10) Una vez terminada la corrida asegurarse de que los microarreglos no contengan burbujas.
- 11) Retirar los microarreglos de la Estación de Lavado y sellar los orificios de lavado en el microarreglo.

Si los microarreglos no serán escaneados inmediatamente, mantenerlos a 4°C en la oscuridad hasta su lectura.

Antes de escanear los microarreglos, asegurarse de que el laser del escáner (Affymetrix® GeneChip® Scanner 3000) ha calentado por al menos 10 minutos. Si los microarreglos fueron almacenados a 4°C, esperar a que alcancen la temperatura ambiente antes de escanearlos.

- 12) Colocar los microarreglos adecuadamente en el carrusel del escáner.
- 13) Cargar el experimento con los microarreglos a escanear y comenzar el escaneado.
- 14) Una vez terminados de escanear todos los microarreglos, exportar el resultado de cada microarreglo para poder ser analizado en otra estación de trabajo. Asegurarse de incluir el archivo .CEL al momento de exportar los resultados, ya que en el se incluyen los datos crudos que se utilizarán durante el análisis de los perfiles de expresión.

4.5 Procesamiento y análisis de los resultados de microarreglos de expresión génica

Analizar los archivos .CEL de cada microarreglo escaneado, tomando en cuenta:

- El linaje de la Leucemia (T o B)
- La edad del paciente (Niño [N], Pediátrico [P] o Adulto [A])

- Pronóstico terapéutico (Bueno [b] o Malo [m])

Enfocar el análisis tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- **Control de Calidad:** Analizar los datos crudos, su distribución y el comportamiento de los controles establecidos por la manufactura, para detectar errores en el proceso de hibridación.
- **Corrección de Fondo:** Para eliminar errores por la hibridación inespecífica y por ajuste del escáner.
- **Normalización:** Para eliminar la variación sistemática y ajustar los niveles de expresión entre los microarreglos analizados, para hacerlos comparables entre sí.
- **Sumarización:** Resume y promedia la información de las 16-20 sondas de cada transcrito analizado en un solo valor, que es el nivel de expresión.

Los conjuntos de sondas que determinan la expresión de cada gen están formados por 16-20 pares de oligonucleótidos para determinación de los niveles de expresión de cada transcrito. El microarreglo utilizado (HG-U144 Plus 2.0) incluye aproximadamente 47,000 transcritos incluyendo más de 38,500 genes perfectamente bien caracterizados en UniGene. En total existen más de 54,000 pares de sondas en el microarreglo. En la siguiente tabla se muestran los controles en el microarreglos utilizados para determinar la calidad de la hibridación y para la normalización y semicuantificación:

CARACTERÍSTICAS DEL MICROARREGLO HG-U133 Plus 2.0	
Número de transcritos	>47,000
Número de genes	>38,500
Controles de Hibridación	bioB, bioC, bioD de <i>E. coli</i> y cre del Bacteriofago P1
Controles de Poly-A	dap, lys, phe, thr de <i>B. subtilis</i>
Housekeeping Genes	GAPDH, Beta-Actina, Hexocinasa 1
Controles de normalización	100 sondas

Introducir los datos de los archivos .CEL al software libre R (<http://www.r-project.org>), al cual previamente se han instalado todos los módulos de **BioConductor** (<http://www.bioconductor.org>). Antes de de importar los datos deberá se cargarse el

módulo *affy* y sus dependencias. Para determinar la dispersión inicial de los datos y los efectos de los métodos de normalización se analizan solamente los controles.

Una vez importados los datos, realizar gráficas de dispersión (Scattering) de cada microarreglo todos los genes en todos los microarreglos de manera coordinada. Analizar las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe expresión diferencial $|g_{i\kappa}| = \mu$

&

H_1 : Expresión diferencial a lo largo de todos los grupos $|g_{i\kappa}| > \mu$

Donde g_i es el nivel de expresión del gen i en el microarreglo κ .

Representar los niveles de expresión de los genes seleccionados de cada contraste realizado en un gráfico de “agrupamiento no jerarquizado” (hierarchical clustering) coloreado en “mapa de calor” (heat map), en el que el color rojo representa sobre-expresión, el verde sub-expresión y el negro no-expresado.

Generar y exportar tablas con los genes diferencialmente expresados y los valores de expresión de cada gen de cada microarreglo y en cada contraste realizado.

Realizar un exhaustivo “Análisis de Vías” importando las tablas anteriormente generadas al software Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>).

4.6 Análisis de vías de los genes diferencialmente expresados.

Generar y exportar tablas con los genes diferencialmente expresados y los valores de expresión de cada gen de cada microarreglo y en cada contraste realizado.

Realizar un exhaustivo “Análisis de Vías” importando las tablas anteriormente generadas al software Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>). Evidenciar interacciones directas, indirectas, regulatorias y represoras, entre los productos de los genes introducidos al software, así como vías de señalización y regulación más alteradas.

4.7 Validación por qPCR-Array de genes diferencialmente expresados

4.7.1 Preparación del cDNA

Realizar una reacción de retrotranscripción a partir de 500 ng de RNA total extraído previamente de las muestras de pacientes con LLA, empleando el estuche SuperScript™ III First-Strand Synthesis Supermix, siguiendo las siguientes instrucciones:

- 1) Mezclar y centrifugar brevemente cada componente del estuche antes de usar. Precalentar el termociclador a 65°C.

Combinar los siguientes reactivos en un microtubo de PCR de 0.2 ml en hielo: y su replica.

También generar gráficas de distribución con todos los datos de cada microarreglo para evidenciar la distribución de intensidades entre todos los microarreglos a comparar. Otra manera de representar la distribución de intensidades entre todos los microarreglos son las gráficas tipo Box-Plot.

Para normalizar los datos entre los microarreglos con replica técnica, aplicar el método “Quantile Normalization” propuesto por Bolstad et al (2003). Verificar la corrección entre replicas representando la distribución de intensidades con una gráfica tipo Box-Plot.

Posterior a la normalización entre replicas técnicas, aplicar el método de normalización de *Loess* a los datos de todos los microarreglos a comparar, para finalmente hacer globalmente comparables los datos. Verificar el efecto del método de *Loess* con una gráfica de dispersión o Box-Plot.

Una vez normalizados los datos de cada microarreglo en conjunto con los microarreglos a comparar, ya pueden ser analizados para identificar diferencias en los niveles de expresión.

- 2) Para identificar los genes diferencialmente expresados, nuevamente se hace uso de los controles de hibridación. Se toma como umbral de diferenciación (μ) la media de dichos controles de hibridación. Los controles definen el rango dinámico de detección de los niveles de expresión. Esto nos da un punto de referencia más

confiable para decidir si un gen está sobre o sub-expresado. Esta forma de análisis nos permite obtener información de

COMPONENTE	CANTIDAD
RNA total	500 ng
Random primer, 50 ng/ μ l	1 μ l
Buffer de alineamiento	1 μ l
Agua libre de RNasas/DNasas	Hasta 8 μ l

- 3) Incubar en el termociclador a 65°C durante 5 minutos, e inmediatamente después colocar en hielo por al menos un minuto. Centrifugar brevemente.
- 4) Agregar los siguientes reactivos al microtubo en hielo:

COMPONENTE	CANTIDAD
2X First-Strand Reaction Mix	10 μ l
SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix	2 μ l

- 5) Mezclar y centrifugar brevemente. Incubar de acuerdo al siguiente programa:

TEMPERATURA	TIEMPO
25°C	10 minutos
50°C	50 minutos

- 6) Terminar la reacción a 85°C por 5 minutos. Colocar en hielo. Almacenar la reacción de síntesis de cDNA a -20°C, o proceder directamente a realizar la qPCR-Array.

4.7.2 PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-Array).

A partir del cDNA generado en el paso anterior, proceder como se describe a continuación:

ANTES DE COMENZAR:

- 1) Preparar en una placa de 96 pozos la mezcla de iniciadores para cada gen de interés, de manera ordenada. Cada iniciador en la mezcla debe de estar a una concentración de 5 μ M.
- 2) Con una micropipeta multicanal colocar 2 μ l de la mezcla de iniciadores en la placa de 96 pozos para PCR cuantitativa. Incluir al menos una replica de cada mezcla de iniciadores en una posición no contigua.

- 3) Incluir iniciadores para al menos 3 genes endógenos que serán utilizados para la normalización de resultados.

Una vez preparada la placa con iniciadores continuar con la preparación de la muestra:

- 1) Transferir los 20 μ l del cDNA sintetizado recientemente a un microtubo de 0.5 ml.
- 2) Agregar 85 μ l de agua libre de DNAsas/RNAsas al microtubo de 0.5 ml. Transferir 100 μ l del cDNA diluido a un nuevo microtubo de 2 ml.
- 3) Agregar 750 μ l de SYBR GreenER qPCR SuperMix para ABI PRISM™ (formula especialmente formulada conteniendo a ROX como colorante de referencia, para emplearse con termocicladores de la marca Applied Biosystems™) y 450 μ l de agua libre de DNAsas/RNAsas. Mezclar y centrifugar brevemente.
- 4) Repartir 13 μ l de la mezcla anterior a cada uno de los 96 pozos de la placa que contiene ya los iniciadores para cada gen de interés.
- 5) Sellar muy bien la placa de 96 pozos con un film óptico especial para qPCR.
- 6) Centrifugar la placa durante un minuto a 3500 rpm a 4°C. Proteger de la luz y mantener en hielo o a 4°C hasta su colocación en el termociclador de qPCR.
- 7) En el termociclador de qPCR ABI PRISM modelo SDS 7500, introducir el siguiente programa:

TEMPERATURA	TIEMPO	
95°C	10 minutos	
95°C	1 minuto	45 ciclos
60°C	1 minuto	
Seleccionar Curva de Disociación		

- 8) Verificar la existencia de un solo pico por reacción, en los resultados de la curva de disociación.
- 9) Seleccionar el umbral y exportar los resultados de Ct en formato de Excel para la realización de cálculos por el método $\Delta\Delta$ Ct.

Incluir un grupo control sano, el cual se tomará como referencia para identificar alteraciones en los niveles de expresión en los cálculos por el método $\Delta\Delta$ Ct.

CAPITULO V

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y DE LABORATORIO DE LOS PACIENTES CON LLA CAPTURADOS

Durante el periodo de recolección de muestras (Febrero del 2005 – Agosto del 2007) se recuperaron un total de 48 pacientes de los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica. El 81.2% de los pacientes fueron niños (72.9% y 8.3%, respectivamente para niños y pacientes pediátricos [definiendo como pediátricos a los niños <1 año]); la distribución por sexo fue del 50% para cada género. El 83.3% de los pacientes presentaron LLA de precursores de linaje B y el 12.5% de linaje T; se recuperaron dos muestras de LLA atípicas, siendo una de células NK y otra bifenotípica. Solamente fue posible la realización del cariotipo al 39.6% de las muestras, ya que las muestras restantes no crecieron al realizar el cultivo celular; de las muestras a las que fue posible la realización del cariotipo el 10.4% presentó un cariotipo normal sin alteraciones, 8.3% con hiperdiploidía, 6.3% con hipodiploidía, 4.2% Phi+ y el 10.4% con otras alteraciones. La búsqueda de translocaciones recurrentes por PCR se realizó solamente para identificar las translocaciones BCR-ABL y TEL-AML1, encontrándose presente en un 4.2% y 6.3% respectivamente; al 89.5% restante no se les identificó al menos alguna de las dos translocaciones analizadas, sin embargo no se descarta la presencia de otras translocaciones recurrentes. En el Cuadro 5 se resumen las características de la población de pacientes recolectada.

5.2 SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA REALIZACION DE PERFILES DE EXPRESION GÉNICA

De las 48 muestras recolectadas se seleccionaron solamente 11 para ser procesadas y analizadas por microarreglos de expresión, debido a la limitante en el número de microarreglos disponibles durante la realización de ésta investigación. Los criterios para su selección fueron: que tuvieran una concentración ≥ 300 ng/ μ l, que tuvieran una pureza cercana al 2.0 (basándonos en el resultado de la relación 260/280 obtenida por espectrofotometría), un valor ≥ 1.3 del valor de la relación de intensidad de las bandas 28S/18S y un valor de integridad del RNA (RIN) > 7.4 [definido como la ausencia de bandas

intermedias entre las correspondientes al 28S y 18S ribosomal, y de DNA genómico]. De las muestras que cumplieron éstos criterios se realizó una selección a manera de obtener grupos que permitieran la comparación entre grupos de edad (niños y adultos), sexo (hombres y mujeres), linaje (LLA-B y LLA-T) y riesgo (bueno o malo). En el Cuadro 6 se muestran los datos de las muestras seleccionadas para ser procesadas y determinarles su perfil de expresión; y en la Figura 6 se muestran las imágenes de electroforesis capilar del RNA total de las muestras procesadas.

Cuadro 5. Características demográficas, clínicas y de laboratorio de los pacientes

Características	Frecuencia
Edad	
Niños	35 (72.9%)
Pediátricos	4 (8.3%)
Adultos	9 (18.8%)
Sexo	
Femenino	24 (50%)
Masculino	24 (50%)
Linaje	
LLA-B	40 (83.3%)
LLA-T	6 (12.5%)
LLA-NK	1 (2.1%)
LLA Bifenotípica	1 (2.1%)
Alteraciones en el Cariotipo	
Normal	5 (10.4%)
Hiperdiploide	4 (8.3%)
Hipodiploide	3 (6.3%)
t(9;22) Phi+	2 (4.2%)
Otras	5 (10.4%)
Cultivo Celular sin Crecimiento	29 (60.4%)
Translocaciones Recurrentes	
BCR-ABL	2 (4.2%)
TEL-AML1	3 (6.3%)
Negativo/No Determinada	43 (89.5%)

Cuadro 6. Características de las muestras de pacientes con LLA seleccionadas para la determinación de su perfil de expresión génica.

Muestra	[ng/ μ l]	ng total	260/280	28S/18S	RIN	Sexo	Edad	Pronóstico	Cuenta	Linaje
7	630.81	12616.2	2.00	1.3	7.9	F	12a	Bueno	115,000	B
12	1051.9	21038	2.00	1.6	7.9	M	8m	Malo	27,400	B
14	427.6	8552.6	2.00	1.8	8.5	F	14a	Malo	2,400,000	T
19	1018.6	20372.2	2.00	1.7	8.9	M	3a	Bueno	63,500	T
22	1014.4	20288.6	2.00	1.7	8.6	F	37a	Bueno	80,000	B
24	1057.4	21148.4	2.00	1.7	8.6	M	43a	Malo	200,000	B
28	392.2	7844	1.75	1.7	8.8	M	16a	Bueno	250,000	T
29	486.2	9723	1.97	1.5	8.9	M	18a	Bueno	940.000	T
30	322.7	6453.8	1.95	1.4	7.4	M	21a	Bueno	900	T
33	403.2	8063.8	1.96	1.5	7.5	F	9m	Malo	30,000	B
41	893	17860	2.0	1.6	8.9	M	12a	Malo	36,800	B

F=Femenino M=Masculino a=Años m=Meses Cuenta=Células/ μ l

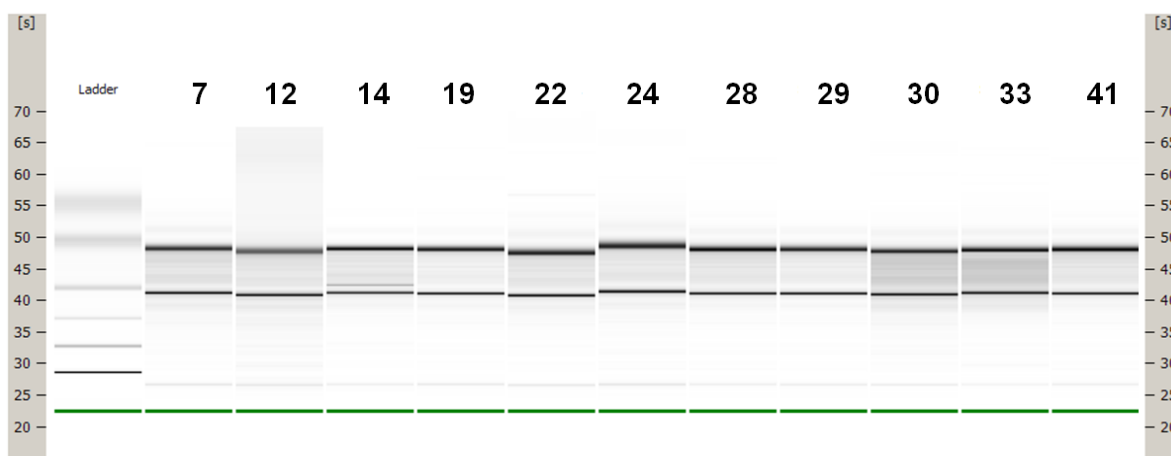


Figura 6. Electroforesis capilar del RNA total de las muestras seleccionadas. Nótese la excelente calidad de las muestras seleccionadas, las cuales muestran la banda correspondiente a las subunidades 5S y 5.8S del rRNA, tRNAs y fragmentos de RNAs pequeños, característico de un RNA altamente intacto y sin degradación.

5.3 MARCAJE E HIBRIDACION DE MUESTRAS, Y ESCANEADO DE MICROARREGLOS

Las muestras seleccionadas fueron procesadas con replica técnica en los casos en que la cantidad de muestra lo permitió. El RNA total se procesó para poder realizar transcripción *in vitro* y obtener cRNA biotinilado; posterior al marcaje se hibridaron con los microarreglos de expresión génica HG-U133 Plus 2.0 y finalmente se lavaron, tiñeron y escanearon. Los datos fueron exportados y analizados con el módulo *affy* de Bioconductor

en ambiente R. En el Cuadro 7 se muestra un ejemplo del reporte de control de calidad del procesamiento de una de las muestras analizadas. En el reporte se muestra el tipo de arreglo analizado, el porcentaje de genes presentes y ausentes, nivel de integridad de la muestra basado en los genes housekeeping, así como controles agregados durante el procesamiento de la muestra llamados “spikes” que además sirven para hacer posible la semicuantificación y comparación entre muestras diferentes.

5.4 NORMALIZACION DE DATOS DE MICROARREGLOS CON REPLICADOS TÉCNICOS

Antes de realizar cálculos para determinar las diferencias en los niveles de expresión génica entre las muestras, se procedió a realizar gráficos de dispersión (“scattering” en inglés) de las muestras con replicas técnicas basadas en los controles de hibridación, con la finalidad de determinar la calidad entre replicas. En la Figura 7 se muestran las comparaciones realizadas entre replicas técnicas. Vemos que los controles se comportan muy similares, esto es que, para un cierto valor en Leu 7 le corresponde un valor igual o muy similar en Leu 14 o bien entre el microarreglo y su replicado técnico y es por esto que los puntos están prácticamente a lo largo de la diagonal (línea roja). Esto no sólo es buen indicativo del control de calidad del microarreglo sino que también nos ayuda a determinar el rango dinámico de los niveles de expresión de los microarreglos.

5.5 NORMALIZACION GLOBAL DE DATOS DE MICROARREGLOS DE EXPRESION GÉNICA

Posteriormente se procedió a normalizar las replicas técnicas en los casos en que se contaba con ellas, aplicando el método de “Quantile Normalization”.⁹² En la Figura 8 se muestra el efecto del método “Quantile Normalization” para hacer comparables las replicas técnicas, representado en un gráfico tipo “Box-Plot”. Después se procedió con una normalización global para hacer comparables todas las muestras entre sí; esto se hizo aplicando el método de Loess.⁹³ En la Figura 9 se observa el efecto de la normalización global, en la que destaca el traslape de las curvas, lo que es indicativo de muestras comparables.

Cuadro 7. Ejemplo de reporte del control de calidad de un microarreglo utilizado

Report Type:	Expression Report
Date:	03:21PM 12/06/2006
Filename:	Leu 24.CHP
Probe Array Type:	HG-U133_Plus_2
Algorithm:	Statistical
Probe Pair Thr:	8
Controls:	Antisense
Alpha1:	0.05
Alpha2:	0.065
Tau:	0.015
Noise (RawQ):	1.8
Scale Factor (SF):	1
Norm Factor (NF):	1

Background:	Avg: 62.63	Std: 1.25	Min: 59.10	Max: 66.50
Noise:	Avg: 2.82	Std: 0.08	Min: 2.70	Max: 3.10
Corner+	Avg: 65	Count: 32		
Corner-	Avg: 11042	Count: 32		
Central-	Avg: 12701	Count: 9		

The following data represents probe sets that exceed the probe pair threshold and are not called "No Call".

Total Probe Sets:	54675		
Number Present:	21768	39.80%	
Number Absent:	32206	58.90%	
Number Marginal:	701	1.30%	
Average Signal (P):	331.2		
Average Signal (A):	8.4		
Average Signal (M):	27.6		
Average Signal (All):	137.2		

Housekeeping Controls:								
Probe Set	Sig(5')	Det(5')	Sig(M')	Det(M')	Sig(3')	Det(3')	Sig(all)	Sig(3'/5')
AFFX-HUMISGF3A/M97935	11.5	A	38.5	P	131.7	P	60.58	11.45
AFFX-HUMRGE/M10098	130.8	P	132.9	P	236.2	P	166.66	1.81
AFFX-HUMGAPDH/M33197	7182.3	P	6754.5	P	7509.1	P	7148.61	1.05
AFFX-HSAC07/X00351	4687.4	P	5897.5	P	5942.1	P	5509.03	1.27
AFFX-M27830	485.5	P	1113	P	4.9	A	534.49	0.01

Spike Controls:								
Probe Set	Sig(5')	Det(5')	Sig(M')	Det(M')	Sig(3')	Det(3')	Sig(all)	Sig(3'/5')
AFFX-BIOB	164.5	P	217.9	P	136.8	P	173.06	0.83
AFFX-BIOC	397.1	P			437.8	P	417.43	1.1
AFFX-BIOD	920.6	P			2064	P	1492.3	2.24
AFFX-CRE	5016.2	P			5978.9	P	5497.56	1.19
AFFX-DAP	137	P	399.8	P	731.4	P	422.74	5.34
AFFX-LYS	36.1	P	62.3	P	118.7	P	72.37	3.29
AFFX-PHE	45.3	P	69.7	P	92.9	P	69.31	2.05
AFFX-THR	32.8	P	60.4	P	165.7	P	86.3	5.05
AFFX-TRP	9.7	A	1.4	A	1.5	A	4.22	0.16
AFFX-R2-EC-BIOB	246.3	P	244.1	P	188.8	P	226.37	0.77
AFFX-R2-EC-BIOC	515.2	P			553.9	P	534.56	1.08
AFFX-R2-EC-BIOD	2395.1	P			2666.3	P	2530.68	1.11
AFFX-R2-P1-CRE	6336.3	P			8318.4	P	7327.39	1.31
AFFX-R2-BS-DAP	211.3	P	396.5	P	732.7	P	446.85	3.47
AFFX-R2-BS-LYS	46.3	P	64.9	P	69.7	P	60.29	1.51
AFFX-R2-BS-PHE	100.7	P	88.1	P	164.2	P	117.66	1.63
AFFX-R2-BS-THR	53.2	P	98.7	P	211	P	120.96	3.97

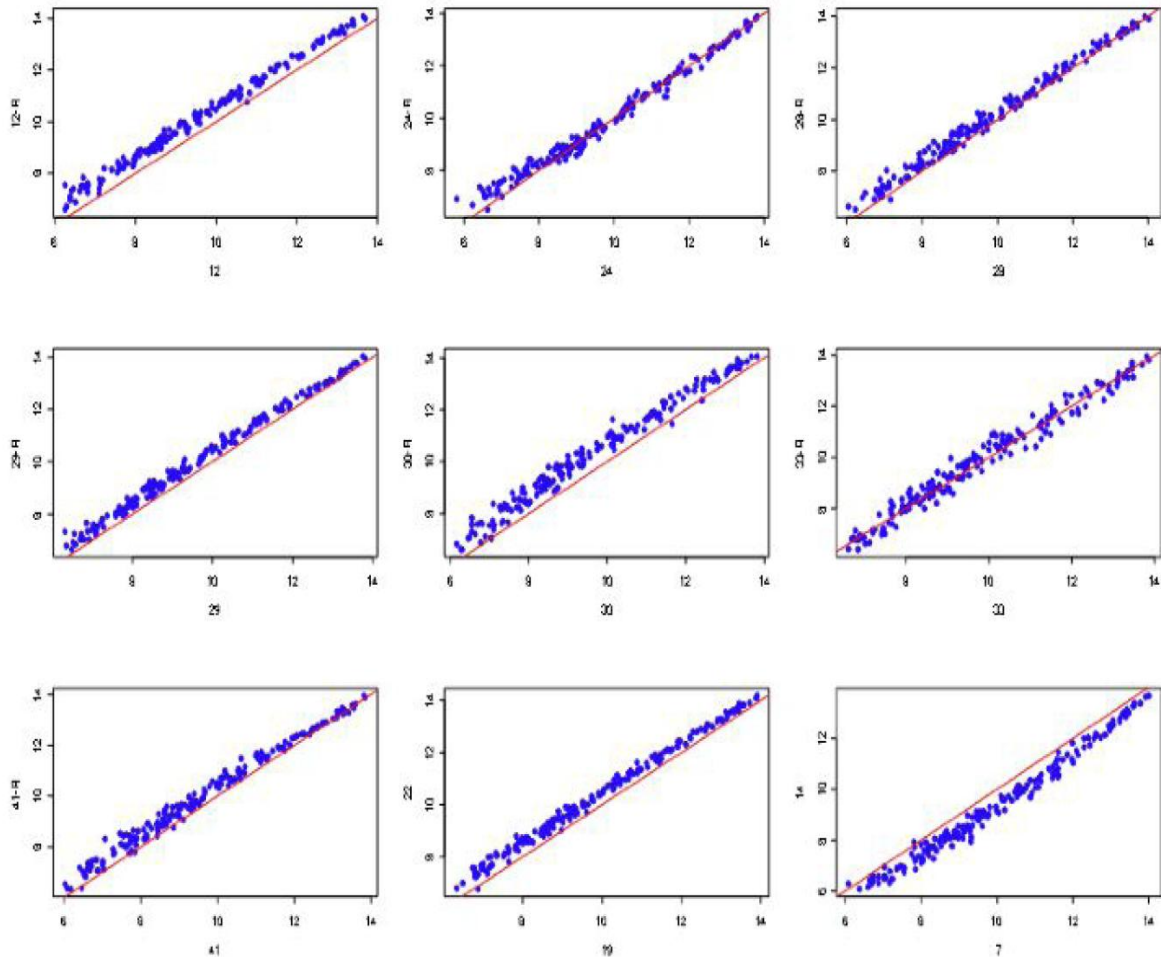


Figura 7. Gráficos de dispersión de replicas técnicas. Los gráficos de dispersión se realizaron representando únicamente los controles de hibridación; conforme la distribución de los puntos se ajusta a la diagonal es indicativo de resultados similares entre ambas réplicas.

5.6 SELECCIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE

Para identificar los genes diferencialmente expresados nuevamente hicimos uso de los controles de hibridación que previamente se utilizaron para representar el efecto de los métodos de normalización aplicados. Se tomó como umbral de diferenciación (u) a la medida de dichos controles por microarreglo. Recordamos que éstos controles definen el rango dinámico de los niveles de expresión. Esto nos da una opción más confiable para seleccionar el punto de partida para considerar un gen sobre o sub-expresado. Ésta forma de decidir nos permite analizar obteniendo información de todos los genes en todos los microarreglos en forma coordinada. Analizamos las hipótesis nula y alternativa:

H_0 : No existe expresión diferencial $|g_{ik}| = \mu$

Vs

H_1 : Expresión diferencial a lo largo de todos los grupos $|g_{ik}| > \mu$

Donde g_{ik} es el nivel de expresión del gen i en el microarreglo k . Las comparaciones que se realizaron se describen en el Cuadro 8. En la Figura 10 se muestra la distribución de muestras en los grupos de comparación.

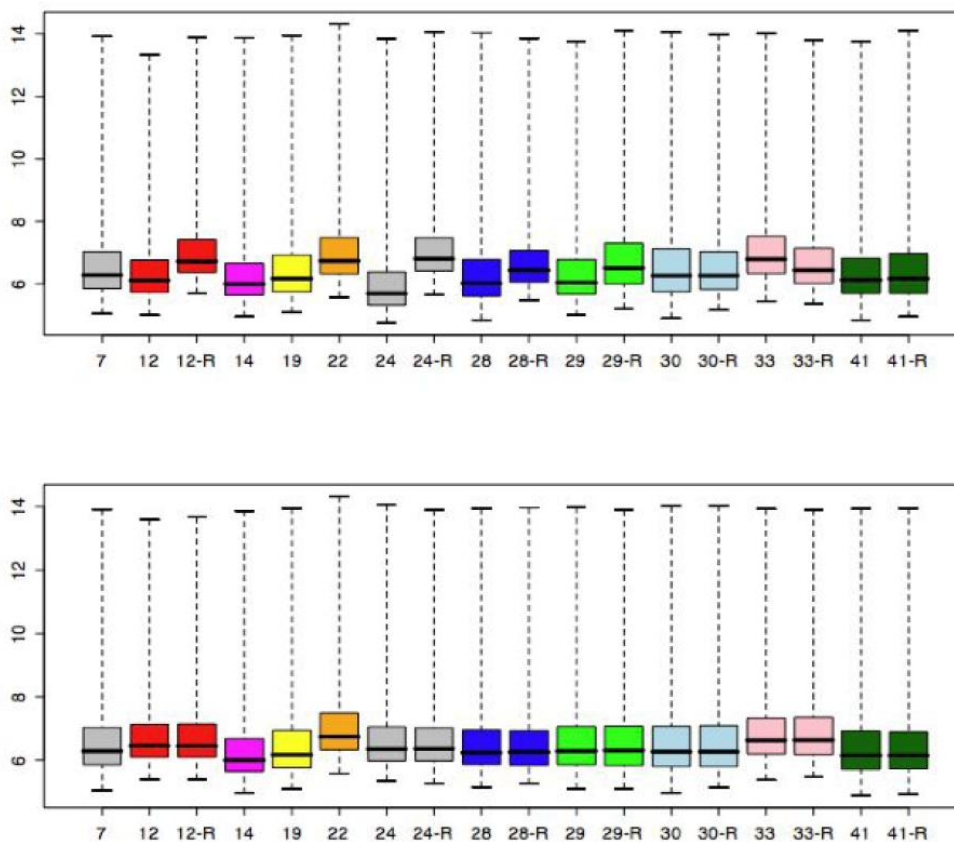


Figura 8. Distribución de datos después de aplicar el método “Quantile Normalization”. En el gráfico superior se representan los datos sin normalizar, y en el gráfico inferior las replicas normalizadas entre sí. Nótese el efecto entre replicas (representadas del mismo color).

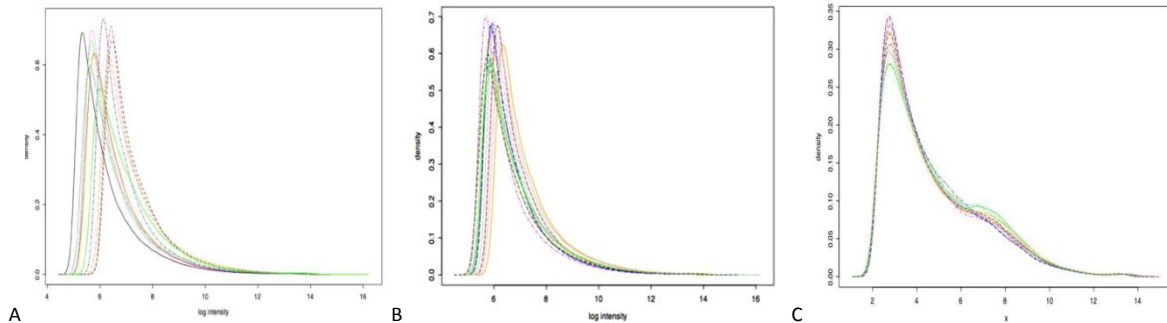


Figura 9. Distribución de datos después de aplicar el método de Loess de normalización global. En 9A se muestran los datos crudos; en 9B los datos después de aplicar la normalización entre replicas (Quantile Normalization); y en 9C el resultado de la normalización global aplicando el método de Loess. Obsérvese el efecto de las normalizaciones desde los datos crudos en 9A hasta que están listos para poder hacer comparaciones en 9C.

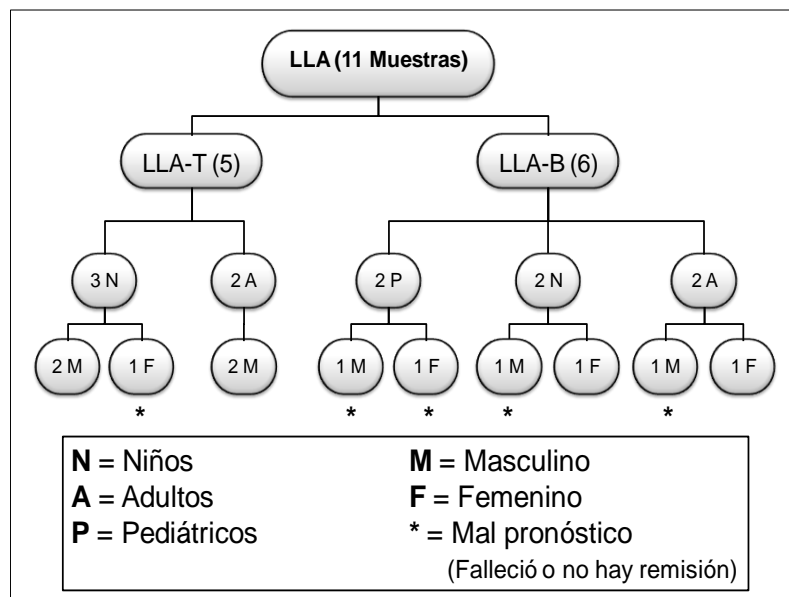


Figura 10. Diagrama de clasificación de las muestras analizadas. En total se procesaron 11 muestras de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda: 5 de linaje T y 6 de linaje B. Dentro del linaje T, 3 fueron niños y 2 adultos (2 pacientes masculinos y 1 femenino, y 2 masculinos; respectivamente). Dentro del linaje B, fueron 2 pacientes pediátricos, 2 niños y 2 adultos (un paciente masculino y uno femenino para cada grupo de edad). Con asteriscos (*) se señalan a los pacientes de mal pronóstico.

Cuadro 8. Comparaciones de microarreglos realizadas.

Comparación No.	Casos	Descripción
1	LLA-T & LLA-B	Identifica las diferencias entre linajes
2	N&P & A	Identifica las diferencias en grupos de edad
3	LLA-T: Niños & Adultos	Identifica las diferencias entre edades pero del mismo linaje, caso T
4	LLA-B: Niños & Adultos	Identifica las diferencias entre edades pero del mismo linaje, caso B
5	Pronósticos: Bueno & Malo	Identifica las diferencias entre pronósticos, independientemente de edad y linaje
6	Buen Pronóstico: T & B	Dentro del grupo de buen pronóstico, identifica diferencias entre linajes
7	Mal Pronóstico: T & B	Dentro del grupo de mal pronóstico, identifica diferencias entre linajes

5.6.1 SELECCIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

5.6.1.1 SELECCIÓN POR LINAJE: LLA-T & LLA-B

Tomando en cuenta un umbral $\mu=7$ para seleccionar a los genes diferencialmente expresados, se detectaron 46 genes, de los cuales 34 se encontraron sobre-expresados en LLA-T con respecto a LLA-B; y 12 mostraron sub-expresión. La representación de los resultados de la comparación se muestra en la figura 11 en una representación de clustering no supervisado.

5.6.1.2 SELECCIÓN POR GRUPOS DE EDAD: NIÑOS Y PEDIÁTRICOS & ADULTOS

Para mostrar los resultados de la comparación de los niveles de expresión entre los grupos de edad, los cálculos se basaron en el agrupamiento de las siguientes muestras por grupos de edad:

- Niños: {7, 14, 19, 28, 29, 41}
- Pediátricos: {12, 33}
- Adultos: {22, 24, 30}

De igual manera que el cálculo anterior, se tomó en cuenta un umbral $\mu=7$ para seleccionar a los genes diferencialmente expresados al comparar los grupos de edad; no se identificaron genes sobre-expresados en niños y pediátricos al compararlos con adultos. Se

identificaron 3 genes sub-expresados en niños y pediátricos con respecto a adultos. En la figura 12 se muestran los resultados en un gráfico de clustering supervisado por grupos de edad.

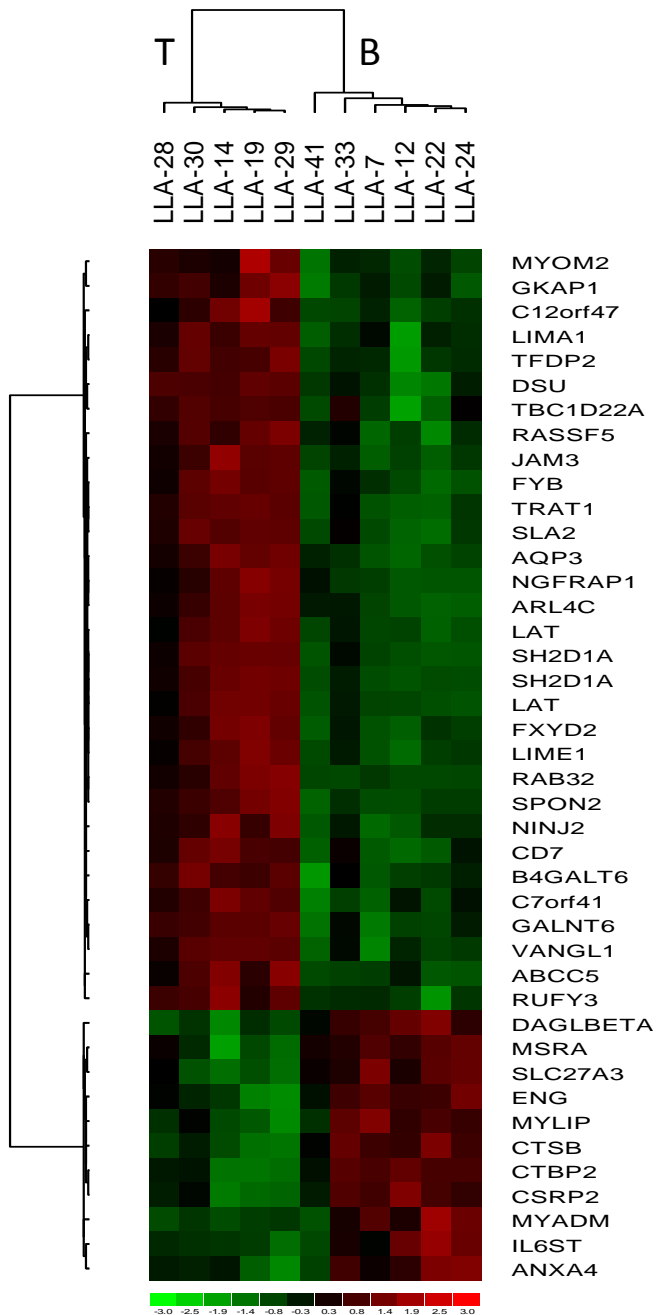


Figura 11. Clustering no supervisado.

Selección por linaje: LLA-T & LLA-B.

Los genes que están significativamente sobre-expresados en LLA-T comparado con LLA-B se localizan en el cuadrante superior izquierdo en color rojo. Mientras que los genes que están significativamente subexpresados en LLA-T comparado con LLA-B se localizan en el cuadrante inferior izquierdo.

Muestras de LLA de linaje T: 28, 30, 14, 19 y 29. Muestras de LLA de linaje B: 41, 33, 7, 12, 22 y 24.

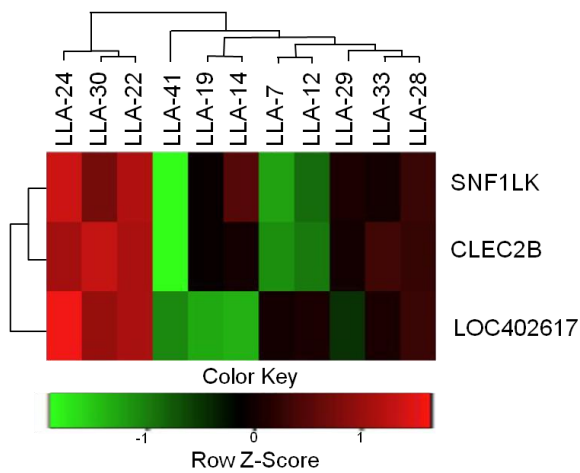


Figura 12. Clustering supervisado. Selección por grupos de edad: niños, pediátricos y adultos. Los genes que están significativamente sobre-expresados en adultos (muestras 22, 24 y 30) se muestran del lado izquierdo, mientras que los pacientes pediátricos (muestras 12 y 33) y los niños (muestras 7, 14, 19, 28, 29 y 41) muestran sub-expresión, ausencia o una leve sobre-expresión; sin embargo nótese la constante sobre-expresión en adultos, mientras que los pacientes pediátricos y niños forman un solo grupo heterogéneo distinto al de los adultos.

5.6.1.3 SELECCIÓN POR EDAD Y LLA DE LINAJE T

También se realizó la comparación de los pacientes con LLA-T de acuerdo a los grupos de edad (considerando en ésta ocasión a los pacientes pediátricos y niños como un solo grupo). Como resultado de la comparación se identificaron 222 genes sobre-expresados en niños con respecto a adultos; mientras que 41 genes estuvieron sub-expresados en niños respecto a adultos. En la figura 13 se representa el resultado de la comparación en un clustering supervisado.

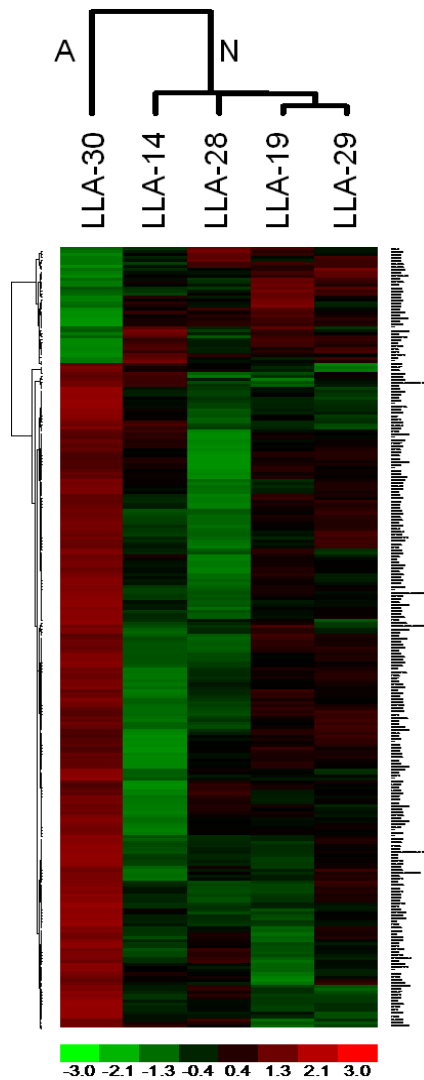


Figura 13. Clustering supervisado. Selección por grupos de edad en LLA-T. Los genes que están significativamente sobre-expresados en adultos (muestras 30) se muestran en rojo del lado izquierdo; los niños (muestras 14, 19, 28 y 29) muestran una expresión diferencial heterogénea y diferente al adulto. Sin embargo, se observa claramente que forman dos grupos tomando en cuenta la edad.

5.6.1.4 SELECCIÓN POR EDAD Y LLA DE LINAJE B

Se compararon los niveles de expresión por grupos de edad de pacientes con LLA de linaje B. Y de igual manera que para el caso de la comparación por grupos de edad en el linaje T, para el linaje B se observa una distribución en dos grupos que coinciden con la edad. Sin embargo la expresión fue más homogénea entre las muestras que forman el grupo de adultos (22 y 24) y el de niños (7 y 41). Se identificaron 222 genes sobre-expresados en niños con respecto a adultos, y 307 genes sobre-expresados en adultos con respecto a los niños. En la figura 14 se representan los resultados en una gráfica de clustering supervisado.

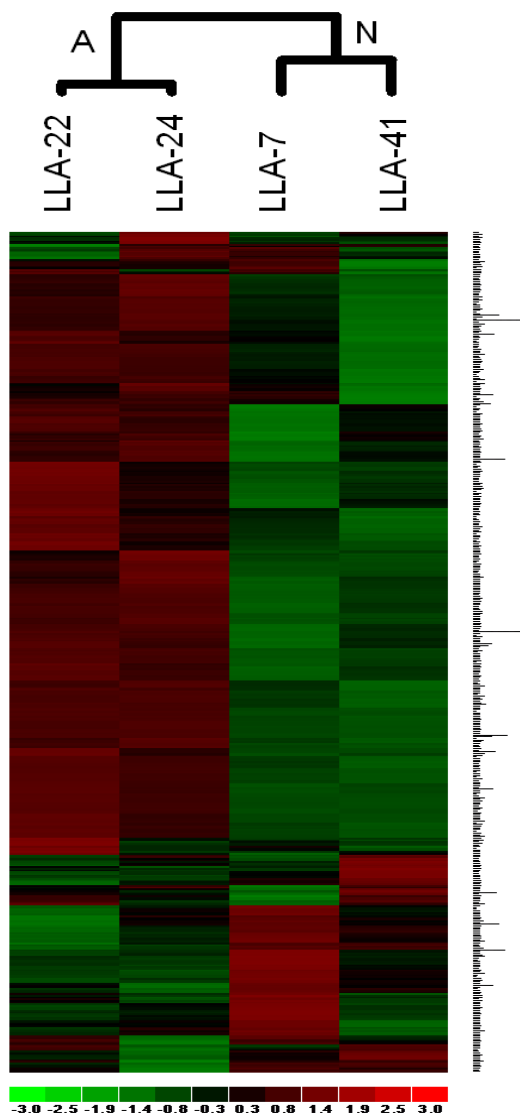


Figura 14. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados por grupos de edad en LLA-B. Los genes que están significativamente sobre-expresados en adultos (muestras 22 y 24) se muestran en rojo del lado izquierdo superior; los niños (muestras 7 y 41) muestran una expresión diferencial diferente a los adultos, tal como se observa claramente que forman dos grupos. Se identificaron 222 genes sobre-expresados en niños con LLA-B al compararlos con adultos del mismo linaje. Mientras que 307 genes estuvieron sobre-expresados en adultos.

5.6.1.5 SELECCIÓN DE ACUERDO AL PRONÓSTICO TERAPÉUTICO

Se compararon los niveles de expresión de los pacientes, tomando en cuenta el grupo pronóstico al que pertenecen, de acuerdo a las características clínicas y de laboratorio. Entre las muestras se encontraban 6 de buen pronóstico (muestras 7, 19, 22, 28, 29 y 30) y 5 de mal pronóstico (muestras 12, 14, 24, 33 y 41). En ésta comparación no se identificaron genes diferencialmente expresados que permitieran agrupar a las muestras.

5.6.1.6 SELECCIÓN EN PACIENTES DE BUEN PRONÓSTICO TERAPÉUTICO.

Se compararon los niveles de expresión en el grupo de pacientes con buen pronóstico terapéutico. Entre las muestras comparadas se encontraban 2 de pacientes con LLA-B (muestras 7 y 22) y 5 de pacientes con LLA-T (19, 28, 29 y 30). Se identificaron 250 genes sobre-expresados en los pacientes LLA-T con respecto a los pacientes con LLA-B, y 165 genes sub-expresados en LLA-T respecto de LLA-B. El resultado de la comparación arroja genes diferencialmente expresados que agrupa a las muestras de acuerdo al linaje de la LLA. El resultado de la comparación se representa en la figura 15.

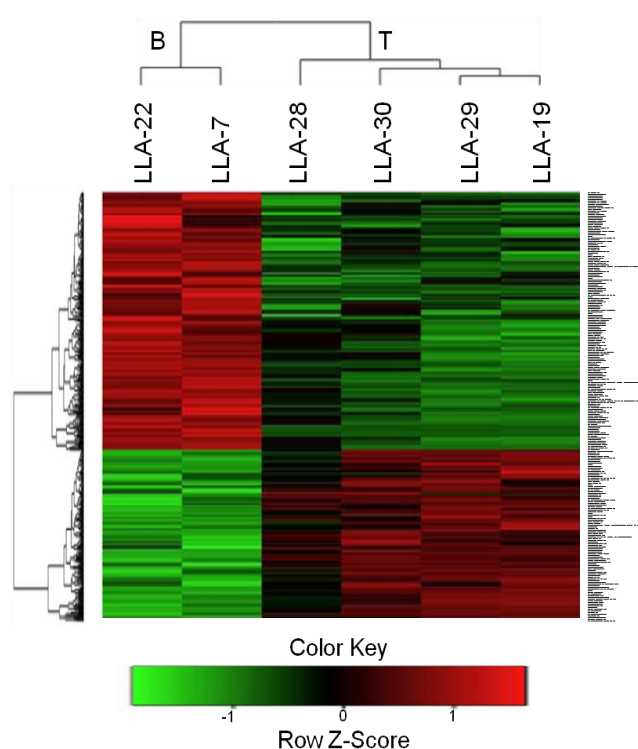


Figura 15. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con buen pronóstico terapéutico: LLA-T & LLA-B. Las muestras de los pacientes con buen pronóstico de linaje B (muestras 7 y 22) parecieran tener un patrón de expresión diferente al de los pacientes de buen pronóstico de linaje T (muestras 28, 30, 29 y 19). Como resultado de la comparación se identificaron 250 genes sobre-expresados en los pacientes LLA-T con respecto a los pacientes con LLA-B, y 165 genes sub-expresados en LLA-T respecto de LLA-B.

5.6.1.7 SELECCIÓN EN PACIENTES DE MAL PRONÓSTICO TERAPÉUTICO.

Se compararon los niveles de expresión en el grupo de pacientes con mal pronóstico terapéutico. Entre las muestras comparadas se encontraban 4 de pacientes con LLA-B (muestras 12, 24, 33 y 41) y solamente una de LLA-T (muestra 14). Se identificaron 300 genes sobre-expresados y 550 sub-expresados en LLA-T con respecto de LLA-B. Los genes identificados solamente agrupan a las muestras de acuerdo a su linaje. El resultado de la comparación se representa en la figura 16.

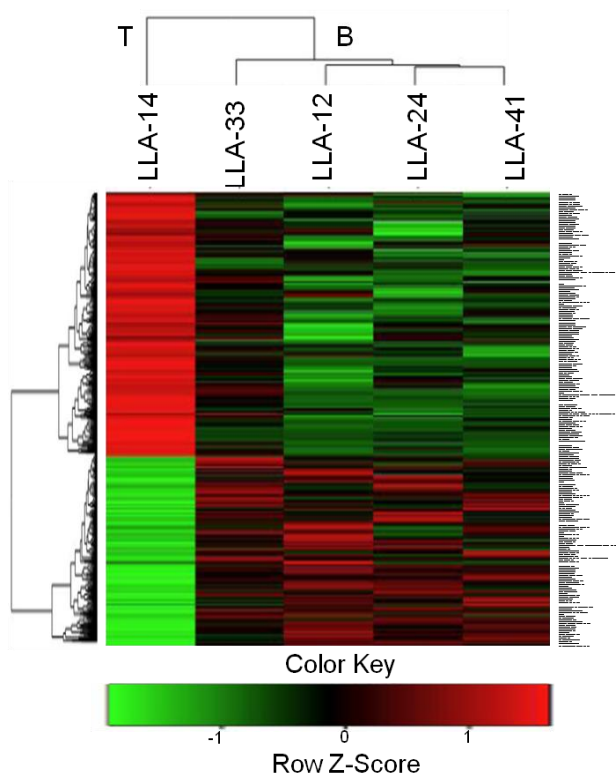


Figura 16. Clustering supervisado. Selección de genes diferencialmente expresados en el grupo de pacientes con mal pronóstico terapéutico: LLA-T & LLA-B. Las muestras de los pacientes con mal pronóstico de linaje B (muestras 12, 24, 33 y 41) parecieran tener un patrón de expresión diferente al del paciente de mal pronóstico de linaje T (muestra 14). Como resultado de la comparación se identificaron 400 genes sobre-expresados y 550 sub-expresados en LLA-T respecto de LLA-B.

En el cuadro 9 se muestra un resumen del número de genes diferencialmente expresados en cada condición comparada. Mientras que en el cuadro 10 se presentan los 10 genes con mayor expresión diferencial en la comparación de niños & adultos en LLA-T (tabla 10A) y LLA-B (tabla 10B).

Cuadro 9. Resumen de genes diferencialmente expresados por comparación.

Genes	LLA-T & LLA-B	Niños & Adultos	LLA-T LLA-B		Bueno & Mal Pronóstico	Buen Mal Pronóstico	
			N & A	N & A		T & B	T & B
sub-expresados $\mu < 7$	12	3	41	307	0	165	550
sobre-expresados $\mu \geq 7$	34	0	222	222	0	250	400
TOTAL	46	3	263	529	0	415	950

Cuadro 10. Genes con mayor expresión diferencial en la comparación de niños & adultos en LLA-T (cuadro 10A) y en LLA-B (cuadro 10B).

Sobre-expresados	Valor de Expresión	Sobre-expresados	Valor de Expresión
P1518	2.69	S100A8	5.930
HISTZH2BE	2.5	DEFA1	4.770
WBPS	2.45	RGS1	2.120
BCL11A	2.43	DOCK10	2.090
ABI2	1.98	ATP9A	2.080
LEF1	1.8	JUN	1.940
CYP2R1	1.79	RSAD2	1.910
ETNK1	1.7	DDXS8	1.900
RAPGEF2	1.37	RXRA	1.490
SORT1	1.37	TNFSF10	1.450
Sub-expresados	Valor de Expresión	Sub-expresados	Valor de Expresión
IFI44L	-3.45	PIMZ	-100.0
ATP9A	-3.12	MYLIP	-100.0
RGS1	-2.97	MYH9	-50.0
PLAGL1	-2.88	EXOC8	-33.333
SNF1LK	-2.77	PAPD5	-25.0
PGDS	-2.67	DPEP2	-25.0
DEFA1	-2.6	ARIH2	-25.0
HK2	-2.53	AGPAT3	-25.0
STAT1	-2.52	PDE4D	-20.0
MAF	-2.51	SOS1	-16,667

A

B

Las comparaciones de mayor interés dado los resultados obtenidos fueron: la de niños & adultos, y las comparaciones de niños & adultos en LLA-T y LLA-B. Las comparaciones de los grupos de pacientes LLA-T & LLA-B en general y separados de acuerdo al pronóstico terapéutico se descartaron dado que los genes seleccionados agruparon a las muestras de acuerdo al linaje de la LLA. La comparación de muestras de acuerdo al pronóstico terapéutico no arrojó ningún gen que permitiera agruparlas.

Una vez seleccionados los genes diferencialmente en cada comparación, se procedió a la realización del análisis de vías.

5.7 ANÁLISIS DE VÍAS

A partir de los datos de expresión de los genes diferencialmente expresados, seleccionados en las comparaciones anteriores que se resumen en el cuadro 9, se realizó el análisis de vías con el Software Ingenuity Pathway Analysis™, con el cual se evidenciaron interacciones entre los genes diferencialmente expresados, basándose en bases de datos de interacciones publicadas en artículos científicos, incluidas en el software; de igual manera se obtuvo el agrupamiento de genes de acuerdo a una función, y enfermedad o padecimiento.

Para el análisis de vías se emplearon solamente los resultados de las comparaciones de niños & adultos en LLA-T y LLA-B. La comparación global de niños & adultos no se utilizó ya que solamente se encontraron 3 genes diferencialmente expresados. No se utilizaron los resultados de las comparaciones que involucraban la comparación entre muestras de pacientes con LLA-T y LLA-B, ya que los resultados agrupan a las muestras por linaje.

En el cuadro 11 se muestran los genes mayormente alterados en la comparación de niños & adultos con LLA-T, agrupados según su función; solamente se muestran los 5 grupos con 10 o más genes. En el cuadro 11 se muestra también un puntaje (score) que está determinado por el número de genes que conforman al grupo de la correspondiente función alterada. Los genes se presentan de acuerdo al código de colores del mapa de calor, en el que rojo indica sobre-expresión y verde indica sub-expresión.

En el cuadro 12 se muestran las funciones y padecimientos alterados asociados a los genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-T; las funciones y padecimientos están distribuidas en tres grupos: 1) enfermedades y desórdenes; 2) funciones celulares y moleculares; y 3) desarrollo y función del sistema fisiológico. Para cada función o padecimiento alterado se describe el rango del valor de p de la prueba estadística aplicada para asociar los genes al padecimiento, así como el número de genes involucrados para identificar a la función o padecimiento como alterada.

Cuadro 11. Genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-T agrupados según función alterada

MOLECULAS EN RED	PUNTAJE	NUMERO DE GENES	FUNCIONES MAS ALTERADAS
BCL2A1, BHLHB2, BTG1, CREB1, DDX58, DEFA1 (Incluye: EG:1667), DUSP10, FLT3, JUN, KCNN4, MAF, MATK, NFKBIZ, PLAGL1, PLGC2, RAPGEF2, RGS1, SLC2A3, STAT1, TNFSF10	40	20	Cáncer, Muerte Celular, Enfermedad Hematológica
BTG1, CD46, CTBP2, CTSS, DNMT3A, DUSP10, GAB3, GPR160, RSAD2, S100A8, SFRS3, SH3PXD2A, SORT1, TM7SF3	25	14	Desarrollo y Función del Sistema Hematológico, Morfología Tisular, Muerte Celular
ALDH2, BTG1, CYP2R1, DPEP2, EIF4A1, HIST2H2BE, HK2, IFIT5, MGLL, PGDS, SNF1LK, WDR1 (incluye: EG:9948), ZYX	23	13	Muerte Celular, Enfermedad Neurológica, Síntesis de Proteínas
ABI2, BTG1, DUSP10, GLDC, LATS2, MATK, PLEK, PPP2R5C (incluye: EG:5527), PRKD3, SMOX, TNFSF10	23	13	Metabolismo de Aminoácidos, Modificación Post-Traduccional, Bioquímica de Moléculas Pequeñas
ARRB1, CASP8, CLEC2B, CTNNB1, FHL1, LEF1, PDE4D, PDE9A, RXRA, TMSL8	18	11	Señalización Celular, Cáncer, Expresión Génica

Cuadro 12. Funciones y padecimientos alterados asociados a genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-T

Enfermedades y desórdenes		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Cáncer	3.19E-06 - 1.43E-02	27
Enfermedad Cardiovascular	1.78E-05 - 1.43E-02	8
Función Viral	3.19E-05 - 9.57E-03	10
Enfermedad Hematológica	6.78E-05 - 1.43E-02	11
Enfermedad Inmunológica	6.78E-05 - 1.43E-02	7
Funciones Celulares y Moleculares		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Muerte Celular	3.19E-06 - 1.43E-02	29
Expresión Génica	3.64E-06 - 1.43E-02	20
Desarrollo Celular	1.58E-05 - 1.43E-02	21
Señalización Celular	6.78E-05 - 1.43E-02	4
Replicación del DNA, Recombinación y Reparación	6.78E-05 - 1.43E-02	6
Desarrollo y Función del Sistema Fisiológico		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Desarrollo y Función del Sistema Hematológico	2.97E-05 - 1.43E-02	21
Morfología de Órganos	1.35E-04 - 1.43E-02	5
Desarrollo y Función del Sistema Visual	1.35E-04 - 5.37E-03	5
Morfología Tumoral	3.36E-04 - 1.43E-02	8
Desarrollo y Función del Sistema Inmune y Linfático	6.06E-04 - 1.43E-02	19

En el cuadro 13 se muestran los genes mayormente alterados en la comparación niños & adultos con LLA-B, agrupados según la función alterada, formándose 12 grupos con 10 o más genes. De igual manera que para el cuadro 11, los genes se encuentran coloreados siguiendo el código de colores de un mapa de calor.

Cuadro 13. Genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-B agrupados según función alterada

MOLECULAS EN RED	PUNTAJE	NUMERO DE GENES	FUNCIONES MAS ALTERADAS
ALDH2, APOD, CTNNB1, DNMT3A, FHL1, FZD6, GPR64, GSN, IGFBP2, INPP5A, IRF7, KCNN4, MAPKAPK3, MT1E, MTF1, MYH9, PAWR, PLCG2 , PRX, PTK2B, RHOH, S100A8 , SMAD3, TOB1	44	26	Desarrollo y Función del Tejido Conectivo, Desarrollo y Función del Sistema Esquelético y Muscular, Desarrollo Tisular
ACTN1, AHR, ARID1B, BAD, BCL2A1 , CCNE2 (includes EG:9134), CHKA, CYLD (includes EG:1540), EPAS1, FLT3, HIST1H2AE (includes EG:3012), IGFBP7, IL6ST, MAF, MYBBP1A, NCOA3, PIM2 (includes EG:11040), PRKCH, RAPGEF3, RB1CC1, SMARCA2, SOCS1, TNFSF10 , ZHX1, ZYX	42	25	Crecimiento Celular y Proliferación, Enfermedad Inflamatoria, Desórdenes Esqueléticos y Musculares
BLVRA, BTG1, CRIP2, EPS8, FBXW7, IKBKE, IL2RA, JUN , JUNB, JUND, LCP2, MAFF, NFKBIZ, PACSIN1, PLCB2, RRAS2, SGK, SOS1, TBXA2R	33	21	Ambiente, Desarrollo y Función del Sistema Nervioso, Expresión Génica
ADRBK2, ARRB1, BHLHB2, CCL5, CUGBP2, DDX58 , DUSP2, EMP1, , FGFR1, ITPR1, LMNA, PDE4D, PER1, PLEK , PPP2R5C (includes EG:5527), PTPN7, RGS1 , SPRY2, STAT1,	30	20	Señalización Celular, Replicación del DNA, Recombinación y Reparación, Metabolismo de Ácidos Nucleicos
ADAM9 (includes EG:8754), ANTXR2, APBA3, CNN3, CST7, DOCK10 , EIF4A1, INPP1, INPP5B, LAMP1, LCP2, LDLRAP1, MATK, MCFD2, MGLLPLEK, S100A9 , SERPINB6	26	18	Señalización Celular , Transporte Molecular, Metabolismo de Vitaminas y Minerales
CCNE2 (includes EG:9134), EMR2, FSCN1, GLIPR1, GPR56, IL6ST, MDH2, NOD1, PTP4A3, SGK, SLC6A6, SSR3, TBXAS1, THRAP2, TP53INP1, TWF1, WSB2	24	17	Muerte Celularm Cáncer, Crecimiento Celular y Proliferación
BAD, BRE, CYBRD1, DPEP2, DSCR1, GAS7, GBP2 (includes EG:2634), HK2 , IFIT5, RAPGEF5, S100A8 , SLC16A2, SNF1LK, SOCS1, STX6, TMC6	22	16	Movimiento Celular, Desarrollo y Función del Sistema Hematológico, Respuesta Inmune
BAD, BHLHB2, CDC42EP3, DIP, DOK3, DOK4, GAB3, IL6ST, NT5E, P2RY14, SERTAD1, SLC30A1, SOCS1, SOS1, STS-1, TIAM2 (includes EG:26230)	22	16	Desarrollo y Función del Sistema Hematológico , Desarrollo Celular, Desarrollo y Función del Sistema Inmune y Linfático
ANKRD28, CPT2, DCP2, EIF2C2, HSF1, IL6ST, KLF7, MINA,, NCAPH2, RSAD2 , RXRA , SART2, SETD8, SUPT3H (includes EG:8464), ZBTB16	20	15	Ciclo Celular, Ensamblaje y Organización Celular, Replicación del DNA, Recombinación y Reparación
ARRB1, ATP10A, ATP9A , DNNT, INHBCKLF9, NPC1, NUDT4, PAPP5, PDE2A, PDE4D, PDE9A, PNMT, RAPGEF3, SLC31A2	20	15	Replicación del DNA, Recombinación y Reparación , Metabolismo de Drogas, Desarrollo y Función del Sistema Endócrino
ATP2A3, BTG1, CTSS, DEFA1 (includes EG:1667), DHRS3, GLDC, GRASP, LATS2, LCN8, PLEK , RPL14, SCP2, TBCD (includes EG:6904)	17	13	Metabolismo de Lípidos, Transporte Molecular, Bioquímica de Moléculas Pequeñas
ANKRD10, CLEC2B, CTSB, EXOC8, HIP1R, IPO11, LEPROT, MT1E, RANBP2, RPS6KC1, SCAND1, TNFSF8	15	12	Señalización Celular, Replicación del DNA, Recombinación y Reparación , Metabolismo de Ácidos Nucleicos

En el cuadro 14 se muestran las funciones y padecimientos alterados asociados a los genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-B; de igual manera que como en el cuadro 12, las funciones y padecimientos alterados están distribuidos en tres grupos: 1) enfermedades y desórdenes; 2) funciones celulares y moleculares; y 3) desarrollo y función del sistema fisiológico. También se muestran los rangos de los valores de p de la prueba estadística aplicada para asociar los genes al padecimiento, así como el número de genes involucrados para identificar a la función o padecimiento como alterado.

Cuadro 14. Funciones y padecimientos alterados asociados a genes diferencialmente expresados en la comparación niños & adultos con LLA-B

Enfermedades y desórdenes		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Anormalidades y Lesión al Organismo	2.15E-05 - 1.43E-02	21
Cáncer	2.83E-05 - 1.43E-02	72
Enfermedad Cardiovascular	4.1E-05 - 1.43E-02	10
Enfermedades Dermatológicas y Condiciones	9.71E-05 - 1.43E-02	14
Enfermedad del Sistema Reproductivo	1.77E-04 - 1.43E-02	17
Funciones Celulares y Moleculares		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Expresión Génica	7.16E-08 - 1.43E-02	60
Crecimiento y Proliferación Celular	4.73E-07 - 1.43E-02	75
Desarrollo Celular	7.51E-07 - 1.43E-02	59
Muerte Celular	9.45E-06 - 1.43E-02	74
Movimiento Celular	8.92E-05 - 1.43E-02	42
Desarrollo y Función del Sistema Fisiológico		
Nombre	Valor de p	Número de Genes
Sistema Hematológico	3.57E-05 - 1.43E-02	37
Tejido Conectivo	1.66E-04 - 1.43E-02	27
Sistema Cardiovascular	2.04E-04 - 1.43E-02	9
Morfología Tumoral	2.04E-04 - 1.43E-02	13
Comportamiento	2.28E-04 - 1.86E-03	6

Como parte del análisis de vías, se realizaron gráficos de interacciones entre las proteínas que codifican los genes diferencialmente expresados identificados en cada comparación. De igual modo que para agrupar a los genes por función o padecimiento asociado, las interacciones se realizaron en el software Ingenuity™ Pathway Analysis, el cual se basa en bases de datos de interacciones documentadas que ya han sido probadas experimentalmente; por lo que las interacciones no pueden ser editadas o forzadas. Las figuras de interacciones contienen también el código de colores estándar en la presentación de datos de microarreglos: el mapa de calor, en el que rojo significa sobre-expresión y verde significa sub-expresión.

Con la finalidad de hacer sentido biológico de la relación entre los genes diferencialmente expresados, al software de análisis se le solicitó la presentación de interacciones de las proteínas que codifican los genes identificados con expresión diferencial, pero asociándolos a una función o padecimiento alterado, o a una vía de señalización o diferenciación: Cáncer, crecimiento celular y proliferación, desarrollo celular, expresión génica, hematopoyesis, muerte celular, enfermedades hematológicas, vía de apoptosis, vía de muerte celular, vía del desarrollo del sistema hematológico. De manera consensual, en todos los esquemas se encontraron presentes genes de la vía Wnt - β -Catenina con alteración en su expresión: RXRA, CTNNB1, JUN y FOS. En la figura 17 se muestra un ejemplo de los gráficos de interacciones obtenidos en el análisis de vías; en la figura se observan las diferencias en la expresión de los mismos genes en LLA-T (figura 17A) y en LLA-B (figura 17B). Cabe mencionar nuevamente que los genes representados son los que tuvieron un valor de expresión diferencial $\mu \geq 7$ entre los grupos comparados.

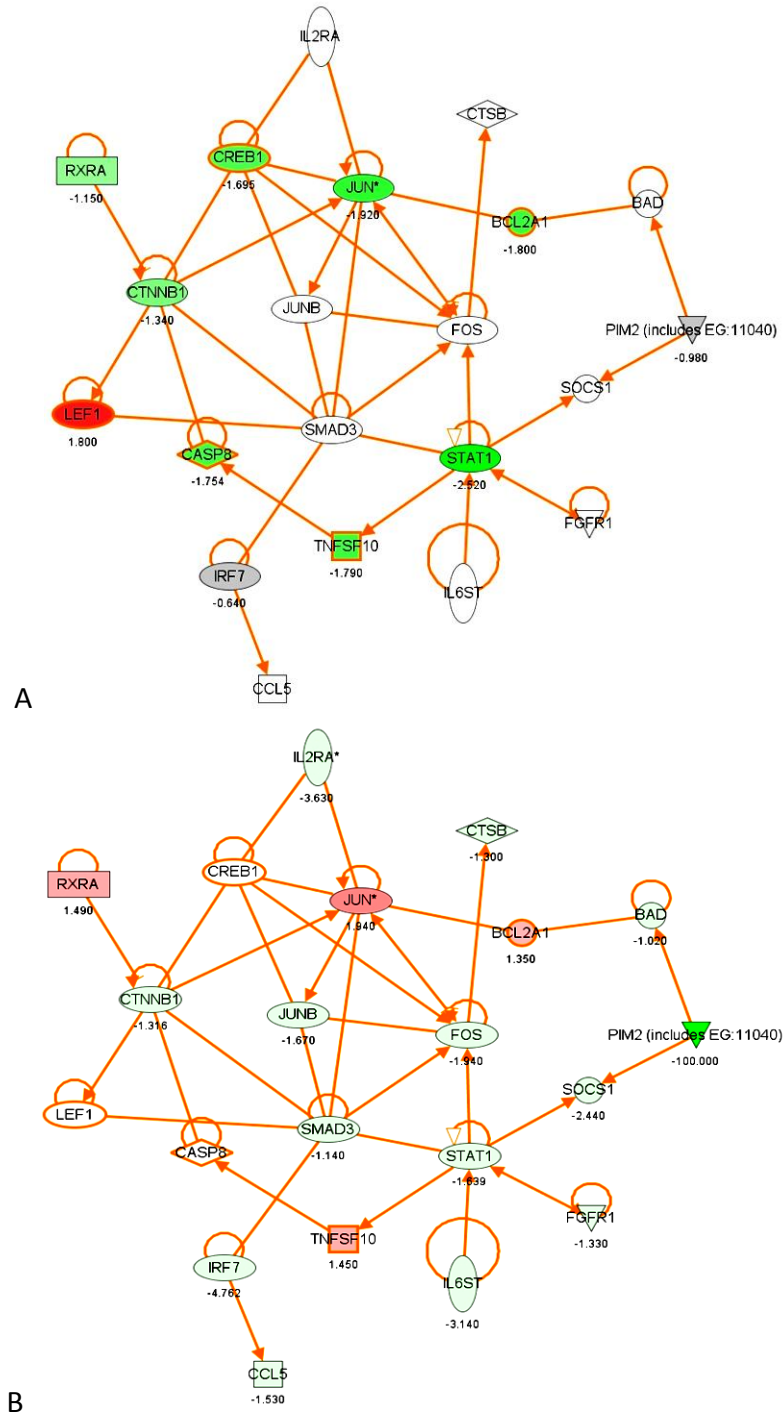


Figura 17. Ejemplo de interacción entre genes diferencialmente expresados. Genes asociados a la vía del desarrollo del sistema hematológico. En A) se muestran coloreados con el código de color de mapa de calor a los genes diferencialmente expresados en niños con respecto a adultos con LLA-T; mientras que en B) a los genes con expresión diferencial de niños respecto a adultos con LLA-B. Nótese la interacción entre los genes RXRA, CTNNB1, JUN y FOS, involucrados en la vía Wnt - β -Catenina; y cómo los genes tienen niveles de expresión diferente al comparar la expresión en LLA-T y LLA-B.

Durante el análisis de vías se descartaron los genes involucrados con actividades metabólicas y de mantenimiento, y el análisis se enfocó a genes involucrados en procesos de regulación de expresión génica, señalización o desarrollo celular, así como a aquellos que evidenciaron su interacción en las vías evaluadas. Por lo cual se seleccionaron solamente un conjunto de 36 genes identificados en éste estudio para validar su expresión en muestras de pacientes con LLA de recién diagnóstico.

5.8 VALIDACIÓN POR qPCR-ARRAY DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

Durante el análisis de vías de los genes diferencialmente expresados identificados en las muestras analizadas, 36 genes fueron seleccionados para su validación. Además se incluyeron 8 genes previamente reportados como potenciales genes marcadores en LLA. Y finalmente se incluyeron 4 genes endógenos para ser utilizados durante la normalización de resultados.

Se optó por determinar los niveles de expresión génica por PCR cuantitativa empleando SYBR Green I, para lo cual fue necesario seleccionar y/o diseñar/rediseñar oligonucleótidos altamente específicos, con una T_m de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y que se obtuviera un amplicón cercano a los 250 pb. Las secuencias de la mayoría de los oligonucleótidos fueron obtenidas del PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). El diseño/rediseño de algunos oligonucleótidos se realizó con el software Beacon Designer™. El análisis teórico de especificidad se realizó con el software Amplify 3.1 para Mac. En el cuadro 15 se muestran las secuencias y características de los oligonucleótidos, tamaños de los amplicones obtenidos y el número de acceso al PrimerBank de los oligonucleótidos obtenidos de ésta base de datos; con asterisco (*) se denotan los pares de oligonucleótidos diseñados *de novo*, para los cuales no existen hasta el momento secuencias de oligonucleótidos publicadas para ser empleados al menos para PCR cuantitativa.

Análisis de Perfiles de Expresión Génica en Leucemia Linfoblástica Aguda

Cuadro 15. Características de oligonucleótidos empleados para validar los niveles de expresión por PCR Cuantitativa en arreglo (qPCR-ARRAY).

# GenBank	Símbolo	Descripción	Amplificación	Oligonucleótido Sentido	Tm F	Oligonucleótido Reverso	Tm R	PrimerBank ID
NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	217	ATGAGCACTGAAGCATGTATCC	60.7	GAGGCTGATAGAGAGAGGTC	60.8	25952111a1
NM_000546	TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	191	TGTGTCCCGGAGCATAT	62.9	GTAGCTGCCTGTAGGTT	60.7	8400738a2
NM_017617	NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	177	GCTGGACTGGTGGAGACTG	61.7	AGCCCTGTTACAGGGGTT	62.6	27894368a3
NM_016734	PAX5	Paired box gene 5 (B-cell lineage specific activator)	150	AAACCAAGGTCGCCAC	60.8	GTTGATGGAATGACCTAGG	60.4	9951920a3
NM_004119	FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3	117	AGGACAGTGTAGAAAGCTG	61.2	GAGCTGTGTTAAAGACCAG	60.6	4758396a1
NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	156	AGGCGACACCAACAGCTCT	62.3	TGGACGGACAGGATGATGCG	61.9	12962935a3
NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	108	ATGGAGCCTTCGGCTGACT	63	GTAACATTCGGTGGTTGGG	61	4502749a1
AY656171	OPAL1	unnamed protein product [Homo sapiens]	125	CAACATGAATCACTGATCGC	60.4	GTTGGAGGTCGGTTCACCAC	62.7	33563366a2
NM_001904	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	133	ATGTCCAGCGTTTGGCTGAA	62.4	TGGTCTCGTCACTTAGCAGTT	61.4	4503131a3
NM_004049	BCL2A1	BCL2-related protein A1	198	CAGTGCCTCACAGATACCA	61	GATGCCGTCTCAAACTCCT	60.3	4757840a3
NM_001228	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	158	TTTCTGCCTACAGGTTCCACT	60.7	CCTCAATTCGATGCTCACTT	60	15718704a1
NM_007261	PLCG2	Phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	163	ACTCCAAAGATTTCCAGCGAG	60.1	TCCTGGTGAAGATTTCAAGCC	60.5	4505871a2
NM_004379	CREB1	CAMP responsive element binding protein 1	154	CACCTGCATCACCACTGTAA	62	GCTGATTTGTCATGTTAATGT	61.7	4758054a1
NM_000417	IL2RA	Interleukin 2 receptor, alpha	124	GGGATCAGGGCTCTACACAG	61.1	ACTTGGAACCTGACTGCTCTC	61.1	4557667a1
NM_004322	BAD	BCL2-antagonist of cell death	249	CCAGAGTTTGGCCGAGTG	62.5	CCATCCCTTCGTGCTCT	63	10835069a1
NM_005252	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	125	GGCCAGGTGGAAAGTATATC	60.6	CCGCTGGAGTGTACGTCA	61.5	4885241a3
NM_031419	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	177	CAGTTCAAGTTAGCTGGCTGA	60	TCGTGGAGAACTGTTACAGG	60.6	13899229a1
NM_015247	CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)	188	GAGGAGAGTTCAAGCTGTT	61.4	TCGCAAGTCAACTCCAAAGAA	60.4	14165258a3
NM_001127	AP1B1	Adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	142	CAGTACCAGCAATCTGGAG	60.1	TCAGCCCTTAGCCTTCAT	62.6	22027651a2
NM_003745	SOC1	Suppressor of cytokine signaling 1	121	CGCTGGGATTTCACTGGG	62.2	TAAGGGGCAAAAAGAGTCC	60.8	4507233a2
NM_021992	TMSL8	Thymosin-like 8	91	AACAGCCTTCCAGCTCTC	63	TGTCAACTTCCACTCCG	64.3	*
NM_003528	HIST2H2BE	Histone cluster 2, H2be	287	ATGCTTAACCCGGCAAAATC	61.3	TGATCTCGCGGATGTGAT	63	4504277a1
NM_016303	WBP5	VW domain binding protein 5	174	GGTAATCGTCTTGTTC	55.7	ATCGGTCAGTTCCTTC	58.5	*
NM_018014	BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	188	TATGCCCGCAGGGTATTTG	62	GCACATGCTGAGAGGATA	60.1	20336307a1
NM_005759	AB2	Ab1 interactor 2	137	CAATCTACAGTAACCTCTACG	61	GGTGGGGAGACTCATCAAA	61.8	31541785a3
NM_016269	LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	127	AAAGAGCGAATGCTGTTCG	61.3	CGTCTTCTTCCGCTGTA	60.3	7705917a1
NM_024514	CYP2R1	Cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1	116	TGTTGTAGGGGTTTGTCTGT	63	CGGAGGGATTTAGTCATCA	61.3	13375650a1
NM_018638	ETNK1	Ethanolamine kinase 1	138	GTTTGCATTTGGCTTCTCATTTCT	60	GCAGTAACTCAGGCTTCAT	60	10092615a3
XM_376350	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	216	GTTATGTTGAAAGAACCCGAGA	60.2	CGGTCATTAAACCACTCCAATA	60	5911917a3
NM_002959	SORT1	Sortilin 1	180	CCTGCAAAAGTGCACCTTGG	61	TGTCCTTGTATCTGTTGAAAC	60.2	17149884a3
NM_006820	IFI44L	Interferon-induced protein 44-like	127	AGCATAAACCCGGGTATAGG	61.2	TGTCATCATGCAAGCTCTCG	62.1	5803027a2
NM_006045	ATP9A	ATPase, Class II, type 9A	108	GTGTACGCAAGAGCCAAAT	60.6	CAGCGTGTCTCTATGCTCAG	60.5	8217528a3
NM_002922	RG51	Regulator of G-protein signalling 1	133	AGAGTGTGATCTTTGGCCCTGT	61	GGGGTGTGCTTTAATCTT	60.2	21361447a2
NM_002656	PLAGL1	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	138	AAAGATGCTTCTACACCCGGA	60.9	AGTGGGCTCTTTGGTATGCC	61.5	27894293a3
NM_173354	SNF1LK	SNF1-like kinase	176	ACTGTCCAGCCATCAGATCG	62.1	CGCTCAAAGACTCCGGG	61.7	27597094a2
NM_014485	PGDS	Prostaglandin D2 synthase, hematopoietic	172	TGACTGGCTGAAATCAAAATCAA	60.4	AGTGTCCAAATAGACTCAACAT	60	7657457a1
NM_004084	DEFA1	Defensin, alpha 1	111	TCCCTTGCATGGAGCAAAAG	62.2	GTTCCATAGCAGGACTCTCTC	62.5	4758146a1
NM_000189	HK2	Hexokinase 2	138	TTTGACCAGATTGCCGAATGC	62.1	GTTCATGAGACCAGGAAACT	61.1	15535327a3
NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	123	ACATGAAATGTGAAAGCAAGG	60.2	CAITTTGCTGTTCTCTCTGT	61.9	6274552a3
NM_005360	MAF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	104	CGTCTCTCCGAGTTTTC	62.4	ACACTGTGTAAGTACACGATGCT	61.1	5453736a1
NM_002964	SI00A8	S100 calcium binding protein A8	65	TGATAAAGGGAAATTCATGTC	60.6	ACACTGGTCTCTAGCAATTTCT	61.1	21614544a1
NM_002228	JUN	Jun oncogene	143	TCCCTCAAAGTCCCGAAAAA	62.6	TGACTTTTGTAAAGGTTGCC	61.2	47586160a1
NM_002957	RXR α	Retinoid X receptor, alpha	119	AGAAGTCTATGGTCTCTTGG	61.3	CAGGCAITGAGCCCGATG	61.2	45067550a2
NM_005633	SOS1	Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	102	AAAGTGAATGTGTGCTGTGAC	61.7	TGAGGTGGAAGGCTCTTCTG	62.7	15529996a2
NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	113	CTGAGAAGTATGACACAGCCT	60	AGTCCATCCAGATACCAAAAG	60.8	7669492a3
NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	121	CGAGGTTGGCTGGAAGTACC	62.2	CTTCTGGCTGTTTCCGTAG	62.4	6912634a1
NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	86	TGCTGTCTCCATGTTTGAATGATCT	60	TCTGTCTCCCACTCTAAGT	60.5	*
NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	117	ATTGTAATGACCGTCAACAGGG	60.2	GCAATGTTTTTCCGAGTGTCAA	60.2	4504483a3

5.8.1 OPTIMIZACION DE qPCR-ARRAY

Antes de comenzar los ensayos de validación de los niveles de expresión de los genes seleccionados, fue necesario optimizar la PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-ARRAY), primeramente determinando la eficiencia y especificidad de las amplificaciones; y posteriormente para establecer la concentración mínima de RNA total a procesar. Para los ensayos de optimización se trabajó con RNA total de la línea celular NB4, empleada como control.

Se realizaron PCRs cuantitativa de 26 genes (25 genes problema y un gen endógeno), siguiendo la metodología descrita previamente en el punto 4.7.2 y empleando 3 μ g de RNA total de células NB4. La eficiencia se determinó con base en las curvas de amplificación, hasta obtener homogeneidad en las pendientes durante la etapa lineal de la amplificación, indicando esto homogeneidad en las eficiencias de amplificación de los genes en cuestión y bajo las mismas condiciones de amplificación. En la figura 18 se muestran la homogeneidad en las curvas de amplificación de algunos de los genes analizados.

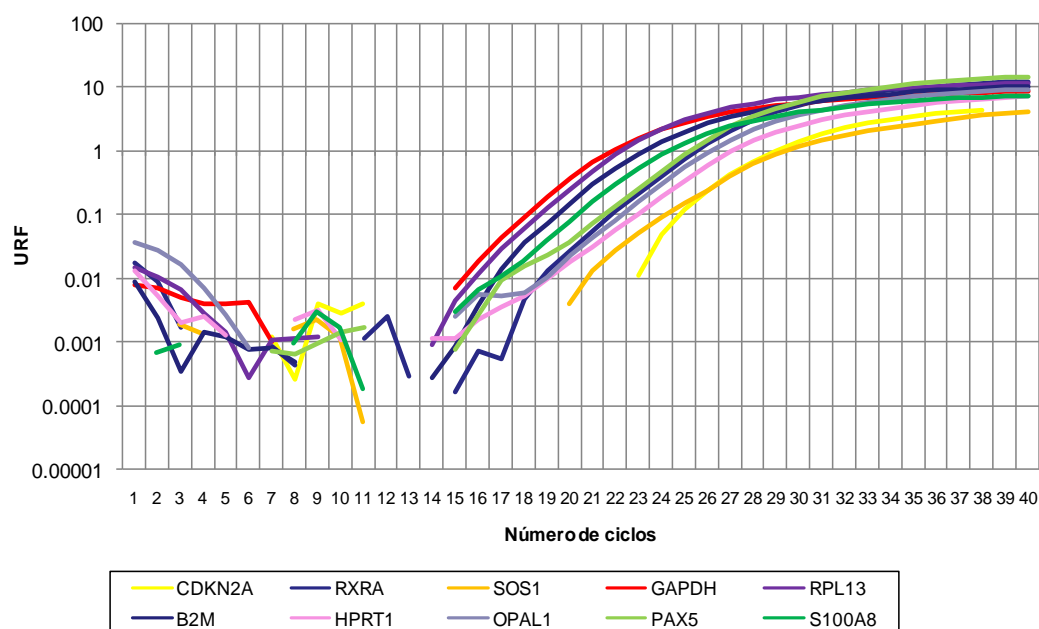


Figura 18. Curva de amplificación de genes evaluados realizada con SYBR Green. Se muestra la homogeneidad en la etapa lineal de las curvas de amplificación de algunos de los genes evaluados. Las PCRs cuantitativas se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el punto 4.7.2, empleando 3 μ g de RNA total de células NB4.

Una vez establecida la homogeneidad en las eficiencias de amplificación se procedió a la determinación de la especificidad de las amplificaciones a través de las curvas de disociación. La curva de disociación es una estrategia post-qPCR que se realiza solamente cuando se emplea un fluoróforo de intercalación (como el SYBR Green empleado en los ensayos de qPCR), con la finalidad de identificar la amplificación de productos inespecíficos. Un solo pico en las curvas de disociación (el cual está determinado por la T_m del amplicón) es indicativo de un sólo amplicón, mientras que la presencia de más de un pico es indicativo de inespecificidad (ya que el amplicón inespecífico tendrá una T_m diferente que se reflejará en un pico extra). En la figura 19 se muestran las curvas de disociación de algunos de los genes evaluados, en la cual se demuestra la especificidad de los oligonucleótidos utilizados al obtenerse solamente un pico en cada curva; cabe destacar la homogeneidad en las condiciones de amplificación utilizadas en la qPCR-ARRAY.

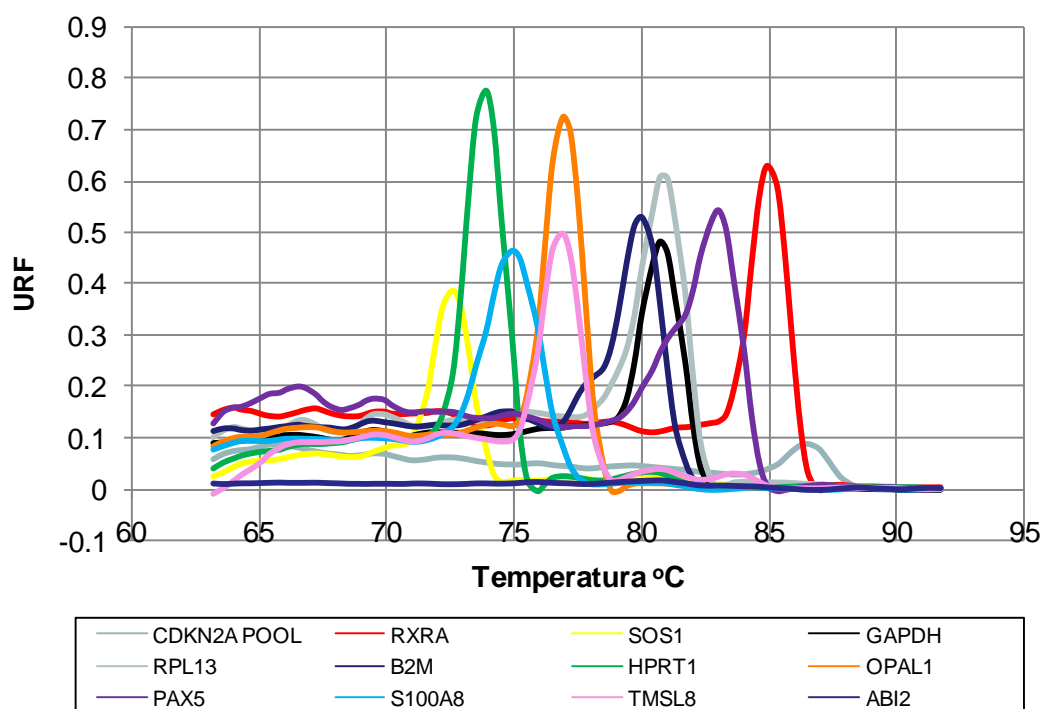


Figura 19. Curvas de disociación de algunos genes evaluados por PCR cuantitativa. Se muestra la presencia de solamente un pico en todas las curvas de disociación, lo que es indicativo de la obtención la especificidad de los oligonucleótidos utilizados. Las curvas de disociación es una estrategia post-qPCR que se utiliza solamente cuando se emplea un fluoróforo de intercalación, como el SYBR-Green empleado en ésta cuantificación.

Una vez establecida la especificidad de amplificación y la homogeneidad en las eficiencias de amplificación se procedió a la optimización de la cantidad de RNA total en las reacciones de PCR cuantitativa, con la finalidad de utilizar la menor cantidad posible de RNA total de las muestras y poder así evaluar los niveles de expresión de la mayor cantidad de genes posibles en cada muestra. Para esto se evaluó el efecto de la concentración de RNA total en la reacción de retrotranscripción que se utilizó en la cuantificación de los niveles de expresión de los 25 genes por PCR cuantitativa, siguiendo la metodología descrita en el punto 4.7.2. El rango evaluado fue de 3 μg – 0.5 μg , obteniendo como resultado que 0.5 μg de RNA total arrojan los mismos resultados que emplear 3 μg . Los niveles de expresión se normalizaron con el gen endógeno β -2-Microglobulina. En la figura 20 se muestra el efecto de la concentración de RNA total a partir de la cual se partió para las reacciones de PCR cuantitativa.

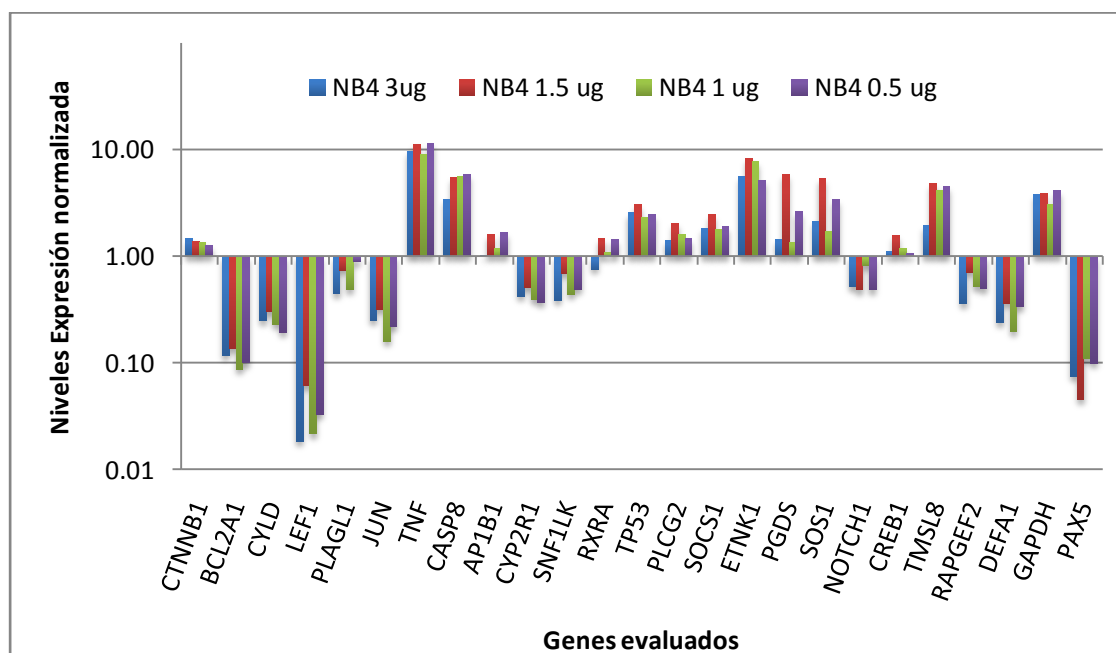


Figura 20. Efecto de la concentración de RNA total procesado en la PCR cuantitativa en arreglo (qPCR-ARRAY). Se evaluaron los niveles de expresión obtenidos partiendo de reacciones de retrotranscripción realizadas con RNA total de células control (NB4) desde una concentración de 3 μg hasta 0.5 μg . Los valores se encuentran normalizados con el gen endógeno de expresión constitutiva β -2-microglobulina. Obsérvese que los niveles de expresión empleando 0.5 μg son prácticamente los mismos que utilizando 3 μg .

Posterior a la optimización de las reacciones de qPCR-ARRAY se procedió a su aplicación en muestras clínicas de una cohorte de pacientes con LLA de recién diagnóstico sin tratamiento. Para determinar diferencias en los niveles de expresión respecto de los niveles considerados normales, se compararon con los niveles de expresión de cada uno de los genes de las muestras, con sus respectivos genes en una mezcla de RNA total de 6 sujetos clínicamente sanos. Las reacciones de qPCR para cada gen se realizaron por duplicado pero teniendo como criterio para su aceptación una desviación estándar <0.05 en los valor de Ct obtenidos, por lo que prácticamente las curvas de amplificación se traslapan. La comparación de las muestras de pacientes con respecto a las muestras control sano se realizó con el método $\Delta\Delta Ct$. Brevemente, los niveles de expresión del promedio de los duplicados de cada gen fueron normalizados de manera individual con el promedio de los 4 genes endógenos empleados como controles en cada corrida de qPCR-ARRAY (GAPDH, RPL13A, B2M y HPRT1), con lo que se obtuvo un valor ΔCt para cada gen por paciente y el grupo control sano. Los valores ΔCt de cada gen en cada muestra fueron restados al valor ΔCt de su respectivo gen en el grupo control sano, con lo que se obtuvo un valor $\Delta\Delta Ct$ para cada gen. Cada valor $\Delta\Delta Ct$ se incluyó en la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, con lo que se obtuvieron las diferencias en los niveles de expresión de cada uno de los genes analizados en cada muestra, con respecto al grupo control sano. Además se realizó la prueba estadística t , con base en los valores ΔCt de cada gen en las muestras problema y en el grupo control, en la que se obtuvieron valores de p para cada comparación.

Con los valores de la expresión diferencial de cada gen, obtenidos mediante el análisis de los resultados de los ensayos de qPCR-ARRAY y los valores de p , se realizaron gráficos tipo volcán, aplicando previamente \log_2 (logaritmo base 2) a los valores de expresión diferencial (con la finalidad de distribuir los resultados en sub-expresados y sobre-expresados, dependiendo de si el valor del nivel de expresión obtenido fue <1 ó >1 , respectivamente. Un valor de 1 significa que el nivel de expresión es idéntico al de la muestra control de referencia).

5.8.2 COMPARACION DE NIVELES E EXPRESIÓN

5.8.2.1 COMPARACIÓN POR LINAJE: LLA-T & LLA-B

La comparación de los niveles de expresión obtenidos por qPCR-ARRAY arrojó a cuatro potenciales marcadores, que mostraron expresión diferencial preferente por algún linaje, aunque no fue del todo contundente la agrupación de acuerdo a los niveles de expresión. En la figura 21 se muestran los niveles de expresión normalizados de 7 genes: 3 genes endógenos empleados como controles (GAPDH, RPL13A y β -2-Microglobulina) y 4 genes con expresión diferencial con tendencia por linaje (AP1B1, PLCG2, NOTCH1 y PAX5), en la cual se observa muy poca variación entre los niveles de expresión de los genes endógenos y ninguna tendencia por el linaje de la LLA; sin embargo, para los otros 4 genes se observa la tendencia de los niveles de expresión de las muestras de LLA-T (color azul), las cuales tienen niveles de expresión diferentes al de las muestras de LLA-B. También se puede observar que las muestras de LLA-T tienen menores niveles de expresión de los genes AP1B1, PLCG2 y PAX5 que las muestras de LLA-B; mientras que NOTCH1 presenta mayor nivel de expresión en LLA-T.

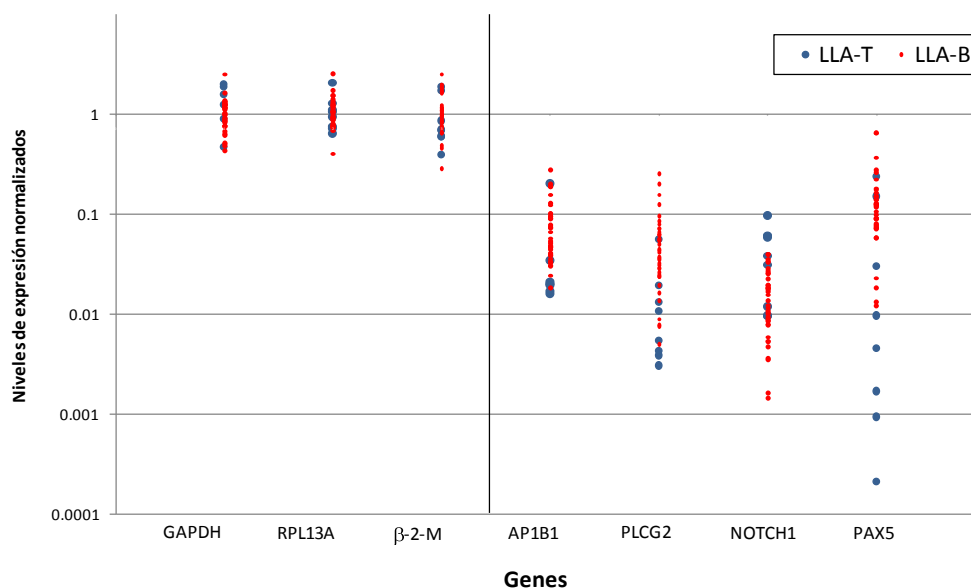


Figura 21. Niveles de expresión génica normalizada de genes identificados en la comparación por linaje. En color azul se denotan las muestras de LLA-T, y en color rojo las muestras de LLA-B. Las unidades de expresión son arbitrarias. Se puede observar como las muestras de LLA-T tienen a agruparse diferente de las muestras de LLA-B.

En la figura 22 se muestran gráficas tipo volcán de los 4 genes con expresión diferencial en LLA-T respecto de LLA-B. En la gráfica se representan los niveles de expresión entre las muestras, comparadas con la expresión en el grupo control sano. Se marca un umbral que delimita a los genes con una expresión diferencial de más de 2 veces, y un valor de $p = 0.05$. Los niveles de expresión de los genes AP1B1, PLCG2 y PAX5 fueron diferencialmente significativos en LLA-T con respecto a LLA-B; mientras que NOTCH1 a pesar de observarse una tendencia en la figura 21, al realizarle la prueba estadística los niveles de expresión no resultaron significativos.

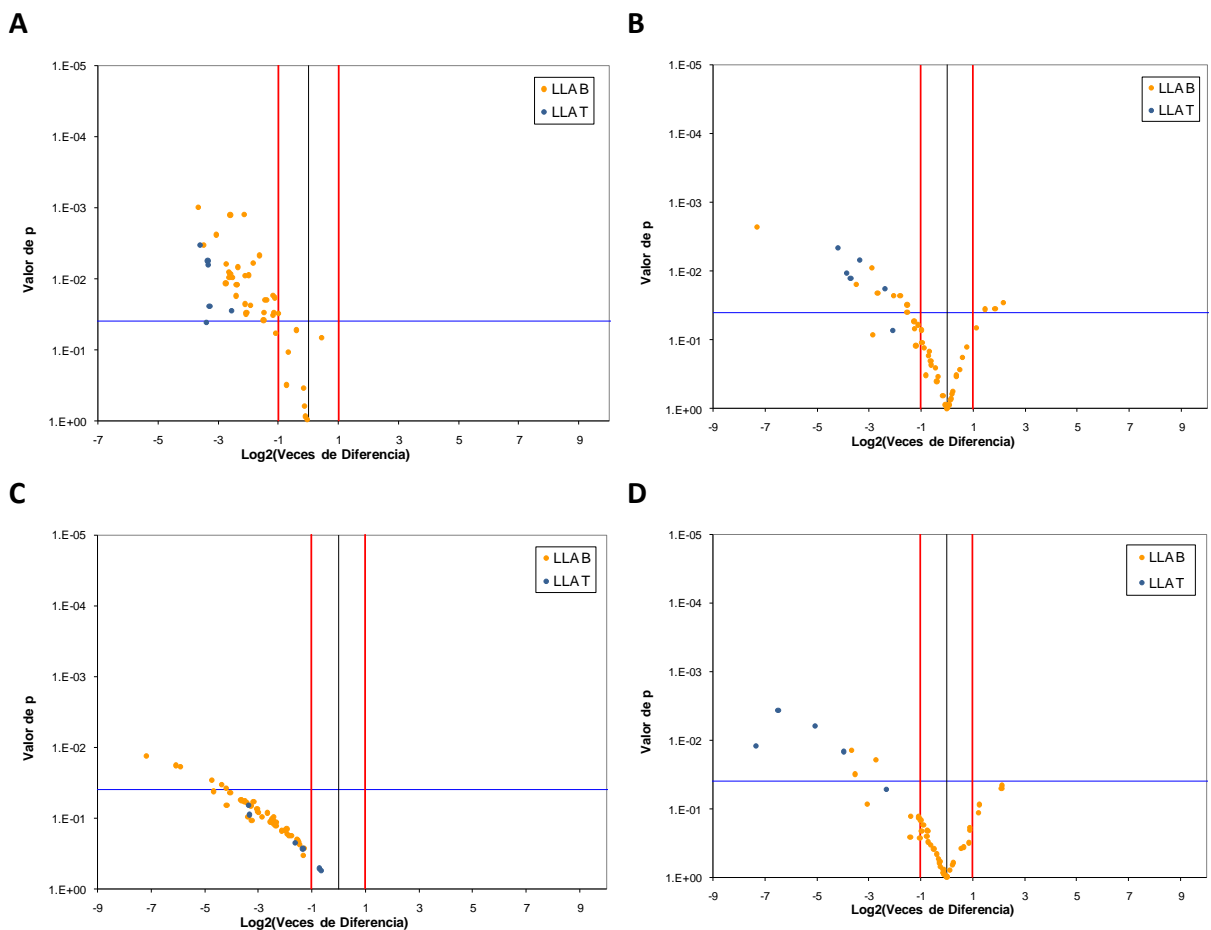


Figura 22. Gráficas tipo volcán de los genes con expresión diferencial con tendencia por linaje. Se muestran los niveles de expresión de las muestras con respecto al grupo control sano. En A) AP1B1; B) PLCG2; C) NOTCH1; y D) PAX5. Obsérvese que la expresión de los genes AP1B1, PLCG2 y PAX5 es diferencialmente significativa; mientras que NOTCH1 a pesar de presentar tendencia (esquemática en la figura 21) los niveles de expresión no son significativos.

5.8.2.2 COMPARACIÓN POR GRUPOS DE EDAD: NIÑOS & ADULTOS

Se compararon los niveles de expresión normalizados por grupos de edad, en la que los genes IL2RA y CDKN2A presentaron una mayor tendencia a agruparse en adultos, como se observa en la figura 23. También se identificaron a los genes TMSL8 y WBP5, aunque con una menor tendencia a agruparse en adultos (ver figura 23). El gen SNF1LK no mostró tendencia por grupos de edad, a pesar de que en los resultados de expresión en los ensayos de microarreglos (ver figura 12) resultó ser importante para distribuir a las muestras de acuerdo al grupo de edad del paciente (ver figura 23).

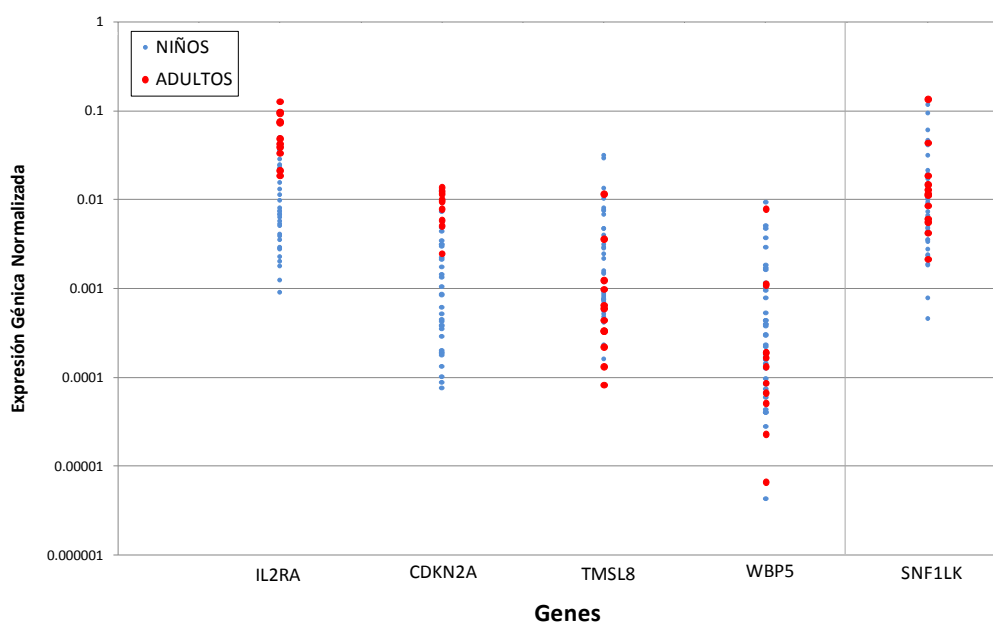


Figura 23. Niveles de expresión normalizada de los genes con expresión diferencial con tendencia por grupos de edad. Se muestran los niveles de expresión diferencial en 5 genes, en la comparación de muestras con respecto al grupo control sano, en la que se observa que en adultos los genes IL2RA y CDKN2A tienden a agruparse más que los genes TMSL8 y WBP5 que presentan una menor tendencia. La expresión del gen SNF1LK (representado en la figura 12 con expresión diferencial entre grupos de edad por microarreglos) no presenta una tendencia de agrupación diferente entre los grupos de edad en los resultados de qPCR-ARRAY.

Al realizarle la prueba estadística t en la comparación de los niveles de expresión de las muestras problema con respecto a las muestras de control sano, la expresión de los genes IL2RA y CDKN2A resultó ser significativa solamente en algunas muestras de adultos,

además de que no presentó una sub-expresión preferente por grupos de edad, es decir, que tanto las muestras de adultos como de niños presentaron en su mayoría sub-expresión, como se demuestra en la figura 24A y 24B.

Por otro lado, los niveles de expresión de los genes TMSL8 y WBP5 presentaron sub-expresión significativa en las muestras de adultos, aunque al igual que como para los genes IL2RA y CDKN2A, dicha sub-expresión no fue exclusiva del grupo de adultos (ver figuras 24C y 24D).

En el caso de los niveles de expresión del gen SNF1LK en la comparación por grupos de edad, la mayoría de los adultos presentaron sub-expresión significativa, pero no resultó ser exclusiva de un grupo de edad, como lo pareció demostrar en la figura 12.

5.8.2.3 COMPARACION POR SEXO: HOMBRES & MUJERES

Las comparaciones de los niveles de expresión de acuerdo al sexo no arrojaron ninguna tendencia. Tanto en los gráficos de expresión normalizada como en los gráficos tipo volcán muestran heterogeneidad en los niveles de expresión. En la figura 25 se muestra de ejemplo un gráfico tipo volcán de la expresión diferencial del gen OPAL1 comparada contra el grupo control sano, en la que se observa una distribución heterogénea de las muestras, a pesar de que la expresión diferencial es significativa en la mayoría de las muestras.

5.8.2.4 COMPARACION POR HALLAZGOS EN EL CARIOTIPO

Se compararon los niveles de expresión de los pacientes con resultado de cariotipo. Los grupos por resultado de cariotipo fueron: cariotipo normal, cromosoma filadelfia positivo, hiperdiploidía, hipodiploidía, y otros hallazgos. De los genes evaluados, no se identificaron genes con expresión diferencial que presentaran una agrupación contundente asociada a los hallazgos en el cariotipo. Solamente se identificaron a los genes FLT3 y RGS1 con cierta tendencia por algunos de los grupos comparados. En la figura 26 se muestran las tendencias de la expresión diferencial de los genes FLT3 y RGS1 de las muestras evaluadas, por ciertos grupos con alguna característica en su cariotipo.

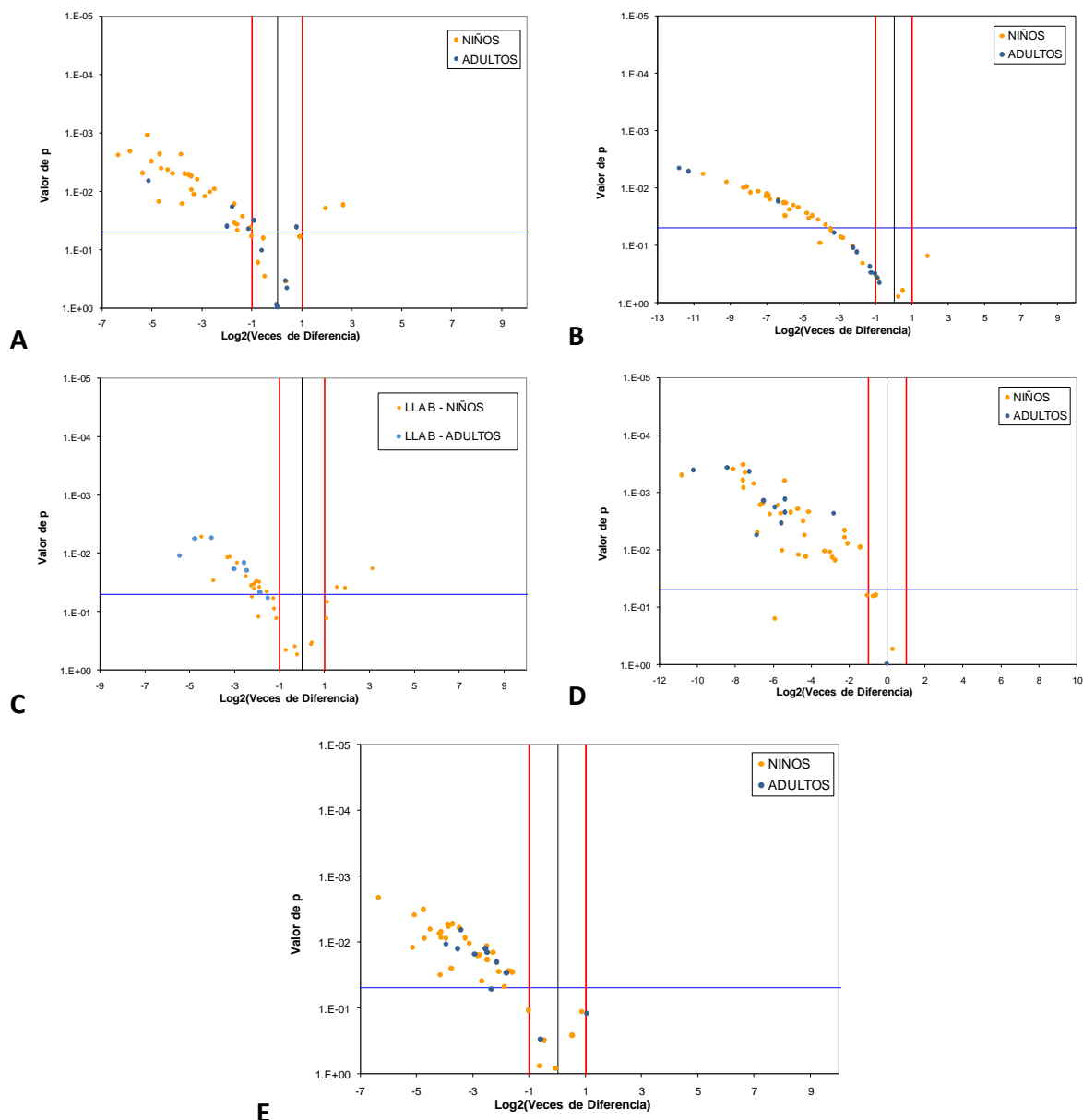


Figura 24. Gráficas tipo volcán de los genes con expresión diferencial con tendencia por grupos de edad. Se muestran los niveles de expresión diferencial de 4 genes con tendencia a agruparse de acuerdo a la edad del paciente con LLA: A) IL2RA, B) CDKN2A, C) TMSL8, D) WBP5; y en E) a SNF1LK, que no presenta una tendencia de acuerdo a los niveles de expresión normalizados (figura 23) , pero que al compararse con los niveles de expresión del grupo control sano se muestra que la mayoría de los adultos presentan sub-expresión significativa, aunque ésta no se agrupa diferente a la de los niños. Se observa también en A) y B) que la mayoría de los adultos presentan sub-expresión de los genes IL2RA y CDKN2A, respectivamente, sin embargo solamente la expresión de algunas muestras resulta significativa; mientras que en C) y D) los adultos presentan sub-expresión significativa de los genes TMSL8 y WBP5, respectivamente, aunque dicha sub-expresión no es exclusiva del grupo de muestras de adultos.

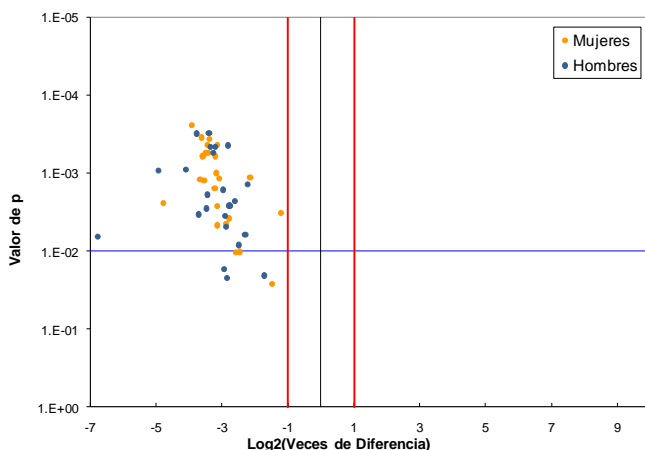


Figura 25. Ejemplo de resultados obtenidos en la comparación de niveles de expresión diferencial entre hombres y mujeres. Se muestra una gráfica tipo volcán en la que se observa que las muestras no presentan tendencia alguna para agruparse de acuerdo al sexo, a pesar de ser significativo el nivel de expresión. Las diferencias en niveles de expresión parecen no estar influenciados por el sexo.

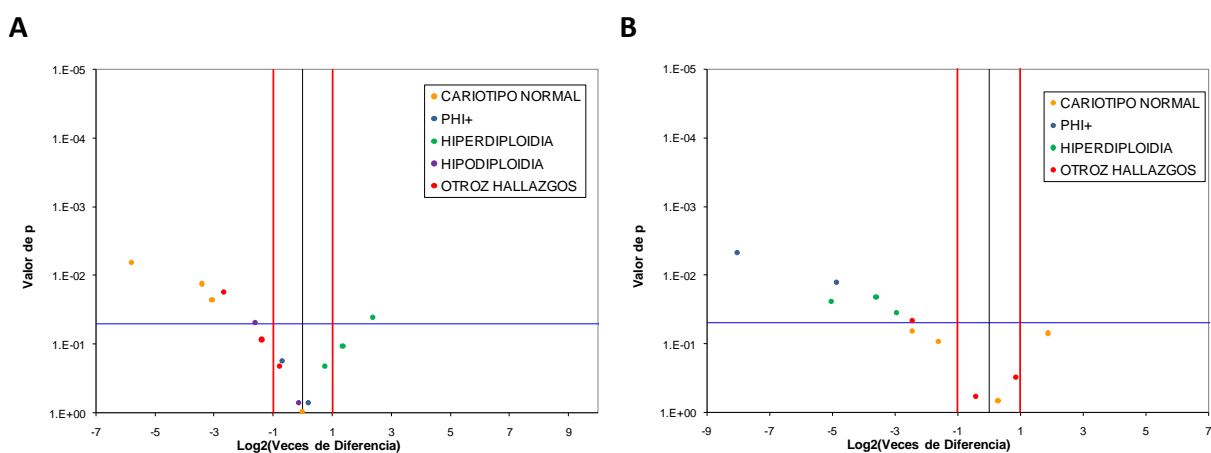


Figura 26. Niveles de expresión diferencial de genes con tendencia a agruparse por su de acuerdo a hallazgos en el cariotipo. A) Expresión diferencial del gen FLT3; los pacientes con hiperdiploidía presentan sobre-expresión, aunque no es significativa. Tres de las 4 muestras con cariotipo normal presentan sub-expresión significativa de FLT3. B) Las muestras con hiperdiploidía presentan sub-expresión significativa del gen RGS1, así como también las muestras positivas para el cromosoma filadelfia (PHI+).

5.8.2.5 COMPARACION POR GRUPOS DE RIESGO DE RECAÍDA: ALTO & HABITUAL

La comparación de los niveles de expresión de acuerdo a los grupos de riesgo de recaída permitió solamente la identificación del gen DEFA1-3 con sobre-expresión diferencial significativa en la mayoría de los pacientes con riesgo habitual; mientras que todas las muestras que presentaron sub-expresión significativa pertenecen al grupo de alto riesgo, tal como se muestra en la figura 27.

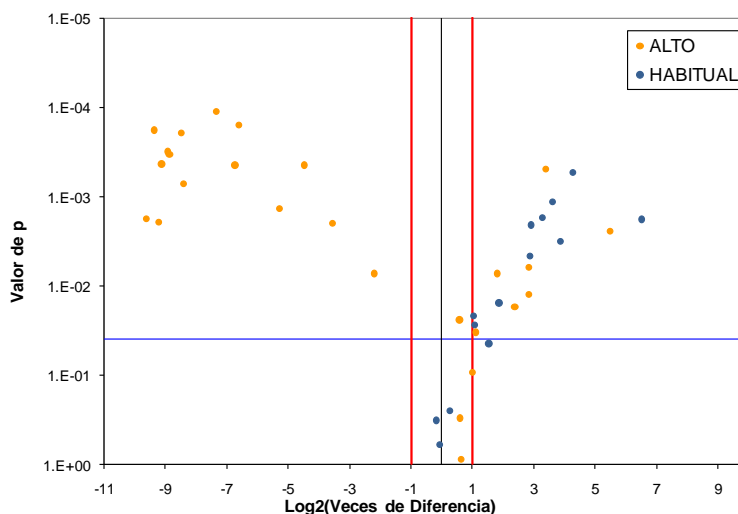


Figura 27. Sub-expresión del gen DEFA1-3 asociada al grupo de pacientes de alto riesgo.

La sub-expresión significativa del gen DEFA1-3 se presentó de manera exclusiva en las muestras de pacientes de alto riesgo; mientras que la sobre-expresión del mismo gen se presentó de manera significativa en la mayoría de los pacientes con riesgo habitual, aunque de acuerdo a las muestras evaluadas, la sobre-expresión no fue exclusiva de los pacientes con riesgo habitual. Un grupo de cinco muestras presentaron niveles de expresión muy similares al grupo control sano (como se observa en la parte central inferior del gráfico tipo volcán).

5.8.2.6 CLUSTERING DE RESULTADOS DE qPCR-ARRAY

Con los resultados de los niveles de expresión normalizados se generó una matriz, la cual fue importada al software gratuito dChip, para representar los resultados globales de los niveles de expresión de los 48 genes evaluados (incluyendo los genes endógenos empleados en la normalización) en la cohorte de las 55 muestras analizadas. En la figura 28A se muestra el gráfico de clustering jerárquico no supervisado obtenido, en el que se muestra su distribución en 6 grupos (de acuerdo al código de colores en la parte inferior), sin embargo, los grupos no se asocian a ninguna variable evaluada. En la figura 28B se muestra el análisis de componentes principales (PCA, representado como un gráfico de dispersión en el que el valor de la expresión de cada gen en cada muestra se conjuntan para otorgarle a la muestra una posición determinada en el espacio, con la finalidad de identificar o inferior asociaciones con otras muestras o características), en el que las muestras se representan coloreadas de acuerdo al código establecido en la parte inferior de la figura 28A; los grupos formados no se asocian a las variables analizadas.

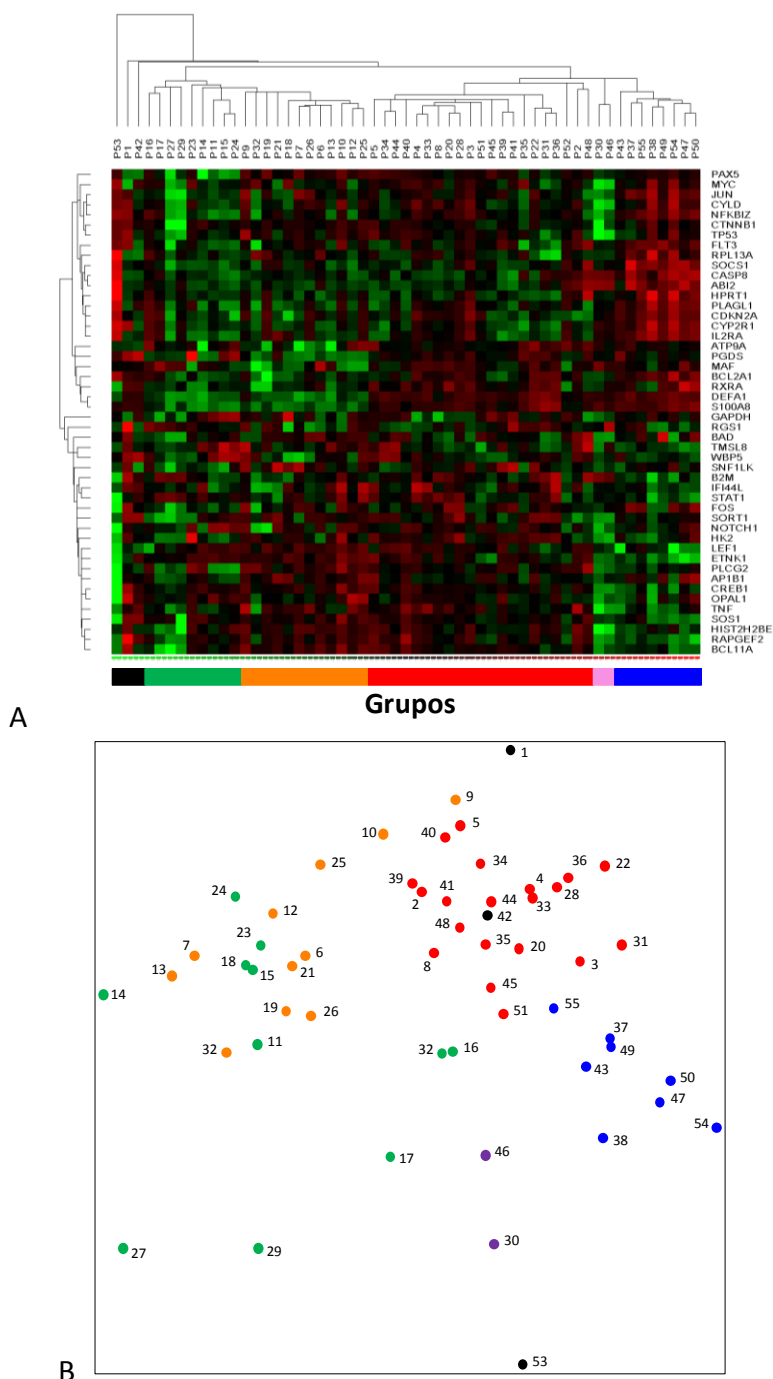


Figura 28. Representación global de resultados de qPCR-ARRAY. A) Clustering jerárquico no supervisado de los niveles de expresión normalizados de todos los genes evaluados en las 55 muestras analizadas; se observa la distribución en 6 grupos, pero no se asocian a las variables analizadas. B) Análisis de Componentes Principales coloreado de acuerdo al código de colores de los grupos formados en el clustering jerárquico no supervisado; se observa la formación de 5 grupos, aunque éstos no coinciden con las variables analizadas.

CAPITULO VI

6. DISCUSION

Los datos demográficos de la población con leucemia linfoblástica aguda estudiada arrojan los mismos datos de frecuencia que se presentan en otras regiones geográficas, como en los Estados Unidos y varios países europeos.¹⁰ En nuestra población el 81.2% fueron niños y un 18.8 de adultos; sin embargo, la frecuencia de hombres con leucemia linfoblástica aguda fue la misma que en mujeres (50% en cada grupo). El linaje más frecuente fue de precursores de linaje B, seguido por el linaje T (83.3% y 12.5%, respectivamente). Se presentaron un par de casos de LLA atípicas: un caso de LLA-NK y uno de LLA bifenotípica. De manera característica, 5 de las 19 muestras con resultado de cariotipo no presentaron anormalidades, aunque eso no descarta la presencia de alteraciones crípticas.

Con la finalidad de obtener un perfil de expresión lo más intacto posible y que representara a la población celular afectada, se estableció un rápido procesamiento de la muestra, desde su obtención hasta la extracción del RNA total. Durante el procesamiento de la muestra se incluyó centrifugación en gradiente y el enriquecimiento del linaje celular causante de la leucemia, para obtener de ésta manera un perfil de expresión específico de la leucemia en el paciente.

Solamente se escogieron 11 muestras para ser procesadas hasta su hibridación en microarreglo; y fueron las que tuvieron una mayor concentración de RNA total, que presentaron una mayor integridad, y que además tuvieron las variables para permitir comparaciones: edad, sexo, pronóstico y linaje. Sin embargo, hubieron más muestras que pudieron haber sido procesadas por cumplir los requisitos de calidad y concentración de la muestra, pero se tuvo la limitante del número de microarreglos disponibles al momento de realizar el ensayo.

Los microarreglos utilizados (HG U133 Plus 2.0) contiene oligonucleótidos que representan a ~47,000 transcritos, representando en total a ~38,500 genes. Las

comparaciones realizadas se hicieron a partir de los perfiles de expresión génica de muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes con LLA de recién diagnóstico y sin tratamiento. La metodología de los microarreglos de expresión génica utilizados no es competitiva, por lo que solamente la muestra problema es marcada e hibridada por microarreglo, y dada la inclusión de “spikes” de concentración conocida, durante el análisis se obtiene la concentración relativa de transcritos en la muestra, lo que analíticamente hace posible la comparación de resultados entre varias muestras, sin la inclusión de un control normal o sano.

Las comparaciones de los perfiles de expresión se realizaron entre grupos de edad, sexo, linaje y pronóstico terapéutico, con la finalidad de identificar genes con niveles de expresión diferencial entre grupos. Para seleccionar a los genes como potenciales marcadores, se empleó un umbral de 7 veces los niveles de expresión de cada gen al comparar entre grupos. El alto nivel del umbral fue para seleccionar solamente a los genes que presentaran una diferencia real entre las muestras y grupos comparados, y evitar de ésta manera que las diferencias se pudieran deber a cuestiones metodológicas durante el procesamiento de la muestra, o a las variaciones individuales de cada paciente. Además, el tener un nivel de expresión alto compensa en parte el efecto de “dilución del nivel de expresión” al extraer el RNA total de toda la muestra sin separar y/p concentrar por tipos celulares.

En estudios previos recientes en los que se estudia a pacientes con LLA se han propuesto algunos genes como potenciales marcadores, tales como OPAL1, PAX5, CASP8AP2 y CD58, sin embargo, al realizar las comparaciones no identificamos a ninguno de éstos genes con niveles de expresión diferencial que cumplieran con el umbral estricto empleado en el estudio. Otro conjunto de genes con expresión diferencial reportada: MYC, p53, FLT3 y CDKN2A, tampoco superaron el umbral de selección propuesto. Tras el análisis de vías de los genes con expresión realmente diferencial que identificamos en nuestro estudio, se seleccionaron 36 genes para su validación. Además se incluyeron 8 de los genes previamente reportados que nosotros no encontramos diferencialmente expresados bajo nuestros criterios de selección, y 4 genes endógenos de expresión constitutiva para

permitir la normalización en los ensayos. Los niveles de expresión se validaron en una cohorte de 48 muestras de pacientes con LLA de reciente diagnóstico y sin tratamiento. La metodología para su validación fue PCR cuantitativa con SYBR Green como fluoróforo detector, bajo condiciones homogéneas de amplificación simultánea de los 48 genes mencionados.

Como resultado de los ensayos de validación, la comparación de los niveles de expresión de acuerdo al linaje de la LLA arrojó solamente la expresión diferencial con tendencia de 4 genes: AP1B1, PLCG2, NOTCH1 y PAX5. Al comparar los niveles de expresión de las muestras contra el grupo control sano (empleado solamente durante la validación) y aplicar la prueba estadística, AP1B1 y NOTCH1 resultaron sub-expresados, pero no mostraron tendencia por algún linaje (ver figuras 22A y 22C), sin embargo PLCG2 y PAX5 mostraron una mayor tendencia a sub-expresarse en LLA-T (ver figuras 22B y 22D). La expresión baja o nula de PAX5 (Paired Box Gene 5, en inglés) en LLA-T ya ha sido reportada previamente, junto con la mayor expresión en LLA-B⁸⁷⁻⁸⁹. PAX5 ha mostrado una mayor expresión en pacientes en recaída.^{88,89}

La sub-expresión del gen PLCG2 (Fosfolipasa C gamma 2) ha sido identificada previamente en leucemia linfocítica crónica, pero no se ha validado su expresión.^{94, 95} Solamente existe un reporte que lo identificó en LLA, como predictor de LLA-T.⁹⁶ Sin embargo, los resultados de la validación en la cohorte estudiada muestran tanto sobre-expresión como sub-expresión en linaje B pero la mayoría sin significancia estadística, mientras que los pacientes de linaje T muestran en su mayoría una sub-expresión significativa (ver figura 22B).

Los niveles de expresión normalizados de los genes IL2RA, CDKN2A, TMSL8, WBP5 y SNF1LK, parecieron arrojar una tendencia a agruparse por grupos de edad (niños & adultos), sin embargo al comparar con el grupo control sano y aplicar la prueba estadística, los niveles de expresión de los genes IL2RA y CDKN2A resultó ser significativa solamente en algunas muestras de adultos. La expresión diferencial del gen CDKN2A entre niños y adultos, ya había sido reportada previamente identificada en LLA⁹⁶, y nuestros resultados coinciden con su reporte, en el que no existe consistencia en los niveles de expresión entre

grupos de edad. La sub-expresión de TMSL8 y WBP5 fue constante y significativa en todas las muestras adultos, sin embargo, para el gen WBP5 los niveles de expresión no fueron diferentes de los niños. Los niveles de expresión del gen TMSL8 tampoco fueron exclusivos del grupo de adultos, aunque éstos presentaron niveles de expresión más significativos que los niños (ver figura 24 C). El gen SNF1LK resultó sub-expresado significativamente en la mayoría de los adultos, aunque al igual que la expresión del gen WBP5, los niños presentaron niveles de expresión muy similares. Los resultados de la validación de los niveles de expresión comparados por grupos de edad no arrojaron resultados claros, indicando que pareciera no existir diferencias entre los perfiles de expresión entre niños y adultos, por lo que pareciera que la edad es una característica clínica dispensable.

La comparación de los perfiles de expresión de acuerdo al sexo del paciente no mostró diferencia alguna en los niveles de expresión, por lo que el sexo resulta, al menos con nuestros resultados, una característica dispensable como factor pronóstico.

La comparación de los perfiles de expresión de acuerdo a hallazgos en el cariotipo no se realizó con los resultados de microarreglos, porque no todas las muestras analizadas tuvieron resultado de dicho estudio. Sin embargo, la comparación de los niveles de expresión de los genes validados entre las muestras con resultado de cariotipo, permitió la identificación de los genes FLT3 y RGS1. El gen FLT3 resultó sobre-expresado en hiperdiploidía, aunque solamente significativo en 1 de 3 casos (ver figura 26A). Este hallazgo ya ha sido reportado previamente,^{44, 97} en los que además muestran que se encuentra mayormente sobre-expresados en el linaje B. Las muestras con hiperdiploidía y portadores del cromosoma filadelfia presentaron sub-expresión significativa del gen RGS1 (ver figura 26B), el cual ha sido reportado con sobre-expresión pero en pacientes con leucemia de células T del adulto (causada por el virus HTLV-I).⁹⁸

En la comparación de los grupos de acuerdo al riesgo de recaída, solamente se identificó al gen DEFA1-3 (Alfa Defensinas 1, 2 y 3; DEFA1 y DEFA3 difieren solamente por el primer aminoácido en el extremo amino, mientras que DEFA2 es el resultado de la degradación parcial de DEFA1 y DEFA3). El gen DEFA1-3 mostró sub-expresión significativa solamente en muestras de pacientes con alto riesgo a recaída; la sobre-expresión estuvo

presente tanto en pacientes con características clínicas de riesgo habitual como de alto riesgo. Recientemente se identificó a éste gen sobre-expresado en pacientes con LLA en recaída o refractarios al tratamiento.⁹⁹ Cabe destacar que las estrategias para su identificación fueron diferentes, y que al comienzo del presente estudio no se consideró su inclusión como un marcador ya que aún no había sido reportado; como resultado del análisis, DEFA1-3 fue identificado diferencialmente expresado y validados sus niveles de expresión. Mientras que en el trabajo de Basso⁹⁹ realizaron la identificación por microarreglos de manera competitiva entre las muestras pareadas del mismo paciente (antes y después del tratamiento), nuestro estudio se enfocó solamente a las muestras de recién diagnóstico y la hibridación no fue competitiva. Sin embargo, en el estudio de Basso no existen datos referentes al nivel de expresión diferencial al momento del diagnóstico, solamente hacen énfasis en que existe una sobre-expresión en pacientes en recaída o refractarios al tratamiento. En nuestro estudio encontramos sub-expresión significativa solamente en el grupo de pacientes con alto riesgo de recaída, por lo que el estudio del seguimiento de los niveles de expresión durante el curso del tratamiento y su asociación con los eventos de recaída y/o refracción al tratamiento podrá arrojar datos de la significancia de las diferencias en los niveles de expresión al momento del diagnóstico.

Éste último hallazgo resulta ser el más interesante de la presente investigación, dado el efecto antiviral de las Alfa Defensinas 1 – 3, identificado *in vitro*, en ensayos con VIH-1 en los que suprime su transcripción y replicación tanto en linfocitos T CD4+,¹⁰⁰ como en CD8+.¹⁰¹ También se ha demostrado el papel antagonista de las DEFA1-3 en la inhibición de la infección por virus del papiloma humano (HPV) en ensayos con pseudovirus capaces de infectar a células HeLa.¹⁰² Los ensayos con VIH-1 ponen en evidencia la potente actividad anti-VIH de las DEFA1-3, sin importar la cepa viral o célula blanco de que se trate.¹⁰¹

El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado (ver figura 28A) de los niveles de expresión obtenidos por qPCR-ARRAY muestran una distribución que no coincide con ninguna de las variables estudiadas. La misma observación se obtiene al analizar el gráfico del análisis de componentes principales (ver figura 28B). Dichos hallazgos de manera contraria a lo que pudiera pensarse, son indicativos de la heterogeneidad en los perfiles de

expresión en LLA previamente identificada,⁹⁶ de allí la dificultad de su estudio. Sin embargo, la heterogeneidad ilustrada pudiera tomar sentido al evaluar los cambios en los niveles de expresión en muestras de seguimiento y su asociación con eventos de respuesta al tratamiento, recaída o refracción. Por lo que, el estudio de los niveles de expresión de los genes identificados en las comparaciones realizadas, durante las etapas iniciales del tratamiento y tomando como referencia el nivel de expresión al momento del diagnóstico sin tratamiento, permitirá la selección y/o confirmación de los genes seleccionados en nuestro estudio, y aquellos previamente reportados, como marcadores pronóstico, además de que permitirá evaluar su eficacia como marcadores para el monitoreo de la enfermedad residual mínima en LLA. El seguimiento de los niveles de expresión y su análisis en conjunto pudieran arrojar resultados de su significancia, y reforzar la hipótesis de que un solo gen no aporta suficiente información diagnóstica, siendo necesaria la determinación de los niveles de expresión de un conjunto de transcritos.

El presente trabajo es el primero en México que estudia los niveles de expresión en pacientes con LLA empleando microarreglos de expresión génica. La importancia y trascendencia de los resultados radica en que la población estudiada es étnicamente diferente a la población estudiada en reportes de grupos en Estados Unidos y países europeos, y que en resultados no publicados por el grupo del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) muestran marcadores específicos de población mestiza de América, lo que desde el punto de vista farmacogenómico implicaría diferencias en las respuestas al metabolismo de fármacos con resultados excelentes en poblaciones étnicamente diferentes a la nuestra; por lo que es necesario el estudio de los genes identificados y propuestos en nuestro estudio para su evaluación como candidatos a marcadores pronóstico, además de marcadores para el monitoreo de la enfermedad residual mínima en poblaciones diferentes a la nuestra. Del mismo modo, la determinación de los niveles de expresión de los genes reportados como candidatos a marcadores (en poblaciones diferentes a la nuestra) por otros grupos de estudio y su asociación con la respuesta al tratamiento, permitirá determinar su eficacia en pacientes con LLA en nuestra población.

CAPITULO VII

5. CONCLUSIONES

1. La frecuencia y distribución de la leucemia linfoblástica aguda (de acuerdo a la edad y sexo) es igual a la reportada en la población de Estados Unidos y países europeos.
2. Se confirmó la sub-expresión del gen PAX5 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linaje T, aunque dicha sub-expresión también se presentó en algunos casos de linaje B.
3. Se identificó la sub-expresión significativa del gen PLCG2 en leucemia linfoblástica aguda de linaje T, aunque no fue exclusiva, ya que también se identificó sub-expresión y sobre-expresión en linaje B.
4. Los niveles de expresión diferencial del gen CDKN2A son muy variables y no son dependientes de la edad de presentación de la leucemia linfoblástica aguda.
5. La sub-expresión de los genes TMSL8 y WBP5 fue constante y significativa en adultos con leucemia linfoblástica aguda; aunque en el grupo de niños se presentó tanto sub-expresión como sobre-expresión, pero no fueron significativos.
6. No existen diferencias en los perfiles de expresión génica entre hombres y mujeres.
7. El gen FLT3 presentó sobre-expresión en pacientes con hiperdiploidía, mientras que el gen RGS1 mostró sub-expresión significativa en pacientes con hiperdiploidía y positivos para el cromosoma filadelfia.
8. El gen DEFA1-3 mostró sub-expresión significativa solamente en el grupo de pacientes con alto riesgo de recaída clínica, indicando por su papel antiviral la probable implicación de un agente viral como agente etiológico.
9. Se identificaron un conjunto de 5 potenciales nuevos genes marcadores para su uso pronóstico (PLCG2, TMSL8, WBP5, RGS1 y DEFA1-3) en leucemia linfoblástica aguda que no muestran asociación por edad ni sexo.
10. Se identificó a la vía Wnt- β Catenina constantemente alterada, e involucrada principalmente en la vía del desarrollo del sistema hematológico.

CAPITULO VIII

PERSPECTIVAS

Es necesaria la evaluación de los niveles de expresión de los genes identificados en éste estudio, en conjunto con genes identificados en otros estudios, como lo son: PAX5, CD58 y CASP8AP2, en muestras consecutivas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, para evaluar la eficacia de éstos como marcadores pronóstico de respuesta al tratamiento, y estratificar de manera temprana a pacientes con indicios de alto riesgo de recaída. El análisis de los niveles de expresión al momento del diagnóstico y a los 7 y 15 días de iniciado el tratamiento será crucial para la asociación a eventos de recaída; así también una vez excluidos y/o validados los marcadores, evaluar su utilidad para el monitoreo de la enfermedad residual mínima durante las etapas siguientes del tratamiento, y determinar la capacidad de los genes marcadores para identificar recaídas tardías.

Desde el punto de vista de investigación básica, sería muy interesante evaluar los niveles de expresión de genes involucrados en la respuesta antiviral, así como la identificación de secuencias virales en muestras de pacientes con LLA, con la idea de reforzar la hipótesis del agente viral como agente etiológico de ésta leucemia. También resulta interesante el estudio de la vía Wnt- β Catenina, que se encontró constantemente alterada en el análisis de vías, enfocándose a los mecanismos que conllevan a su alteración y cómo ésta se mantiene y contribuye al estado transformado e inmaduro de la LLA.

De manera general, se espera que de manera gradual y basado en resultados tangibles, se incluya el monitoreo molecular de la enfermedad residual mínima en LLA como una prueba rutinaria que sirva de base a los hemato-oncólogos para tomar decisiones en el tratamiento de los pacientes, permitiendo de ésta manera la inclusión de la nueva “medicina genómica” en nuestro país, al menos en el área hemato-oncológica.

BIBLIOGRAFIA

1. ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. Leukemia: Acute Lymphoblastic Annual Report 2005:1-12.
2. Society TLAL. Acute lymphocytic leukemia. White Plains, NY: The Leukemia and Lymphoma Society; 2005.
3. Gokbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology 2006:133-41.
4. Oh EJ, Kahng J, Kim Y, et al. Expression of functional markers in acute lymphoblastic leukemia. Leukemia research 2003;27(10):903-8.
5. Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Patterns of occurrence of the leukaemias. Eur J Cancer 1995;31A(6):941-9.
6. Wartenberg D, Groves FD, Adelman AS. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. In: Estey EH, Faderl SH, Kantarjian H, eds. Hematologic Malignancies: Acute Leukemias. 1 ed. Houston, Texas, USA: Springer; 2008:294.
7. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. Nature reviews 2006;6(3):193-203.
8. Swensen AR, Ross JA, Severson RK, Pollock BH, Robison LL. The age peak in childhood acute lymphoblastic leukemia: exploring the potential relationship with socioeconomic status. Cancer 1997;79(10):2045-51.
9. SEER Cancer Statistics Review, 1975 - 2003. National Cancer Institute, 2006. (Accessed at http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003.)
10. Hoelzer D, Gokbuget N. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. Critical reviews in oncology/hematology 2000;36(1):49-58.
11. Farhi DC, Rosenthal NS. Acute lymphoblastic leukemia. Clinics in laboratory medicine 2000;20(1):17-28, vii.
12. Zuelzer WW. Implications of Long-Term Survival in Acute Stem Cell Leukemia of Childhood Treated with Composite Cyclic Therapy. Blood 1964;24:477-94.
13. Greaves M. Childhood leukaemia. BMJ (Clinical research ed 2002;324(7332):283-7.
14. Hong D, Gupta R, Ancliff P, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. Science (New York, NY 2008;319(5861):336-9.
15. Pui CH. Childhood leukemias. The New England journal of medicine 1995;332(24):1618-30.
16. Takeuchi S, Koike M, Park S, et al. The ATM gene and susceptibility to childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia. British journal of haematology 1998;103(2):536-8.
17. Greaves M. A natural history for pediatric acute leukemia. Blood 1993;82(4):1043-51.
18. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. Blood 2002;99(10):3786-91.
19. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. Radiation research 1994;137(2 Suppl):S68-97.
20. Sandler DP, Shore DL, Anderson JR, et al. Cigarette smoking and risk of acute leukemia: associations with morphology and cytogenetic abnormalities in bone marrow. Journal of the National Cancer Institute 1993;85(24):1994-2003.
21. Ben-David Y, Bernstein A. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. Cell 1991;66(5):831-4.

22. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77(12):7415-9.
23. Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernst P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J. Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *British journal of haematology* 2001;114(3):539-43.
24. Brunning RD. Classification of acute leukemias. *Seminars in diagnostic pathology* 2003;20(3):142-53.
25. Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2003;98(7):1337-54.
26. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting -Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000;1(1):53-66.
27. Kebriaei P, Anastasi J, Larson RA. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best practice & research* 2002;15(4):597-621.
28. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 2004;350(15):1535-48.
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *British journal of haematology* 1981;47(4):553-61.
30. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood reviews* 2004;18(2):115-36.
31. WHO. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J, eds. *World Health Organization classification of tumours Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon; 2000:111-87.
32. Armitage JO, Abedi M, Albitar M, et al. *Atlas of Clinical Hematology*. Hagerstown, Maryland: Lippicott Williams & Wilkins; 2004.
33. Kanerva J, Saarinen-Pihkala UM, Riikonen P, Makiperna A, Mottonen M, Salmi TT. Reemphasis on lymphoblast L2 morphology as a poor prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Medical and pediatric oncology* 1999;33(4):388-94.
34. Miller DR, Leikin S, Albo V, Sather H, Hammond D. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *British journal of haematology* 1981;48(2):199-206.
35. Albitar M, Giles FJ, Kantarjian H. Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Estey EH, Faderl SH, Kantarjian H, eds. *Hematologic Malignancies: Acute Leukemias*. Heidelberg, Germany: Springer; 2008:119-30.
36. Peffault de Latour R, Legrand O, Moreau D, et al. Comparison of flow cytometry and enzyme cytochemistry for the detection of myeloperoxidase in acute myeloid leukaemia: interests of a new positivity threshold. *British journal of haematology* 2003;122(2):211-6.
37. Kees UR, Heerema NA, Kumar R, et al. Expression of HOX11 in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia can occur in the absence of cytogenetic aberration at 10q24: a study from the Children's Cancer Group (CCG). *Leukemia* 2003;17(5):887-93.
38. Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, et al. Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes, chromosomes & cancer* 2003;37(4):396-405.

39. Bertrand FE, Spengeman JD, Shah N, LeBien TW. B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* 2003;17(12):2454-9.
40. Ferrando AA, Look AT. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology* 2003;40(4):274-80.
41. Kohlmann A, Schoch C, Schnittger S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) gene expression signatures classify an independent cohort of adult ALL patients. *Leukemia* 2004;18(1):63-71.
42. Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA, et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3118-30.
43. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102(8):2951-9.
44. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer cell* 2002;1(2):133-43.
45. Willenbrock H, Juncker AS, Schmiegelow K, Knudsen S, Ryder LP. Prediction of immunophenotype, treatment response, and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia using DNA microarrays. *Leukemia* 2004;18(7):1270-7.
46. Pine SR, Moy FH, Wiemels JL, et al. Real-time quantitative PCR: standardized detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Polymerase chain reaction. J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25(2):103-8.
47. Schrappe M, Camitta B, Pui CH, et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(12):2193-4.
48. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best practice & research* 2002;15(1):37-57.
49. Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VH, San Miguel JF, van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukaemia patients. *The lancet oncology* 2001;2(7):409-17.
50. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995;85(6):1416-34.
51. Vidriales MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith E, Campana D. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best practice & research* 2003;16(4):599-612.
52. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best practice & research* 2002;15(1):1-19.
53. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998;351(9102):550-4.
54. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* 2003;101(5):1698-704.
55. Sugiyama H. Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leukemia & lymphoma* 1998;30(1-2):55-61.
56. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* 2002;16(10):2115-21.
57. Pongers-Willemse MJ, Seriu T, Stolz F, 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* 1999;13(1):110-8.
58. van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1991;198(1-2):93-174.
 59. de Haas V, Breunis WB, Dee R, et al. The TEL-AML1 real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) might replace the antigen receptor-based genomic PCR in clinical minimal residual disease studies in children with acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 2002;116(1):87-93.
 60. Chen X, Pan Q, Stow P, et al. Quantification of minimal residual disease in T-lineage acute lymphoblastic leukemia with the TAL-1 deletion using a standardized real-time PCR assay. *Leukemia* 2001;15(1):166-70.
 61. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999;13(12):1901-28.
 62. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318-57.
 63. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;96(8):2691-6.
 64. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(7):2399-402.
 65. Griesinger F, Piro-Noack M, Kaib N, et al. Leukaemia-associated immunophenotypes (LAIP) are observed in 90% of adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia: detection in remission marrow predicts outcome. *British journal of haematology* 1999;105(1):241-55.
 66. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952-8.
 67. Borowitz MJ, Pullen DJ, Shuster JJ, et al. Minimal residual disease detection in childhood precursor-B-cell acute lymphoblastic leukemia: relation to other risk factors. A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2003;17(8):1566-72.
 68. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *The New England journal of medicine* 1998;339(9):591-8.
 69. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TF. Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine* 1997;336(5):317-23.
 70. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet* 1998;352(9142):1731-8.
 71. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 1998;100(1):235-44.

72. Brisco MJ, Condon J, Hughes E, et al. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994;343(8891):196-200.
73. Feroni L, Coyle LA, Papaioannou M, et al. Molecular detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukaemia reveals differences in treatment response. *Leukemia* 1997;11(10):1732-41.
74. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, et al. Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 2002;99(4):1253-8.
75. Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, et al. Polymerase chain reaction (PCR)- and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 2002;119(3):685-96.
76. Marshall GM, Haber M, Kwan E, et al. Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(4):704-9.
77. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 1997;99(2):314-9.
78. van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia* 2002;16(8):1432-6.
79. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, et al. Molecular relapse can be detected in blood in a sensitive and timely fashion in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15(11):1801-2.
80. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science (New York, NY)* 1999;286(5439):531-7.
81. Mosquera-Caro M, Helman P, Veroff R, et al. Identification, validation and cloning of a novel gene (OPAL1) and associated genes highly predictive of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia using gene expression profiling *Blood* 2003;102(11).
82. Holleman A, den Boer ML, Cheok MH, et al. Expression of the outcome predictor in acute leukemia 1 (OPAL1) gene is not an independent prognostic factor in patients treated according to COALL or St Jude protocols. *Blood* 2006;108(6):1984-90.
83. Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;110(4):1271-7.
84. Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* 2006;108(3):1050-7.
85. Brisco J, Hughes E, Neoh SH, et al. Relationship between minimal residual disease and outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;87(12):5251-6.
86. Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gardner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95(3):790-4.
87. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446(7137):758-64.
88. Tiacci E, Pileri S, Orleth A, et al. PAX5 expression in acute leukemias: higher B-lineage specificity than CD79a and selective association with t(8;21)-acute myelogenous leukemia. *Cancer research* 2004;64(20):7399-404.
89. Zhang B, Tie LJ, Ye QD, et al. [Expression of the transcription factor PAX5 in childhood acute leukemic cells]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 2006;14(1):6-10.

90. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001;97(7):2115-20.
91. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1245-52.
92. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2003;19(2):185-93.
93. Gentleman R, Huber W, Carey VJ, Irizarry RA, Dudoit S. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor (Statistics for Biology and Health)*: Springer; 2005.
94. Kienle D, Benner A, Krober A, et al. Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood* 2006;107(5):2090-3.
95. Wang J, Coombes KR, Highsmith WE, Keating MJ, Abruzzo LV. Differences in gene expression between B-cell chronic lymphocytic leukemia and normal B cells: a meta-analysis of three microarray studies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2004;20(17):3166-78.
96. Kuchinskaya E, Heyman M, Grander D, et al. Children and adults with acute lymphoblastic leukaemia have similar gene expression profiles. *European journal of haematology* 2005;74(6):466-80.
97. Brown P, Levis M, Shurtleff S, Campana D, Downing J, Small D. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 2005;105(2):812-20.
98. Koga H, Imada K, Ueda M, Hishizawa M, Uchiyama T. Identification of differentially expressed molecules in adult T-cell leukemia cells proliferating in vivo. *Cancer science* 2004;95(5):411-7.
99. Te Kronnie G, Bicciato S, Franceschini L, et al. Validation by RQ-PCR and flow cytometry of alpha-defensin1-3 (DEFA1-3) overexpression in relapsed and refractory acute lymphoblastic leukemia. *Oncology reports* 2006;15(2):341-6.
100. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science (New York, NY)* 1986;234(4783):1563-6.
101. Zhang L, Yu W, He T, et al. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science (New York, NY)* 2002;298(5595):995-1000.
102. Buck CB, Day PM, Thompson CD, et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(5):1516-21.

ANEXOS

**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 respondan 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.

Análisis de Perfiles de Expresión Génica en Leucemia Linfoblástica Aguda

- 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: _____ Nº Registro: _____
 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,

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

O bien escribir un correo electrónico a:

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