

158



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

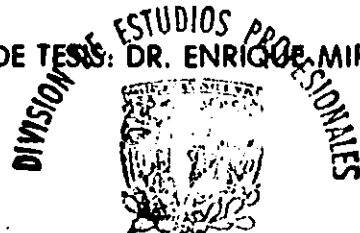
"ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL GEN MAGE B-2 EN PACIENTES ADULTOS CON LEUCEMIA AGUDA DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
IRMA OLARTE CARRILLO



DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE MIRANDA



MEXICO, D.F.

2002

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



SECRETARÍA NACIONAL
AZÚCAR Y SAL
SAZÓN

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Estudio de la expresión del gen *MAGE B-2* en pacientes adultos con Leucemia Aguda del Hospital General de México".

realizado por Irma Olarte Carrillo

con número de cuenta 9234700-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Enrique Miranda Peralta

Propietario

M. en C. Adolfo Martínez Tovar

Propietario

M. en C. Rosario Ortiz Hernández

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

M. en C. Juan José Montesinos Montesinos

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales
Jefa de la Unidad de Enseñanza
Departamento de Biología

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA



ESTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO DE S.S.A.
BAJO LA DIRECCIÓN DEL
DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA

6

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO GOCE DE LA BECA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA "CONACYT" COMO PARTE DEL APOYO AL PROYECTO EN EL PERIODO DE MARZO 2000 A FEBRERO 2001 POR LO CUAL HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO.

ESTE TRABAJO LO DEDICO A LAS SIGUIENTES PERSONAS:

✦ **A MI ABUELITA OLGA**

*Que aunque ya no este aquí para verlo
se que estará orgullosa, pues con su amor
y dedicación me impulso a llegar a esta meta. Gracias.*

✦ **A MI PADRE Y A MI MADRE**

*Por su gran sacrificio y su apoyo durante toda la vida.
Nunca acabaré de agradecerles.*

✦ **A MI ABUELO Y A MI TIA PATY**

Por sus consejos, ejemplo y amor brindado durante mi educación.

✦ **A MI HERMANO LEONARDO**

*Ya que sin su compañía, peleas y alegrías
que hemos compartido, no habría sido tan feliz.*

AGRADECIMIENTOS

- ↓ Deseo agradecer al Doctor. Enrique Miranda Peralta por su orientación académica y apoyo brindado.
- ↓ Al comité tutorial formando por el Doctor Enrique Miranda Peralta, el Doctor Luis Felipe Jiménez García, la M. en C. Rosario Ortiz, el M. en C. Adolfo Martínez Tovar y el M. en C. Juan José Montesinos por sus sugerencias y comentarios para mejorar la presentación del trabajo.
- ↓ Deseo agradecer muy profundamente al M. en C. Adolfo Martínez Tovar por su gran apoyo a la largo de la tesis y del trabajo experimental, así como sus consejos, por su paciencia y sobre todo por su amistad.
- ↓ Al profesorado de la Facultad de Ciencias que contribuyeron a mi formación académica.
- ↓ A mi gran amiga la Biol. Nidia Mendoza por estar conmigo en las buenas y en las malas y sobre todo por su cariño.
- ↓ A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias, Pedro, Erick, Gaby, Ivonne, y muy en especial a Héctor M. por todo lo vivido durante estos años.
- ↓ Mi agradecimiento a los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del HGM a Tere, Bertha, Silvia, Juan, Adolfo, Valentina y en especial a Lemy por su gran calidad humana y sobre todo por su amistad.
- ↓ Al profesor Mario Alberto Tamariz por gran cariño, apoyo incondicional en la realización de la tesis y sobre por ayudarme a sonreír.
- ↓ Agradezco a los Profesores; Marielena, Marcela, Mónica, Rubén, Omar, Fidel, Mari Juana y Alberto por sus enseñanzas en el primer paso en mi carrera; la docencia.
- ↓ Mi agradecimiento a todos los alumnos de IMEC por contagiarme de su alegría por la vida y por enseñarme que la juventud nunca termina. GRACIAS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
INDICE DE TABLAS.....	III
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 CÁNCER.....	2
2.2 INMUNIDAD CONTRA EL CÁNCER	3
2.3 PEPTIDOS ANTIGÉNICOS	5
2.4 FAMILIA MAGE.....	6
2.4.1. EXPRESIÓN DE LA FAMILIA MAGE	8
2.4.2. LOCALIZACIÓN DE LA FAMILIA	10
2.4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA MAGE.....	11
2.4.4. EXPRESIÓN DE LA FAMILIA EN NEOPLASIAS.....	13
2.5. LEUCEMIA	
2.5.1. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	14
2.5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS.....	15
2.5.3. INCIDENCIA DE LA LEUCEMIA.....	16
2.5.4. LEUCEMIA AGUDA.....	17
2.5.5. FRECUENCIA EN LEUCEMIA AGUDA.....	18
2.5.6. CUADRO CLÍNICO Y TRATAMIENTO.....	18
2.6. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. OBJETIVOS	
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	22

4 METODOLOGÍA

4.1 INCLUSIÓN DE PACIENTES.....	23
4.2 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE.....	23
4.3 ENSAYOS DE EXPANSIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	24
4.4 EXTRACCIÓN DE RNA.....	24
4.5 SÍNTESIS DE cDNA.....	25
4.6 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	25
4.6.1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	27
4.6.2. CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS.....	27
4.7 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.....	28
4.8 PURIFICACIÓN DEL GEN MAGE B-2.....	28
4.9 SECUENCIACIÓN DEL GEN.....	28
4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MAGE B-2 EN CÉLULAS NORMALES.....	30
5.2 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.....	33
5.3 EXPRESIÓN DEL GEN MAGE B-2 EN LEUCEMIA AGUDA.....	35
5.4 ANALISIS ESTADISTICO DE PACIENTES POSITIVOS Y NEGATIVOS.....	38
5.5 EXPRESIÓN DEL GEN MAGE B-2 EN LÍNEAS CELULARES ONCOHEMATOLÓGICAS.....	39
5.6 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN.....	40

6. DISCUSIÓN.....	42
-------------------	----

7. CONCLUSIONES.....	48
----------------------	----

8. PERSPECTIVAS.....	49
----------------------	----

9. APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	50
---	----

10. APÉNDICE B. DATOS CLINICOS.....	52
-------------------------------------	----

11. REFERENCIAS.....	57
----------------------	----

ABREVIATURAS

ATC	Antigenos testiculares de cáncer
cDNA	Acido desoxiribonucleico complementario
CPA	Células presentadoras de antígenos
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CTL	Linfocito T citotóxico
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxinucleotido trifosfato
EDTA	Acido etildiaminotetrácetico
FAB	Asociación Franco-Americana-Británica
LA	Leucemia Aguda
LAL	Leucemia Aguda linfoblástica
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
LGC	Leucemia Granulocítica crónica
LLC	Leucemia Linfocítica crónica
ORF	Open reading frame (Marco de lectura abierto)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
RT	Reverso Transcripción
TAP	Proteínas transportadoras

ABREVIATURAS

TBE	Tris- Borato- EDTA
µl	Microlitros
µg	Microgramos
pb	pares de bases
g	gramo
l	litro
min	minuto
rpm	revoluciones por minuto

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.....	4
FIGURA 2. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	7
FIGURA 3. DIAGRAMA DE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	9
FIGURA 4 LOCUS DE LA FAMILIA <i>MAGE</i>	10
FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL GEN <i>MAGE B-2</i>	12
FIGURA 6. RNA DE DONADORES NORMALES.....	31
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE β -2 <i>MICROGLOBULINA</i> EN CÉLULAS NORMALES.....	31
FIGURA 8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>MAGE B-2</i> EN NORMALES.....	32
FIGURA 9. RNA DE PACIENTES CON LEUCEMIA Y β -2 <i>MICROGLOBULINA</i>	32
FIGURA 10. PORCENTAJE DE PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	33
FIGURA 11. DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.....	34
FIGURA 12. DISTRIBUCIÓN DE LAS EDADES EN PACIENTES CON DIFERENTES INTERVALOS DE CLASE.....	34
FIGURA 13. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>MAGE B-2</i> EN PACIENTES CON LAL.....	36
FIGURA 14. EXPRESIÓN DEL GEN <i>MAGE B-2</i> EN PACIENTES CON LAM Y LC.....	37
FIGURA 15. EXPRESIÓN EN LINEAS CELULARES ONCOHEMATOLOGICAS.....	39
FIGURA 16 . SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>MAGE B-2</i>	41
FIGURA 17. LOCALIZACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO PARA EL GEN <i>MAGE B-2</i>	41

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES.....	6
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA.....	16
TABLA 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA LA PCR.....	26
TABLA 4. DATOS CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE RNA.....	31
TABLA 5. FRECUENCIA EN LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>MAGE B-2</i> EN LEUCEMIA.....	35
TABLA 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE PACIENTES POSITIVOS Y NEGATIVOS.....	38

1. RESUMEN

Los tratamientos que en la actualidad se ofrecen a pacientes con cáncer no ofrecen buenas expectativas de vida y debido a esto ocupa el segundo lugar como causa de defunción en nuestro país. El tratamiento actual de la Leucemia Aguda consiste esencialmente en un complicado e intensivo régimen de quimioterapia, radiación y en la actualidad trasplante de médula ósea. Aún con estos esquemas de tratamiento el pronóstico de curación para adultos es de tan solo un 20% y la mayoría de ellos fallecen. Lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de curación entre las que se encuentra la inmunoterapia, la cual tiene como objetivo estimular una respuesta inmune en el paciente evitando intolerancia a los tratamientos. Para poder llevar a cabo este proceso se requiere de la expresión de antígenos tumorales. Los antígenos *MAGE* tienen una alta frecuencia de expresión en neoplasias y están ausentes en tejidos normales, lo que asegura una respuesta inmune específica contra las células tumorales. En el caso de la leucemia existen muy pocos reportes sobre la expresión de éstos antígenos describiéndose la familia *MAGE A* y solo un reporte de la familia *MAGE-B*. En este trabajo se encontró expresado el gen *MAGE B-2* en pacientes adultos con leucemia aguda en un 9.3%; además se corroboró su ausencia en células normales y algunas líneas oncohematológicas. Comparado con reportes en donde su frecuencia de expresión es de 1/50 (2%), los resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre ésta familia y no se descarta que este gen o algunos de la familia *MAGE* puedan ser utilizados como candidatos en inmunoterapia.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER

En las células en proliferación, la progresión a través del ciclo está controlada por una compleja cascada de señales y de componentes reguladores. El sufrir alguna alteración a este nivel puede dar como resultado una célula maligna (Marshall, 1995).

La transformación maligna de algún tipo celular tiene como principal característica el crecimiento celular anormal. A nivel molecular las alteraciones genéticas y sus consecuencias bioquímicas iniciadoras del desarrollo de la transformación celular no se han determinado con toda precisión. Sin embargo, se han determinado algunas causas de dichas alteraciones: factores físicos como radiaciones ionizantes, exposición a ciertos compuestos químicos como el benceno o bien factores biológicos dentro de las que podemos mencionar algunas infecciones virales, mecanismos hereditarios y alteraciones en el sistema inmune. Estos factores son capaces de producir neoplasias malignas al provocar una serie de cambios a nivel genético que afectan la estructura o la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores (Berumen, 1999 ; Bech-Hanson, 1996).

En la actualidad el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de defunción en nuestro país y al parecer la cifra sigue en aumento. Los tratamientos actuales van desde elevadas dosis de quimioterapia, radiaciones y en mayoría de los casos llegan a alterar aún más a las células. Uno de los tratamientos que aún se

encuentran en las primeras etapas de investigación y han tenido éxito en algunos tipos de tumor es la inmunoterapia adoptiva, la cual consiste en la estimulación y activación del sistema inmune con el fin de destruir a la célula neoplásica.

2.2 INMUNIDAD CONTRA EL CÁNCER

Las células neoplásicas expresan moléculas en la superficie celular que pueden actuar como antígenos y estimular la respuesta del sistema inmune. A éstas moléculas se les ha denominado antígenos tumorales y son derivados de productos virales, proteínas celulares mutadas o de sobre-expresión de genes (Boon, 1991; Cheever, 1995)

Se ha observado que las células neoplásicas pueden inducir una respuesta celular; donde los LTC que reconocen los antígenos tumorales producto de cualquier proteína sintetizada dentro de la célula tumoral. La vía de presentación de antígenos consiste en la degradación de la proteína por el proteosoma (complejo de proteasas multicatalíticas) generando péptidos de 8 a 10 aminoácidos (Figura 1). Éstos péptidos inmunogénicos son transportados al Reticulo Endoplásmico donde se unen al Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) clase I. Normalmente las moléculas HLA clase I y el antígeno se exportan a la superficie celular tumoral donde es reconocido por los LTC's activando la secreción de citocinas y la activación de las señales coestimuladoras con el fin de aumentar la respuesta inmune (Celis, 1994; Riker, 1999).

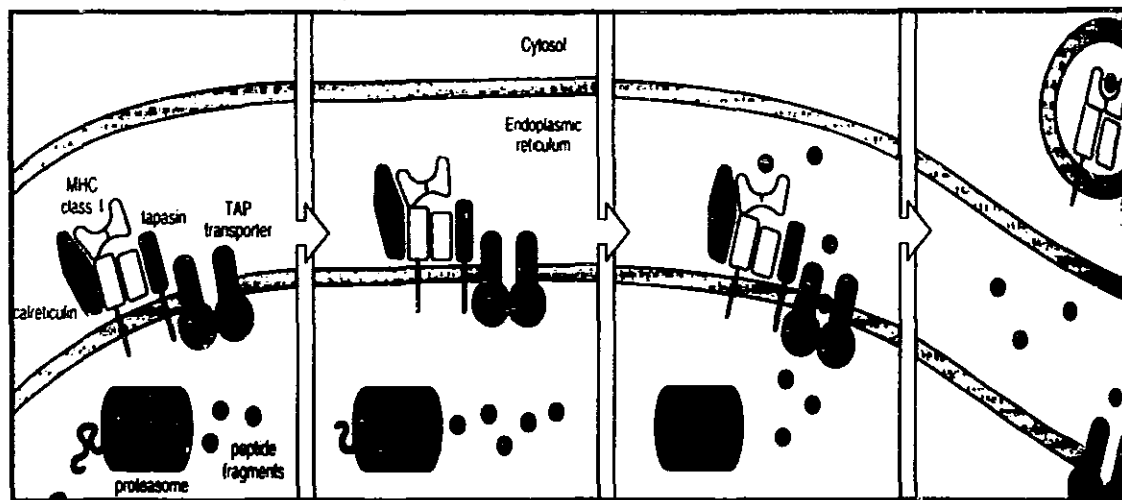


Figura 1. Procesamiento y presentación de antígenos por medio del complejo principal de histocompatibilidad.

Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos para evitar la activación de los LTC's. Estos mecanismos incluyen mutaciones o deleciones de los genes de $\beta 2$ -microglobulina, alteraciones que conducen a la expresión de moléculas transportadoras TAP-1 y -2 que generan moléculas clase I inestables incapaces de ser reconocidas (Stern, 1994). En algunos casos se ha observado que la sobre-expresión de ciertos genes como N-myc que influye en la disminución de moléculas de clase I (Weiss, 1994).

Se ha detectado la falta de expresión de moléculas del CPH (HLA) en las células transformadas. En muchos casos la baja respuesta puede deberse a la falta de expresión de las moléculas coestimuladoras; el caso más relevante está dado por las moléculas B7-1 y B7-2 que son el ligando para CD28 expresado en general en linfocitos T CD8⁺ y que permite su activación citotóxica. Asimismo se han observado defectos en la maquinaria transcripcional y la ausencia de B7-1 y B7-2 (Allison ,1995 ; Celis ,1994).

2.3 PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS

En los últimos años, se ha considerado la caracterización de antígenos tumorales codificados por genes asociados al tumor con el único objetivo de encontrar una terapia para obtener la regresión tumoral y posiblemente la respuesta completa (Rosenberg, 1996). Diversos tipos de inmunoterapia están basados en el uso de estos péptidos con resultados positivos preliminares (Tanzarella, 1997; 1999). La caracterización e identificación de antígenos tumorales en diversos tejidos han permitido clasificarlos en las siguientes categorías (Tabla 1).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES

- 1) Antígenos de diferenciación celular de melanocitos; *Tirosina*, *MART-1/Melan A*, *gp100*, *gp75* (Kawakami,1994, 1995; Castelli,2000) y mutaciones puntuales en melanoma : *CDK-4*, *B-catenina* (Dalerba,1998; Rivoltini,1998; Spagnolli,1995)
- 2) Antígenos de productos de genes supresores y oncogenes ej. *p53*, *p21^{ras}* (Chen 1998; Gnjatic,1998; 2000; Lim,2000)
- 3) Antígenos de proteínas resultantes de fusión o quiméricas con actividad tirosina -cinasa. ej *bcr-abl* (Lim,1999)
- 4) Antígenos virales ej. HPV, *E6,E7* ; EBV, *EBNA-1* (Mims,1996; Smith,1994)
- 5) Antígenos testiculares de cáncer (ATC) Expresión en células testiculares y células tumorales. ej. *MAGE*, *BAGE*, *GAGE*, *LAGE*, *NY-ESO 1*, *SCP-1* (Castelli,2000; Jäger,2000; Gnjatic,1998; De Baker,1999).

2.4 FAMILIA *MAGE*

Los genes de la Familia *MAGE* (Antígeno asociado a melanoma), pertenecen a la familia denominada Antígenos Testiculares de Cáncer (ATC) y son de gran interés para la inmunoterapia antitumoral pues son estrictamente específicos en tumores. Los antígenos son reconocidos por linfocitos T CD8⁺, acoplados al CPH clase I. La ausencia de la expresión en tejidos normales asegura una respuesta inmune contra el tumor (Lucas, 1998) .

Los primeros avances en inmunoterapia con éstos antígenos se iniciaron en melanoma, donde fueron descritos los genes *MAGE*. Se ha descrito que por si solo el LTC no es capaz de destruir a la célula tumoral posiblemente porque no se activen las señales coestimuladoras como B7.1 y B7.2 necesarias para la expansión clonal de los LTC.

La estimulación de los LTC's se ha logrado con la utilización de CPA por ejemplo las células dendríticas (Lotze,1997) a las cuales se les utiliza para la presentación del antígeno acoplado al CPH clase I y así aumentar la estimulación y activación de señales que permitan al LTC destruir a la célula cancerosa (Figura 2)(Klein, 2000; Itoh,1997; Mukeherji,1998; Nestle,1997).

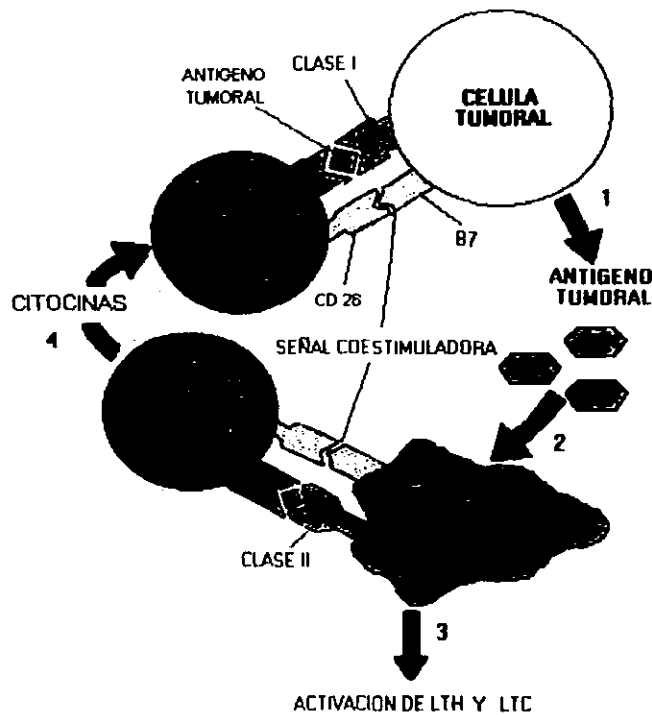
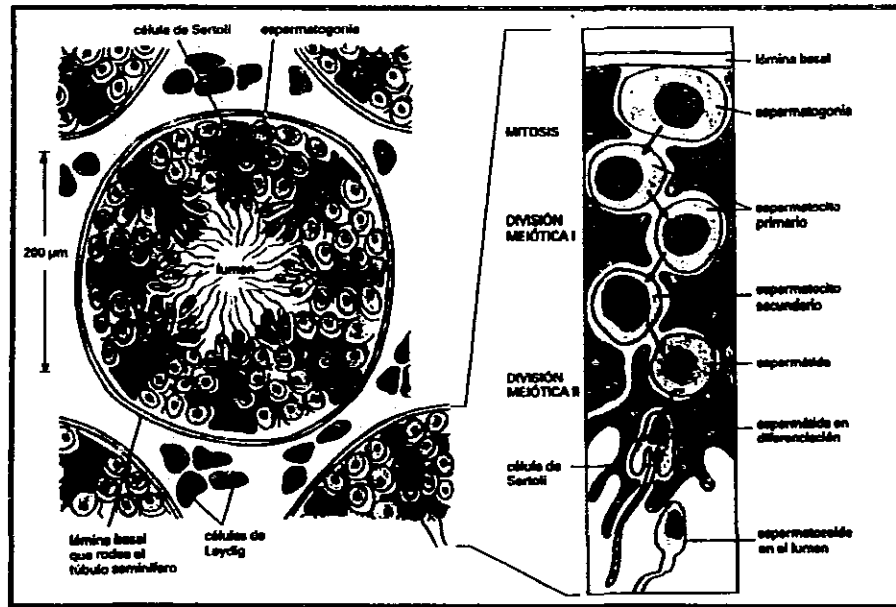


Figura 2. Para la activación del sistema inmune los antígenos tumorales han sido utilizados por las CPAs con el fin de aumentar la estimulación de los LTC's y destruir a la célula tumoral

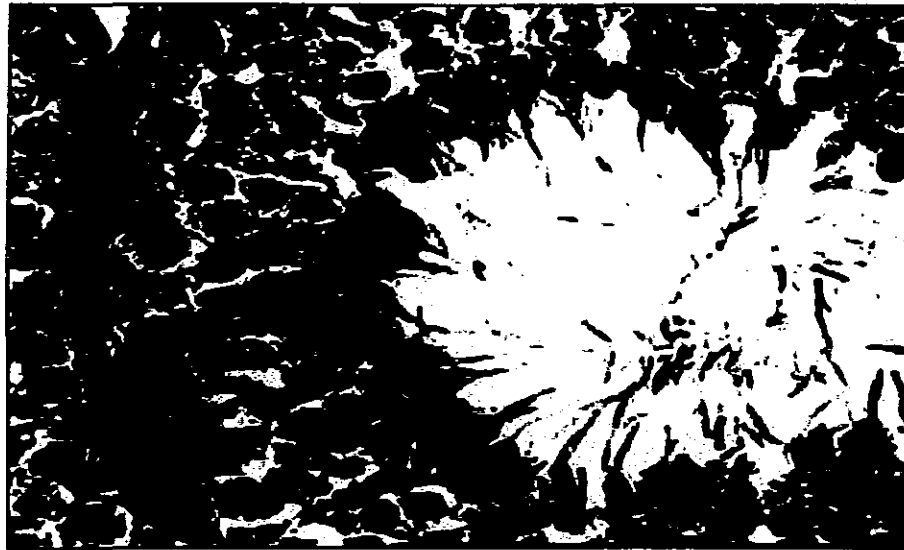
2.4.1 EXPRESIÓN DEL GEN

La expresión en testículo se restringe a las células germinales masculinas de la fase temprana de la espermatogénesis: espermatogonia y espermatocito I (Takahashi, 1995) sin embargo aunque estas células expresan el gen, carecen de CPH por lo que no son reconocidos por LTC's (Figura 3). La proteína se almacena a nivel citoplasmático. La forma en que se regula su expresión es a través de un mecanismo de metilación. Se conoce una región promotora llamada B' la cual controla el 90% de la transcripción del gen. Esta región normalmente se encuentra metilada sin embargo, en tumores esta región se desmetila por lo que la transcripción del gen se enciende (De Smet, 1996). Se han descrito genes homólogos en otras especies animales como caninos y roedores (Khatlani, 2000; Lee, 2000).

La función de los genes *MAGE* aún no se conoce con exactitud. Se tiene descrito que el gen *mage b4* (homólogo en ratón) es una proteína que se localiza en el núcleo y en el citoplasma de la espermatogonia y el espermatocito. Durante la meiosis la proteína actúa en el proceso de recombinación de los cromosomas homólogos en la fase de diploteno y posteriormente el gen se metila (Türeci, 1998; Österlund, 2000).



A



B

Figura. 3. (A) Diagrama de la espermatogenesis. (B) Corte histológico de tubos seminíferos en el cual se aprecian las espermatogonias y espermatocito I, únicas células en tejido normal donde se expresan los genes *MAGE*.

También se ha sugerido que los genes de ésta familia participan en la regulación del ciclo celular, especialmente durante el desarrollo de las células germinales se ha especulado que al metilarse el gen se detiene el ciclo celular (Ohman,2001). Lo anterior esta relacionado con el mecanismo de regulación de la transcripción en mamíferos sobre todo durante el desarrollo de éstos (Colum, 1999).

2.4.2 LOCALIZACIÓN DE LA FAMILIA

Los genes de la Familia *MAGE* fueron descritos por De Plaen en 1991 en Melanoma en donde según reportes tiene una frecuencia del 60% para esta neoplásia (Lurquin, 1997). Se encuentran localizados en el cromosoma X y comprenden seis familias hasta ahora descritas (Figura 4).

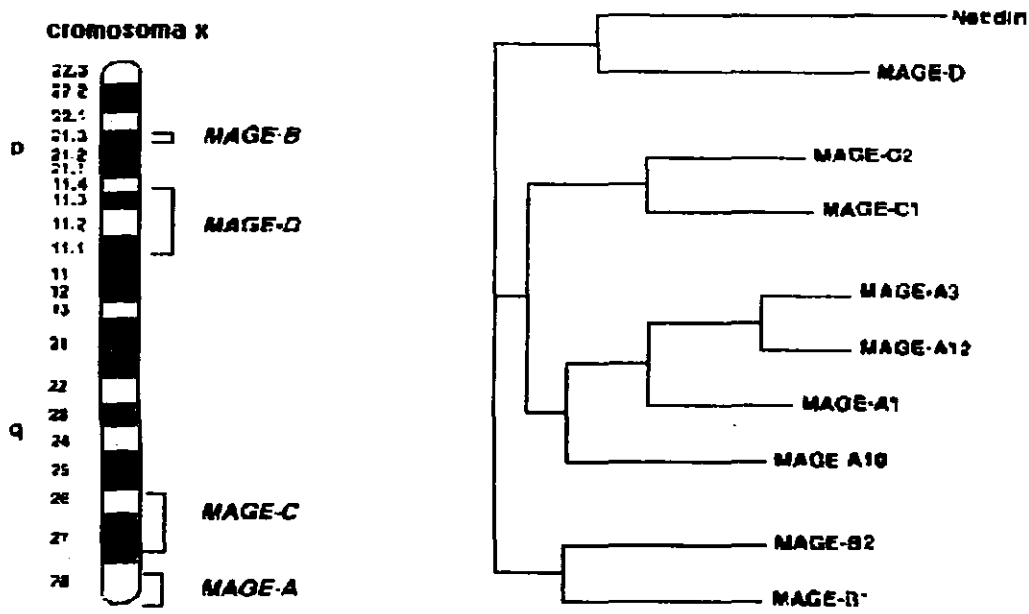


Figura 4. Localización de los genes de la Familia *MAGE*

2.4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *MAGE*

Familia *MAGE A*

La familia *MAGE A* se encuentra localizada en la región Xp28 (Rogner,1995), tiene una alta frecuencia de expresión en la mayoría de los cánceres y actualmente éste antígeno se ha utilizado en protocolos terapéuticos de vacunación -inmunoterapia- en pacientes con melanoma, obteniendo una regresión en este tipo de padecimiento sobre todo en estadios con mayor avance tumoral; de hecho, es mayor la frecuencia de expresión del gen en fases con gran avance tumoral que en pacientes de novo (Dalerba, 1998).

Recientemente se realizan ensayos utilizando células dendríticas generadas *in vitro* de progenitores hematopoyéticos con la finalidad de estimularlas con antígenos específicos para *MAGE A* (Mackensen,2000; Thurner , 1999, Osanto 2000). Las secuencias codificantes pronostican las mismas características estructurales para todas las proteínas *MAGE* sin embargo, los promotores y el primer exon en los 12 genes *MAGE* muestra una alta variabilidad, lo que sugiere su expresión bajo controles transcripcionales. Solo *MAGE-1,2,3,4,6,12* se expresan en diferentes cánceres, *MAGE 7* no se transcribe (De Plaen 1994). Estos genes codifican para proteínas de 309-319 aminoácidos con un peso molecular de 46 kd; carecen de secuencias de señales y contienen un pequeño dominio transmembranal que por su tamaño pequeño puede funcionar solo en asociación con el dominio de otra proteína.

Familia *MAGE B*

En la región Xp21.3 se localiza el segundo grupo o familia *MAGE-B* comprende 6 genes *MAGE B1, B2, B3, B4, B5, B6* (Muscatelli, 1995; Lurquin, 1997, Lucas, 2000). Los genes *MAGE B* comparten homología de alrededor del 65% con el *MAGE A*, sin embargo, todavía existe muy poca información sobre la expresión de estos genes en el humano. Presentan 4 exones cada uno, conteniendo un ORF en el último exon. El tamaño de las proteínas esta entre 313 y 347 aminoácidos. Existe un patrón de hidrofobicidad de proteínas *MAGE-A* y *B* sugiriendo una conservación en la conformación de la estructura tridimensional y por lo tanto en la función de las proteínas (De Plaen, 1994). El nivel de expresión del gen B3 y B4 no es suficiente para generar péptidos inmunogénicos, a diferencia de los genes B1, B2, B4, B5 que pueden generar respuestas inmunes (Lurquin, 1997).

McCurdy en 1998 describe el gen *MAGE Xp-2* el cual fue aislado de pacientes con lupus eritematoso (Figura 5) y es similar en su estructura a *MAGE-B2* (Lurquin, 1997).

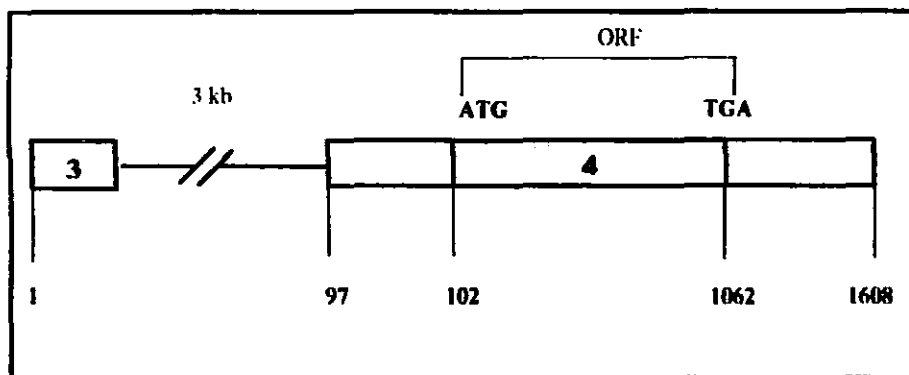


Figura 5. Estructura del gen *MAGE B-2* homólogo al gen *MAGE Xp-2*. El marco de lectura abierto se encuentra en el exon 4; el gen codifica para una proteína de 319 a.a.

Familias *MAGE C, D, E*

La Familia *MAGE C* se compone también de 4 exones y codifica para proteínas de ~ 1000 a.a. esta localizada en Xq26, al igual que las familias anteriores se expresan en varios tipos de tumores (Lucas, 2000).

A diferencia de las familias descritas anteriormente, *MAGE D* se expresa a nivel de mensajero en tejidos normales así como en líneas celulares de diferentes orígenes histológicos. Estos genes se localizan en Xp 11.3, constan de 14 exones y su proteína es de 606 aminoácidos, es homóloga en la parte COOH-terminal de la proteína *MAGE A1*. Existen además genes homólogos en ratón los cuales se ha encontrado expresión en células de Sertoli y de Leyding (Henuy,2000; Pold, 1999).

Recientemente se reportó el gen *MAGE-F1* el cuál se encuentra localizado en el cromosoma 3 y expresándose en diversas variedades de tumores y en la mayoría de tejidos fetales (Stone 2001).

2.4.4. EXPRESIÓN DE LA FAMILIA EN NEOPLASIAS

Se ha observado que varios tipos de tumores presentan al menos uno de los genes de la Familia *MAGE*. Entre los principales se encuentran cáncer de pulmón (Traversari, 1997); carcinoma gástrico (Li,1997; Sadanaga,1999; Kim,2001); melanoma (Dalerba,1999; Chen1999); carcinoma de esófago (Toh,1995; Nahgashima,2001); carcinoma hepatocelular (Liu,1999; Suzuki,1999; Tahara,1999; Kobayashi,2000); cáncer mamario (Fujie, 1997); carcinoma colorectal (Nishimura,1997); tumores de cuello y cabeza (Lee,1999); tumores cerebrales

(Kuramoto, 1997); osteosarcoma (Sudo, 1997) ; cáncer de ovario (Yamada, 1995) y mieloma (Van Baren 1999; Pellat , 2000) entre otros.

En el caso de la leucemia, existe controversia y escaso conocimiento ya que solo se cuenta con un reporte en el que se describe la expresión de *MAGE A* en leucemia linfocítica crónica (Shichijo, 1995) mientras que en otro estudio (Chambost, 1993) se reportó que *MAGE A* no se expresaba en ningún tipo de neoplasia hematológica.

2.5. LEUCEMIA

En 1846 Virchow introdujo en término de leucemia a un número elevado de glóbulos blancos en la sangre. Actualmente se le define como un tipo de cáncer que se caracteriza por un descontrol en la proliferación de cualquiera de las estirpes celulares del sistema hemapoyético. Este padecimiento se caracteriza por un descontrol en los mecanismos normales de proliferación, diferenciación y muerte celular que puede ocurrir en cualquiera de las etapas de maduración de las células hematopoyéticas . La desregulación de la proliferación ocurre por alteraciones de oncogenes, al igual que por la formación de genes quiméricos (Rosas, 1999; Miranda, 1997).

2.5.1. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La causa precisa de las leucemias se desconoce. La proliferación clonal por medio de divisiones sucesivas a partir de una célula progenitora constituye el origen de las leucemias. La activación de oncogenes *MYC*, *ABL*, *BCL-2* y *RAS* al igual que la formación de genes quiméricos como *BCR-ABL* (leucemia aguda linfoblástica o mielocítica crónica) o *PML-RAR-alfa* (leucemia aguda promielocítica),

probablemente son algunos de los factores genéticos que contribuyen a su desarrollo (Bleutler, 2001).

Es posible que la exposición a derivados del benceno desempeñe algún papel en desarrollo de la leucemia, así como la exposición a radiaciones ionizantes. Los agentes que dañan al DNA, como los alquilantes, pueden causar leucemias. Algunos virus entre los que podemos mencionar retrovirus como HTLV-1 y HTLV-II así como los padecimientos en los que hay inestabilidad cromosómica, como el Síndrome de Fanconi, pueden culminar con una leucemia aguda (Cortes, 1995).

2.5.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS

Las diversas variedades de leucemia que existen se distinguen en linfocítica o mielocítica según la estirpe celular involucrada y en agudas o crónicas dependiendo de la evolución clínica (Lee, 1994).

En 1976 con el fin de unificar el criterio de clasificación de ésta enfermedad se crea un sistema denominado FAB (Asociación Franco-Americana-Británica) la cual se basa en el diagnóstico morfológico, citoquímico, inmunológico y citogenético de los blastos medulares. Esta clasificación divide a las leucemias en: leucemias agudas (tres tipos de estirpe linfocítica y ocho de estirpe mielocítica) y en leucemias crónicas (linfocíticas y mielocíticas o granulocíticas) donde solo se han descrito dos tipos (Tabla 2) (Bleutler, 2001).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA

LEUCEMIAS AGUDAS		LEUCEMIAS CRONICAS
LINFOBLÁSTICAS	ESTIRPE LINFOIDE L1: Linfoblastos pequeños o típicos L2: Linfoblastos grandes o atípicos L3: Parecida al linfoma de Burkitt	LINFOCITICAS
MIELOBLÁSTICAS	ESTIRPE MIELOIDE M0: Mieloblastos diferenciados mínimamente M1: Mieloblastos inmaduros M2: Mieloblastos maduros M3: Promielocítica hipergranular M4: Mielomonoblástica M5: Monoblástica pura M6: Eritroleucemia M7: Megacarioblástica	MIELOCÍTICAS O GRANULOCÍTICAS

2.5.3 INCIDENCIA DE LA LEUCEMIA

Entre los diversos tipos de cáncer, las leucemias junto con los linfomas ocupan el primer lugar de incidencia en los pacientes pediátricos (Mejia,2000; Abdullaev, 2000). En adultos de sexo masculino ocupa el tercer lugar y en las mujeres adultas ocupan el sexto lugar . En los últimos años la frecuencia de la leucemia se ha triplicado en un 60%. Como en la mayoría de las alteraciones genéticas la frecuencia varía de acuerdo al grupo étnico o raza. En México, las leucemias crónicas son menos comunes que de las leucemias agudas, algo muy

diferente a lo que ocurre en los países anglosajones donde la leucemia linfocítica crónica es más frecuente (Pui, 1993)

Las leucemias crónicas se pueden observar a cualquier edad, pero en niños solo constituye el 3%; su frecuencia aumenta y predomina en adultos jóvenes o de edad mediana. Es más frecuente en varones que en mujeres (Pui, 1993). La evolución natural del padecimiento una vez que se detecta la forma clínica tienen una duración de aproximadamente 3 a 4 años en ocasiones más, pero siempre lleva al paciente a una fase final llamada blástica muy similar a la leucemia aguda y suele terminar con la vida del enfermo (Bleutler, 2001).

2.5.4 LEUCEMIA AGUDA

La leucemia aguda tanto linfoblástica como mieloblástica esta considerada como una enfermedad aún mas grave que cualquiera de las leucemias crónicas.

Se caracteriza por la aparición en sangre periférica o médula ósea de un número importante de blastos. Estas células malignas maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular es prolongado y la proliferación desordenada surge como una falla en los mecanismos de control de cualquiera de las células hematopoyéticas. Los mecanismos responsables devastadores de esta enfermedad se deben a la infiltración de las células malignas en el resto de los órganos (Lee, 1994).

2.5.5. FRECUENCIA EN LEUCEMIA AGUDA

La incidencia de la LAL es mayor en los primeros años de vida disminuyendo en los grupos de edades más avanzadas. La frecuencia relativa de los subtipos varía con la edad; en el caso de LAL pediátricos el 70% es L1, el 18% L2 y el 3% L3. En adultos el 67% de las LAL es L2 y esta cifra concuerda con la forma más agresiva de la enfermedad y un mal pronóstico.

En el caso de la leucemia aguda mieloblástica las variantes M0, M1 y M2 son responsables de cerca del 50% de los casos, la mielomonoblástica M4 y la promielocítica M3 del 25%; la monoblástica y eritroleucemia el 10% y la megacarioblástica M7 del 3% o menos (Lee, 1994).

2.5.6. CUADRO CLÍNICO Y TRATAMIENTOS ACTUALES

El pronóstico de la enfermedad en un paciente se define con la edad, sexo, estado nutricional, raza y alteraciones cromosómicas las cuales son útiles para determinar las posibilidades de supervivencia prolongada o curación. Clínicamente las variedades de leucemia difieren entre si con respecto al origen celular, evolución y respuesta al tratamiento (Lee, 1994). Los cuadros clínicos varían de un caso a otro no obstante es frecuente que los primeros síntomas sean la sudoración, falta de apetito, fatiga, epistaxis o sangrado de encías, dolores agudos y difusos en extremidades, esplenomegalia y crecimiento de los ganglios linfáticos, algunos de los signos que se detectan son la leucocitosis.

Los avances terapéuticos basados en radiaciones, quimioterapia y trasplante de médula ósea han permitido que en la actualidad obtengan la curación

la mayoría de los niños esto es, una remisión completa sostenida por más de 5 años (Fatih, 1998; Champlin, 1989).

El tratamiento actual de la LAL en adultos consiste en un complicado e intensivo régimen de quimioterapia (vincristina, prednisona, metotrexate por citar algunos) radiaciones y trasplantes de médula ósea, sin embargo las cifras de curación se encuentran por debajo del 20% y los adultos con LAL aún siguen presentando bajos rangos de sobrevida (Larson, 1997; 1998, Sobol, 1987).

En el caso de LAM los tratamientos actuales están acordes al tipo de LAM como en el tipo M3 en donde los esquemas terapéuticos están basados en el ácido trans-retinoico (ATRA) el cual induce la diferenciación del promielocito, este medicamento es capaz de alcanzar la remisión completa en el paciente con leucemia promieloblástica. Las combinaciones de quimioterapia incluyen inhibidores de la topoisomerasa II como etopósido y tenipósido que parecen ser útiles para este tipo de leucemia. Aún con estos tratamientos el nivel de sobrevida en los pacientes es muy bajo.

Uno de los tratamientos con los que se han obtenido resultados preliminares utilizando antígenos tumorales para activar al sistema inmune es la inmunoterapia adoptiva; la cual ha tenido éxito en algunos tipos de cáncer, sin embargo en leucemia se tiene poco conocimiento sobre los antígenos tumorales.

Se conocen algunos resultados preliminares de inmunoterapia utilizando células dendríticas con el antígeno *bcr-abl* (Choundhury, 1997; Pinilla, 2000), éste ha sido utilizado en la inducción de LTC's los cuales se ha visto son capaces de atacar *in vitro* a las células LGC (Cardoso, 1997).

2.6. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos con radiación, quimioterapia y trasplante de médula ósea en la leucemia aguda no ofrecen buenas expectativas de vida en pacientes adultos, pues la supervivencia libre de enfermedad no supera el 20%, teniendo en cuenta que los tratamientos son intensivos y que en la mayoría de los pacientes se presenta intolerancia al tratamiento (Lee,1995) una de las alternativas en la actualidad (no solo en leucemia sino en otro tipo de cáncer) es el uso antígenos tumorales; los cuales son utilizados para estimular una respuesta inmune en el paciente.

Los principales antígenos utilizados para este fin son los que pueden ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos - como los genes de la familia *MAGE*- y están ausentes en tejidos normales lo que asegura una respuesta inmune específica contra las células tumorales. Con el fin de aumentar la respuesta inmune algunos ATC, se utilizan CPA y que sean éstas las que presenten los antígenos a los LTC's (Brossart,2000).

Actualmente los genes *MAGE* se han utilizado para la inmunoterapia en melanoma en donde se han inyectado al paciente produciendo una regresión del tumor (Meckensen, 2000; Osanto 2000).

En los estudios realizados en expresión de genes de la Familia *MAGE*- A a nivel de mRNA se ha encontrado que los algunos genes de la familia A se expresan en 17 de 34 (50%) de leucemia de tipo T, 12/21 de tipo B y en 0/23 leucemia mielomonocítica (Shichijo,1995) y en posteriormente éste último autor reporta 1 paciente positivo en leucemia monocítica. En líneas celulares oncohematológicas se

ha encontrado expresión en K-562 (Serrano,1995) y HL60 (Chambost, 2000), Jurkat, SALT-3, HEL (Shichijo,1995).

Sin embargo la Familia B no esta descrita; en leucemia se cuenta únicamente con un reporte en donde se encuentra expresado el gen *MAGE B-2* en un paciente con esta neoplasia de 50 analizados y no se menciona la variedad de leucemia. Tampoco existen reportes en líneas celulares hematológicas para la expresión de éste gen (Lurquin ,1997).

Debido a que el gen *MAGE B-2* está descrito como el más inmunogénico de entre los genes *B1*, *B4* y *B5* cabe recordar que *B3* y *B6* no generan péptidos inmunes; nos hemos propuesto conocer si existe expresión del gen *MAGE B-2* en pacientes con Leucemia aguda y en líneas celulares hematológicas, así como su frecuencia de expresión, con el fin de que pueda ser utilizado como antígeno tumoral en la inmunoterapia contra la leucemia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

- Conocer la expresión de *MAGE B-2* en pacientes adultos con diagnóstico de Leucemia Aguda del Servicio de Hematología del HGM.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Confirmar la ausencia de expresión del gen en linfocitos de donadores normales.
- Conocer la expresión del gen *MAGE B-2* en diversas líneas celulares oncohematológicas.
- Conocer la frecuencia de expresión del gen *MAGE B-2* en LAL (leucemia aguda linfoblástica).
- Estudiar la expresión del gen *MAGE B-2* en diversas variedades de LAM (leucemia aguda mieloblástica).

4. METODOLOGÍA

4.1 INCLUSIÓN DE PACIENTES

Se incluyeron 43 pacientes adultos con el diagnóstico de Leucemia Aguda, con una edad de 17 años en adelante por un periodo de 1 año. El diagnóstico estuvo basado en el análisis citomorfológico, inmunológico y citogenético realizado en el Servicio de Hematología del Hospital General de México.

4.2 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica heparinizada de pacientes (internos del Hospital General de México) con diagnóstico de Leucemia Aguda aún sin tratamiento de quimioterapia para la separación de las PBMC y se capturaron los datos clínicos al momento de la obtención de la muestra.

Las muestras fueron procesadas mediante el método de gradiente de densidad (1.077) con Ficoll-Hypaque (Lymphoprep); centrifugando a 1500 rpm por 30'. Se obtuvo la fase de PMBC y se realizó un lavado con PBS. Se procedió a contar el número de células, así como la viabilidad con el método de azul de tripano, posteriormente se guardaron disolviendo el paquete celular en Trizol (Gibco BRL), se congelaron en Nitrógeno líquido y fueron criopreservadas a -70° C hasta su utilización.

Así mismo se obtuvieron PBMC de donadores normales y se les realizó la misma metodología que a las células de pacientes.

4.3 ENSAYOS DE EXPANSIÓN DE LÍNEAS CELULARES.

Las líneas celulares **Jurkat** (Leucemia Aguda de células T), **HL-60** (LAM-M3), **Molt-4** (LAL-T), **K-562** (LAM-M6), **U-937** (LAM-M5) y **Raji** se expandieron con RPMI-1640 (GiBCO) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15%, en una atmósfera de CO₂ al 5% y a 37°C. La expansión se realizó hasta obtener 8 x10⁶ millones de cada línea celular, guardándose a -70° C.

4.4 EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción se realizó mediante la Técnica de Trizol (Gibco-BRL) - cloroformo, alcohol isoamilico) siguiendo indicaciones del proveedor; para las líneas celulares, así como para las PBMC de pacientes con leucemia y para células normales.

A las células en Trizol (Gibco - BRL) se les agregó 200µl de cloroformo y se centrifugaron a 12,000g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se le adicionó 1 volumen de isopropanol incubando a temperatura ambiente por 10 min; después de la incubación se centrifugó bajo las condiciones anteriores. El pellet de RNA se lavó con etanol al 70%. Una vez obtenido el RNA se resuspendió en H₂O con y se determinó su pureza y concentración (lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm) y es almacenando a -70°C. Con una mínima parte del RNA se corroboró la presencia e integridad del mismo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio . El gel fue visualizado en un transiluminador observándose las bandas 18 y 28 S del RNA ribosomal.

4.5 SÍNTESIS DE cDNA

Para la síntesis de cDNA se realizó una reverso- transcripción en la cual se utilizó 1µg de RNA previamente extraído y cuantificado por espectrometría el cual se incubo con 1µl de oligo dT₁₂₋₁₈ (Gibco-BLR) agua destilada estéril a 70°C durante 10' posteriormente se introdujo en hielo durante 5'. La síntesis de cDNA se realizó durante 50' a 37°C en una mezcla que contenía 250mM de Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1MDTT, 10mM dNTP's y 200µl de M-MLV (GIBCO). El volumen final fue de 20µl.

4.6 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

La amplificación de cDNA para observar la expresión del gen, se llevo a cabo con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) analizando células de donadores normales, líneas celulares y muestras de pacientes con LAL y LAM. Para corroborar la expresión del gen en células testiculares se obtuvo una biopsia de tejido testicular normal obtenida de un paciente con diagnóstico de adenoma prostático. Esta biopsia fue congelada en nitrógeno líquido y fragmentada para posteriormente extraer RNA y sintetizar cDNA.

Los controles utilizados para la PCR en un inicio fueron las células testiculares y posteriormente en nuestros resultados la línea celular K562 (derivada de una LAM-M6) resulto positiva para *MAGE B-2*, por lo que en la expresión en pacientes fue utilizada como control positivo. Cabe hacer mención que ésta línea fue reportada como positiva para *MAGE A* (Serrano,1995).

Como control negativo se utilizaron células mononucleares de donadores normales. El protocolo a seguir fue estandarizado previamente ajustando las concentraciones de los reactivos (Tabla 3) y llegando a las siguientes condiciones: Buffer de PCR con 20mM Tris-HCl (pH 8) y 50mM KCl; 2mM de MgCl₂, 0.2μM de dNTP's, 30pm de cada primer sentido y antisentido, templado de cDNA 2μl, Taq DNA polimerasa 3.5 u, H₂O destilada estéril 80 μl, el volumen final fue de 100μl. La columna 6 fue la que se utilizó para la amplificación del gen .

TABLA 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA LA PCR DEL GEN *MAGE B-2*

REACTIVOS PCR	1	2	3	4	5	6
10x PCR buffer (GIBCO BRL)	8μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
200mM Tris-HCl	16mM	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
500mM KCl	40mM	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM
MgCl ₂ (GIBCO BRL)	2.4μl	2.4μl	3μl	3μl	3μl	3 μl
50mM	1.5mM	1.5mM	2 mM	2 mM	2 mM	2mM
DNTP's (Perkin Elmer)	1.5μl	1.5μl	1.5μl	2μl	2μl	2μl
10mM	150μM	150μM	150μM	200μM	200μM	200μM
Oligonucleotido sentido	0.5 15pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm
Oligonucleotido antisentido	0.5μl 15pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm	1μl 30pm
Templado cDNA	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl
Taq DNA polimerasa (GIBCO BRL)	0.5μl 2.5 U	0.5μl 2.5 U	0.5μl 2.5 U	0.5μl 2.5 U	0.6μl 3 U	0.7μl 3.5 U
Agua destilada	84.6μl	81.6μl	81μl	80.5μl	80.4μl	80.3μl
VOLUMEN FINAL	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl

4.6.1 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Los tubos se colocaron en un termociclador a 94°C por 40", 64°C por 30" y a 72°C durante 40" durante 35 ciclos. Se incubaron adicionalmente por 10" a 72°C y la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos se guardaron a -20°C hasta su utilización. Los oligonucleótidos utilizados para el gen *MAGE B-2* (McCurdy, 1998) que amplifican un producto de 230 pb. fueron los siguientes:

Sentido 5' CTG ACT TCC GCT TTG GAG GC 3'

Antisentido 5' GCA CCC CCA GAA ACA GAA GAG GAA CA 3'

Como control interno de integridad del RNAm se amplificó el gen *β -2 microglobulina* (397pb) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Sentido 5' ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA GCT 3'

Antisentido 5' CCT CCA TGA TGC TGC TGC TTA CAT GTC 3'

4.6.2. CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La concentración de los oligonucleótidos para el gen *MAGE B-2* y *β -2 microglobulina* y su temperatura de alineación se calculó de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Concentración de los oligonucleótidos:

$$Pm = (DO)(100) / (A + G)(14) + (T + C) (7)$$

Temperatura de alineación:

$$TM = (A + T) (2) + (C + G) (4) - 5$$

4.7 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

El análisis de productos de PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, a 100 V durante 1 hora. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV tomando fotografías de los geles con equipo Polaroid.

4.8 PURIFICACIÓN DEL GEN *MAGE B-2*

Se realizaron 6 reacciones de amplificación para el gen *MAGE B-2*, al producto de la reacción se le realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% teñido con bromuro de etidio, durante 30' a 60 V. La banda fue visualizada en el transiluminador y cortada; posteriormente purificada por medio de extracción de fenol - cloroformo guardándose a 4°C.

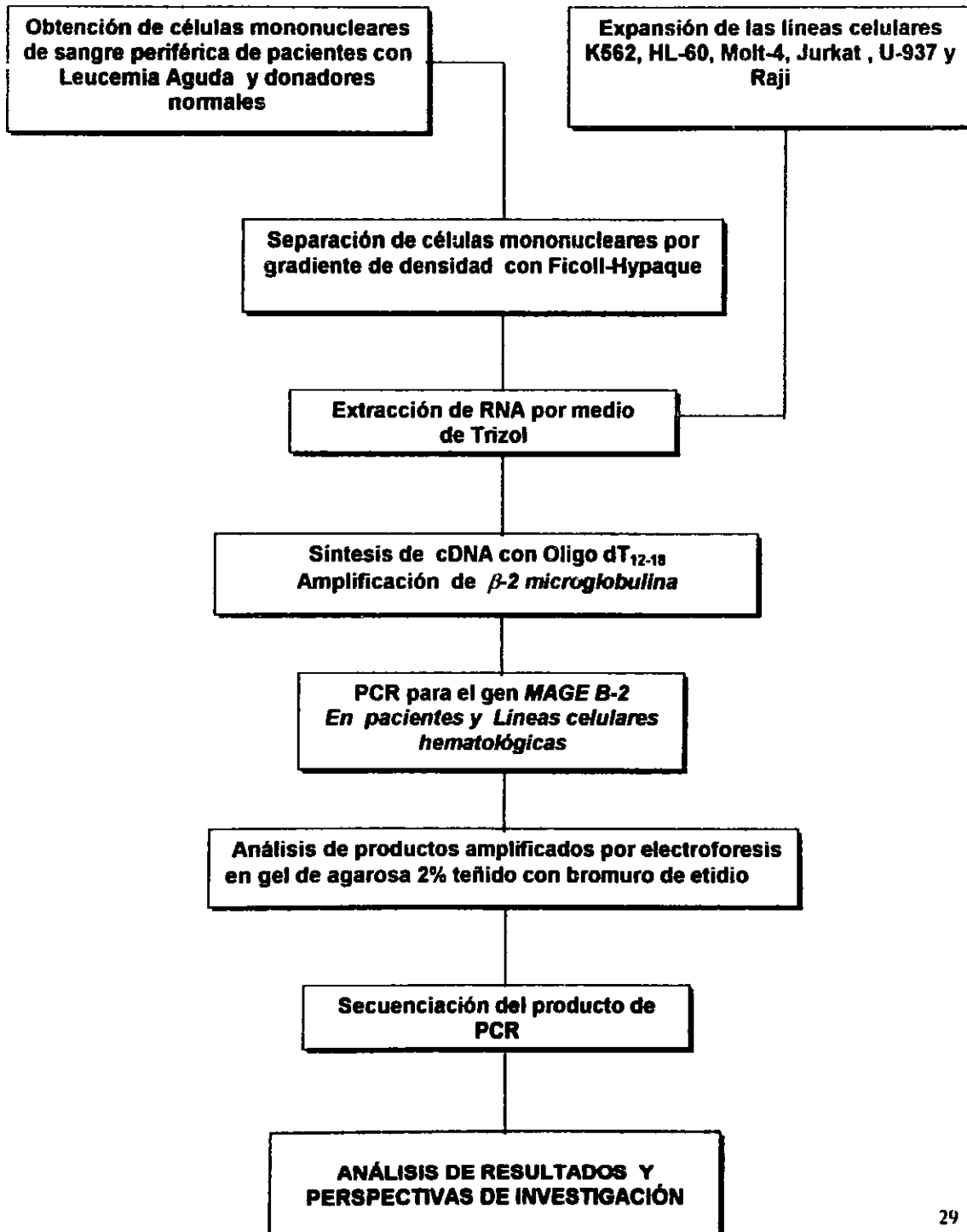
4.9 SECUENCIACIÓN DEL GEN

Los productos amplificados por RT-PCR se secuenciaron con el kit de secuencia *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing*. La secuencia fue alineada en el programa **BLASTN 2.1.3** del **GENE-BANK** para verificar el gen se estaba amplificando.

4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó una prueba de *T Student* con el fin de conocer si eran significativos los datos clínicos entre los pacientes positivos y negativos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *MAGE B-2* EN CÉLULAS NORMALES.

Se obtuvieron siete muestras de sangre periférica de donadores normales, de las cuales se separaron los mononucleares por el método de gradiente de Ficoll-Hypaque, el promedio de blastos en las ocho muestras fue de 9.3×10^6 . Para corroborar la ausencia de expresión en tejidos normales se utilizó una muestra de biopsia testicular, el tejido fue congelado con nitrógeno líquido y fragmentado.

Posteriormente se aisló el RNA (de células normales y testiculares) y se midió la concentración y pureza de cada muestra en un espectrofotómetro de luz UV (Tabla 4). El promedio total de la pureza fue de 1.76 estando dentro de los valores normales del RNA. En cuanto a la concentración promedio esta fue de $0.74 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ suficiente para llevar a cabo el análisis de RT-PCR. El RNA fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio durante 30 minutos a 100 Volts. Las dos bandas representativas del RNA 28S y 18S fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV (Figura 6).

TABLA 4. DATOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA DE DONADORES NORMALES

Donador	No. De Células en 20ml de sangre (10 ⁶)	260nm	280nm	Pureza 260 / 280	Concentración µg/µl	Vol. (µl) para 1 µg
1	10	.014	.011	1.2	0.28	3.6
2	8.5	.057	.028	2	1.14	1
3	13.2	.027	.013	2	0.54	2
4	6	.012	.008	1.5	0.24	4.2
5	8.2	.060	.036	1.6	1.32	0.8
6	9.3	.018	.011	1.8	0.36	3
7	11	.092	.042	2	1.84	0.54
8	8	.057	.028	2	1.24	1.17

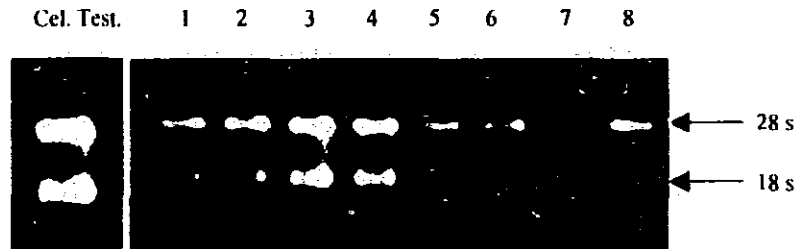


Figura 6. En la parte izquierda se muestra el RNA de las células testiculares, a la derecha los RNAs de donadores normales (carriles 1 a 8) visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se puede apreciar la banda y 18 S y 28 S del RNA ribosomal.

Para comprobar la integridad del RNA, se amplificó el gen de la *β-2 microglobulina* (gen de expresión constitutiva) mediante la técnica de RT-PCR (Figura 7).

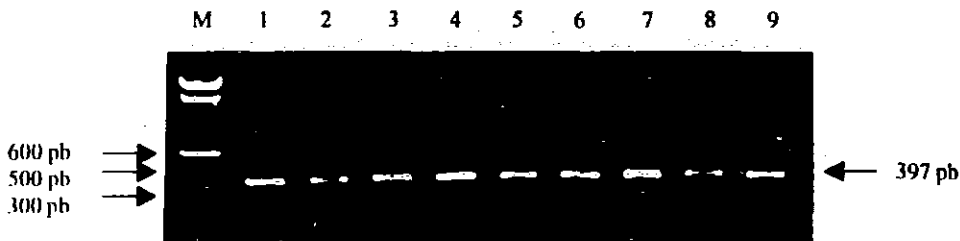


Figura 7. Expresión de *β-2 microglobulina* células testiculares (carril 1) y en células de donadores normales (carriles 2-9).

Una vez comprobada la integridad del RNA, se realizó la búsqueda de expresión del gen *MAGE B-2*, en los donadores normales y testiculares utilizando un par de oligonucleotidos (LQ1F como sentido y LQR1 como antisentido), que amplifican un fragmento de 230 pb. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Figura 8). La expresión del gen es ausente, con excepción de las células testiculares.

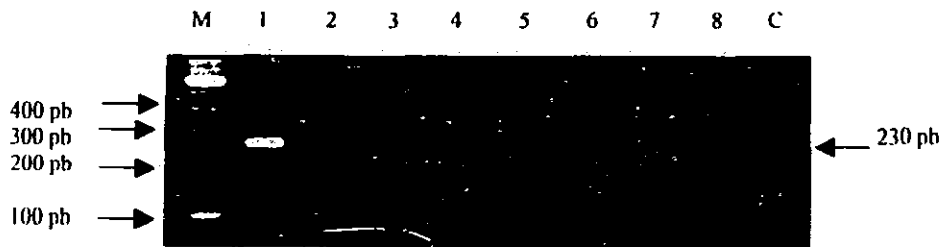


Figura 8. Análisis de la expresión de *MAGE B-2* en donadores normales. carril M, marcador de peso molecular; carril 1, células testiculares; carriles 2 al 8 linfocitos normales; carril C, control sin cDNA.

Las muestras de pacientes con leucemia fueron tratadas como ya se describió aislando RNA y comprobando su integridad para posteriormente realizar la PCR (Figura 9).

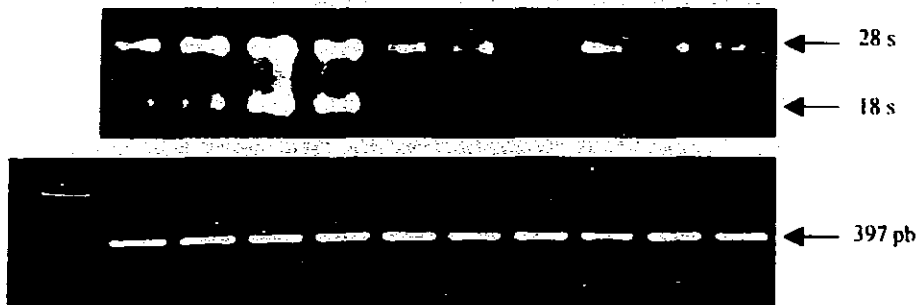


Figura 9. En la parte superior se muestran las bandas 18 S y 28 S de los RNAs de pacientes con leucemia. En la parte inferior se observa la expresión de β -2 microglobulina de los pacientes.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.

Se obtuvieron un total de 43 muestras de pacientes diagnosticados con Leucemia Aguda (32 LAL, 11 LAM). También se recolectaron los datos clínicos (tipo de leucemia aguda según la FAB, edad, número de blastos, leucocitos, hematocrito, hemoglobina y plaquetas) para evaluar alguna posible correlación. Aunque el estudio estuvo dirigido a Leucemia Aguda, también se incluyeron 5 muestras de Leucemia Crónica (4 LGC y 1 LLC) (Figura 10).

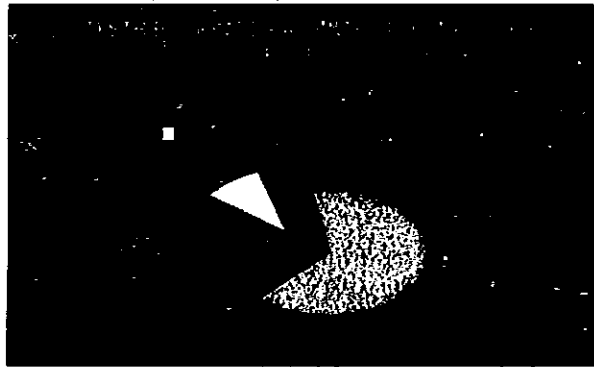


Figura 10. Porcentaje de pacientes incluidos en el estudio

Como puede apreciarse la mayoría de la muestra pertenece al tipo LAL (66%). Este grupo incluye 2 muestras de tipo L1, 29 de tipo L2 y 1 de L3 (Figura 11a). En el caso de LAM (24%) se incluyen 1 de M1; 4 de M2; 3 de M3; 1 de M4 y 1 de M5 (Figura 11b).

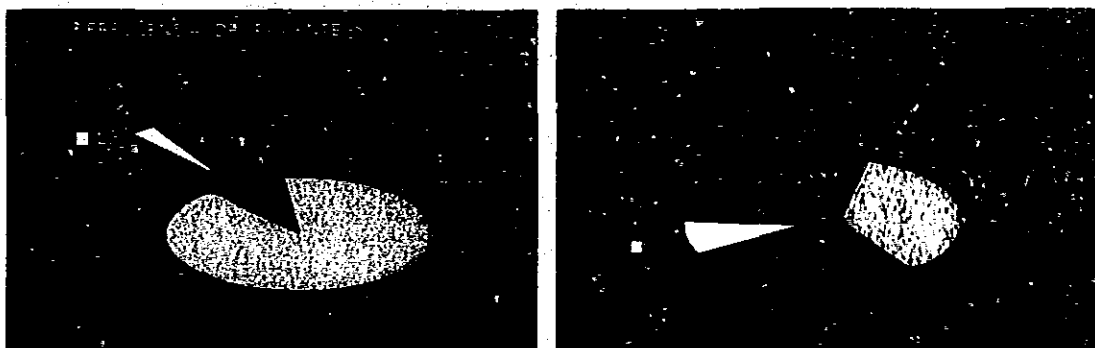


Figura 11. Distribución de los pacientes con Leucemia Aguda.
(a) Pacientes con LAL. (b) Pacientes con LAM.

Encontramos mayor frecuencia de LA en pacientes de entre 20 y 40 años es decir en adultos jóvenes; por encima de ésta edad la frecuencia disminuye. Lo anterior se ha observado en estudios anteriores para Leucemia Aguda (Figura 12).



Figura 12. Distribución de las edades en pacientes con LA mediante intervalos de clase.

El porcentaje de pacientes del sexo femenino fue del 53% y del masculino 46%. La media de edad de la población fue de 33 años y la mayoría de los pacientes presentaban más del 80% de blastos en sangre periférica característica de las leucemias agudas (Apéndice B).

5.3 EXPRESIÓN DEL GEN *MAGE B-2* EN LEUCEMIA AGUDA

Para el caso de LAL expresan *MAGE B-2* 1/29 del tipo L2. En el resto de los pacientes (L1 y L3) no se observó expresión alguna. Por lo tanto se puede decir que este gen se expresa a una frecuencia del 3.12% en Leucemia Aguda de estirpe linfoide (Figura 13). Los datos de expresión y frecuencia se observan en la Tabla 5.

TABLA 5. FRECUENCIA EN LA EXPRESIÓN DEL GEN *MAGE B-2* EN LEUCEMIA

Agudas	Variedad	Casos Positivos	Frecuencia ^a	Frecuencia ^b	Frecuencia ^c
Linfoide	L1	0/2	1/32 (3.12 %)	4/43 (9.3%)	5/49 (10.20 %)
	L2	1/29			
	L3	0/1			
Mieloide	M1	0/1	3/11 (27.27 %)		
	M2	2/4			
	M3	1/3			
	M4	0/1			
	M5	0/2			
Crónicas	L.C	1/5	1/5 (20 %)	1/6 (16.6%)	
	L.C	0/1	0%		

a. Frecuencia entre los tipos de Leucemia Aguda (LAL...LAM)

b. Frecuencia entre Leucemia Agudas y Crónicas

c. Frecuencia global entre todas las leucemias

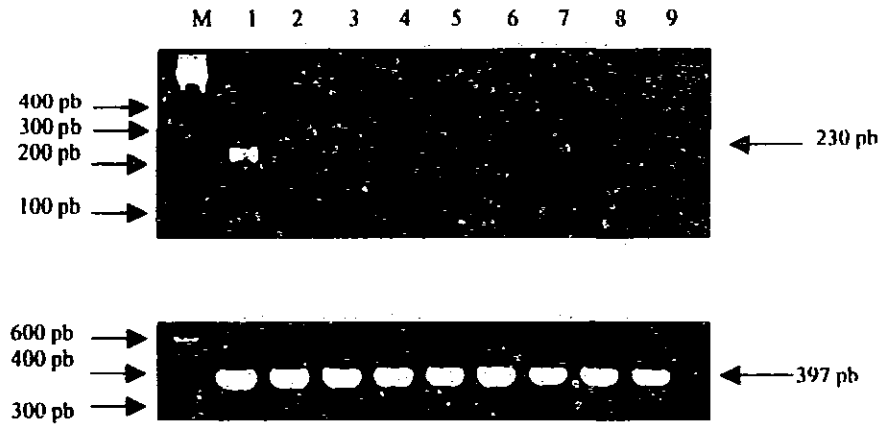


Figura 13. Análisis de la expresión de *MAGE B-2* en pacientes con leucemia aguda linfoblástica, carril M marcador de peso molecular, carril 1 línea celular K562 que amplifica un fragmento de 230pb, carriles 2 al 9, muestras de LAL. En la parte inferior la amplificación gen $\beta 2$ microglobulina.

Dentro de las variedades de leucemias agudas mieloblásticas los resultados fueron los siguientes: 0/1 de M1; 2/4 de M2; 1/3 de M3; 0/1 de M4 y 0/1 del tipo M5 (Figura 14). Aunque la muestra no es estadísticamente representativa se obtuvieron 3/11 pacientes positivos con LAM (un 27.27%, Tabla 5). Alternativamente se analizaron 5 leucemias crónicas, observándose expresión en 1/4 LGC y 0/1 LLC, aunque la muestra no es muy amplia se obtuvo una frecuencia del 20% (Figura 14).

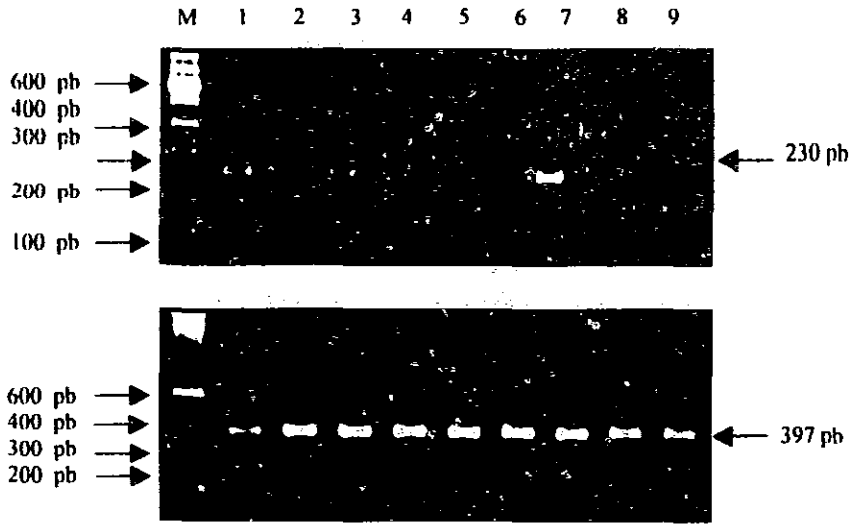


Figura 14. En la parte superior se muestra el análisis de la expresión de *MAGE B-2* en variedades de LAM y LC. Carril M marcador de peso molecular; carril 1 control positivo; carril 2, M1, carril 3, M2; carril 4, M3, carril 5, M4; carril 6 M5; carril 7, LGC; carril 8, LLC; carril 9 control sin cDNA. En la parte inferior amplificación de gen $\beta 2$ microglobulina que amplifica un fragmento de 397pb.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PACIENTES POSITIVOS Y NEGATIVOS

En cuanto al análisis estadístico se utilizó la prueba de distribución t (t student) donde se determinó una diferencia significativa entre los pacientes positivos y negativos en cuanto a edad. Como puede apreciarse en la tabla 6 las medias analizadas para los pacientes positivos son de 26 años y en los negativos 35 años y según el valor encontrado de t para 42 grados de libertad existe una diferencia significativa. Para el caso de carga tumoral en blastos y leucos no existió diferencia significativa entre los casos positivos y los negativos. A pesar de los resultados estadísticos con esta prueba no debemos descartar errores debido al tipo de estudio realizado y por el bajo número de pacientes positivos. Aún aunque en edad existen diferencias significativas podemos decir que no existe una correlación entre la presencia del gen *MAGE B-2* y los datos clínicos (Apéndice B).

TABLA 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE PACIENTES POSITIVOS Y NEGATIVOS PARA *MAGE B-2*

		\bar{x} s	Valor de distribución t	p = 0.005
Edad	positivos	26 ± 7.07	11.10	Con diferencia significativa
	negativos	35.23 ± 16.51		
Blastos	positivos	75.5 ± 13.32	-0.93	No significativo
	negativos	82.15 ± 17.52		
Leucos	positivos	1665 ± 116	-0.58	No significativo
	negativos	18885.38 ± 2957		

5.5 EXPRESIÓN DEL GEN *MAGE B-2* EN LÍNEAS CELULARES ONCOHEMATOLÓGICAS

En trabajos anteriores se había reportado expresión del gen *MAGE A* en las líneas celulares K562 (derivada de LGC en crisis blástica) y HL-60 (derivada de leucemia promielocítica LAM-M3). Sin embargo, en el caso del gen *MAGE B-2*, no observamos expresión alguna en HL-60. En contraste, la línea K562 lo expresa y no se observó expresión en la líneas Jurkat, Molt-4, U937 y Raji. (Figura 15)

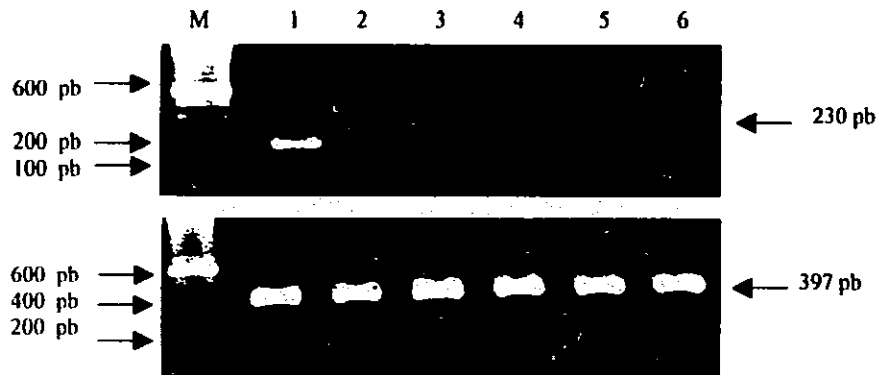


Figura 15. Expresión del gen *MAGE B-2* en líneas celulares derivadas de padecimientos hematológicos. carril M, marcador de peso molecular, carril 1 expresión del gen en la línea celular K562, del carril 2 al 6 ausencia de la expresión en Jurkat, Molt, HL-60, U937 y Raji. En la parte inferior la amplificación del control de $\beta 2$ microglobulina que amplifica un fragmento de 397pb.

5.6 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN

Con la secuencia del producto amplificado (Figura 16) se procedió a comparar a que gen pertenecía. Lo anterior se realizó en el programa BLASTN 2.1.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>) los resultados muestran que la secuencia corresponde al gen *Homo sapiens* antígeno de melanoma, familia B,2 (*MAGE B-2*) en un 119/124 (95.96%) de identidades (Figura 17) además el gen presenta homología con otros genes *MAGE* aunque en menor porcentaje de identidad, dentro de estos genes se encuentran *MAGE Xp-2* 118/124 (95.16%); *MAGE Xp22 72/79*(91.13%); *MAGE B1* 47/53 (88.67%). Como se puede apreciar la homología del gen *MAGE B-2* es muy alta con respecto a los de la Familia B de la cual forma parte. Además tiene una homología menor al 70% con otros genes como *DAM10*, *MAGE B3*.

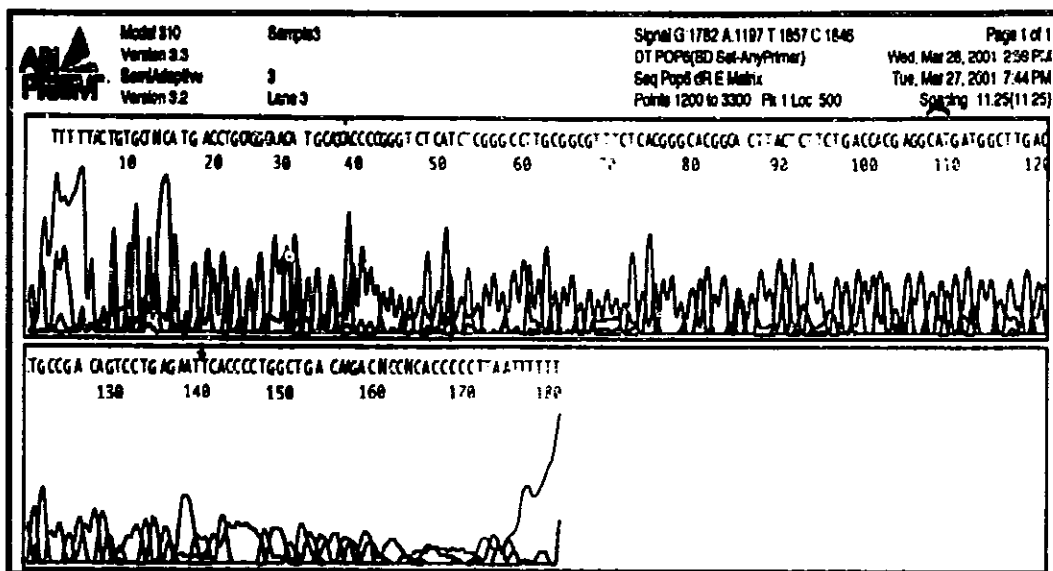


Figura 16. Secuenciación del gen *MAGE B-2*

Homo sapiens, MAGE, Familia B, 2

```

1 atcctgaact ccgctttgga ggcgaggacc cgagcgagtg taggggggtgc ggcgtctggt
61 cagccagggg tgaattctca ggactggctg gcagtcgaag catcatgctt cgtgggtcaga
121 agagtaagct ccggtgcccgt gagaaacgcc gcaaggcccg agatgagacc cgggggtctca
181 atgttcctca ggctactgaa gcagaggaag aagaggcccc ctgctgttcc tcttctgttt
241 ctggggggtg tgcttcaagc tctcctgctg ctggcattcc ccaggagcct caga agccc
301 caaccactgc cgctgctgag gctgcggtg ttcatccac aaaatctaaa aaaggtgcca
361 agagccacca aggtgagaaa aatgcaagt cctcccaggc ctcaacatcc actaagagcc
421 caagcgaaga tctctaac aggaagttag ggtcgttggg gcagttctctg ttgtacaagt
481 ataaaataaa aaagtccgtt acaaaggag aatgctgaa aattgttggc aaaaggttca
541 gggagcactt ccctgagatc ctcaagaaag cctctgaggg cctcagtggt gtctttggcc
601 ttgagctgaa taaagtcaac cccaacggcc acacttacac ctcatcgac aaggtagacc
661 tcaactgatga ggaatcccctg ctcaagtctt gggactttcc caggagaaag cttctgatgc
    
```

Figura 17. Localización del fragmento amplificado que corresponde al gen *MAGE B-2*.

6. DISCUSIÓN

El tratamiento de la Leucemia Aguda consiste esencialmente de un complicado e intensivo régimen de quimioterapia. Aún con los mejores esquemas de tratamiento las cifras de curación en adultos van de tan solo del 10 al 20 %. Es por eso la necesidad de buscar tratamientos alternativos que puedan brindar una mayor sobrevida en estos pacientes. La inmunoterapia es uno de los tratamientos basados en la activación del sistema inmune, los linfocitos T citotóxicos se encargan de reconocer células tumorales para su posterior destrucción (Champlin, 1989; Choudhury, 1997), este tratamiento se ha empleado en algunos padecimientos oncológicos. En melanoma el empleo de estos tratamientos en las fases terminales de la enfermedad han logrado una regresión del tumor de un 40 a un 60 % (Tanzarella, 1999).

Es necesario para realizar estos tipos de tratamientos la expresión de antígenos tumorales los cuales deben ser procesados y presentados en la superficie celular de la célula tumoral por las moléculas HLA clase I del complejo principal de histocompatibilidad para su posterior reconocimiento por los LTCs (Celis, 1994).

Los genes de la familia *MAGE* son de los más empleados en la inmunoterapia ya que solo se expresan en tumores y es ausente su expresión en tejidos normales (Castelli, 2000).

En cáncer de melanoma estos genes se encuentran expresados en un 60 % y en la actualidad en un 50 % en diferentes tumores desconociendo su expresión en Leucemia. A pesar de la importancia de la familia como antígeno tumoral aún no se conoce con exactitud la función de éste gen; pero se cree esta involucrado en la diferenciación de las células germinales metilándose en los sitios CpG dentro de promotores, mecanismo efectivo para silenciar genes (De Smeet 1996, 1999).

En éste trabajo se analizó la expresión del gen *MAGE B-2* en pacientes con leucemia Aguda, líneas celulares hematológicas y en células normales.

Mediante la técnica de RT-PCR se encontró expresión del gen *MAGE B-2* en un 9.3% en Leucemia Aguda y con mayor frecuencia en la leucemia de origen mieloide. Según Lurquin, 1997 existe expresión del gen en un 2% (1/50) de las leucemias analizadas sin embargo en su reporte no muestra una clasificación detallada de la FAB por lo que no es posible hacer una correlación entre el tipo de leucemia y su frecuencia de expresión.

La frecuencia detectada mediante RT-PCR para el caso de LAL fue de tan solo 3.12% comparando con LAM cuyo porcentaje fue del 27.27% se observa una clara diferencia; es interesante el hecho de que fue mayor el número de pacientes analizados con LAL (32) dentro de los que solo resultó uno positivo; a diferencia de la LAM en donde se obtuvieron pacientes positivos de 11. Según investigaciones recientes el antígeno *MAGE A* tiende a presentarse en leucemias de origen mieloide (Martínez. A, 2001), es claro que debemos aumentar el número de pacientes para este tipo de leucemia.

En el caso de LAL solo existió un paciente positivo y con esto podemos decir que existe una relación entre la presencia del antígeno y el linaje (linfoide o mieloide) hematopoyético de la célula.

En frecuencia general se obtuvo un 9.3 % que corresponde a 4/43 pacientes que expresaron el gen *MAGE B-2* en leucemia aguda (linfoide y mieloide). Esta expresión fue confirmada por secuenciación.

Como mencionamos en un inicio se incluyeron como algo alternativo 6 muestras de tipo crónico dentro de las que solo 1/5 fue positiva (LGC), aunque en la actualidad ya existen antígenos y terapias aplicadas a este tipo de leucemia no se descarta la posibilidad de que esta familia de genes *MAGE* pueda ser utilizada para inmunoterapia.

Los pacientes incluidos en el protocolo se captaron al diagnóstico para evitar alteraciones que pueda sufrir la expresión del gen después del tratamiento de quimioterapia. Es posible que durante el desarrollo de la neoplasia el gen modifique o aumente su nivel expresión; de hecho en algunas terapias de melanoma en donde se ha utilizado como antígeno los pacientes presentan un incremento en la respuesta de inmunoterapia sobre todo en aquellos que se encuentran con gran avance de metástasis (Tipo III ó IV) que en los que presentan un cáncer no invasivo. (Dalerba, 1998) y en pacientes de novo es muy baja la expresión (Osanto, 2000; Riker, 1999).

Estudios previos sobre el gen *MAGE A* encontraron expresión en pacientes con leucemia linfocítica crónica y en leucemia de células T (Shichijo, 1995) y aunque no muestran detalles sobre la clasificación es claro que la expresión se ve relacionada con el nivel de diferenciación en la que se encuentre la célula transformada; de tal forma que es bajo el nivel de expresión que se detecta en las células que inician la hematopoyesis o células progenitoras que en las células sanguíneas mayor grado diferenciación. Lo anterior tiene relación con la expresión del gen *MAGE B-2* en LAM donde encontramos pacientes positivos M2 donde la célula transformada se encuentra en el estadio de mieloblasto y también M3 donde la transformación maligna es a nivel de promielocito, es decir son células con un mayor grado de diferenciación.

En cuanto a la expresión del antígeno en donadores normales confirmamos que el gen *MAGE B-2* no se expresa en las células de los mismos y que la ausencia de expresión de éste gen en tejidos normales asegura una estricta respuesta inmune específica contra las células tumorales.

En el análisis de expresión en líneas celulares oncohematológicas se encontró positiva la línea K562. En reportes previos se encontraron positivas para el gen *MAGE A*, la línea HL60 (Chambost,2000), Jurkat, (Shichijo,1995) y K562 (Serrano,1995) siendo ésta última positiva para los genes *MAGE A* y *B*.

Sin embargo el hecho de que la línea HL-60 sea negativa no concuerda con los resultados en cuanto a los pacientes LAM-M3 que expresan *MAGE B-2*, posiblemente se deba a que dentro de la Leucemia promielocítica existan variantes.

Es necesario que se realice un seguimiento de los pacientes durante el desarrollo de su enfermedad para observar la relación que pueda existir entre el antígeno. Cabe la posibilidad de que *MAGE* pueda actuar como un marcador pronostico en el desarrollo de la enfermedad, ya que como se ha descrito, pacientes que presentan el antígeno en estadios avanzados tengan mejor respuesta al tratamiento de inmunoterapia.

Nuestros resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre ésta familia de antígenos tumorales con el fin de utilizarlos en diversas terapias contra el cáncer. Aunque la frecuencia en la expresión del gen *MAGE B-2* es muy baja para que pueda ser utilizado en la inmunoterapia, el estar presente en pacientes con leucemia abre nuevas opciones de investigación como el realizar un seguimiento en el paciente; pues cabe la posibilidad de que el gen *MAGE B-2* pueda servir como un marcador durante la evolución de la enfermedad.

Además la descripción realizada en este trabajo sobre líneas celulares, da como resultado el que se pueda contar con una línea celular positiva (K562) para utilizarla como en control en la expresión del gen *MAGE B-2* en investigaciones posteriores.

7. CONCLUSIONES

- ◆ Con este estudio se comprueba la expresión del gen *MAGE B-2* en Leucemia Aguda y en sus variedades según la FAB, pues como se sabe existía un solo estudio para esta neoplasia.

- ◆ La ausencia de este antígeno en células mononucleares de donadores normales indica su expresión exclusiva en procesos tumorales.

- ◆ Se aportaron datos sobre la expresión en líneas celulares ya que no se contaba con ningún reporte para este gen, determinando como positiva la línea celular K562.

- ◆ Dentro de los pacientes adultos con LAL la frecuencia en la expresión del gen *MAGE B-2* es baja, lo cual indica que posiblemente no sea buen candidato para la Inmunoterapia adoptiva en éste tipo de Leucemia.

- ◆ La frecuencia en la expresión de este gen en Leucemia Aguda Mieloide (M2 Y M3) y Leucemia Granunocítica Crónica (LGC) es mayor que la de LAL por lo que en la estirpe mieloide podría ser un candidato para utilizarlo en inmunoterapia.

- ◆ Es necesario ampliar el número de muestras de LAM y Leucemias Crónicas, pues en actualidad se desconoce un marcador antigénico para éstas.

8. PERSPECTIVAS.

- ❖ Lo resultados abren expectativas en cuanto al análisis de nuevos Antígenos Testiculares de Cáncer para la Leucemia Aguda Linfoblástica debido a su baja frecuencia de expresión.

- ❖ Es necesario aumentar el número de muestras de tipo LAM y Leucemias Crónicas para buscar la expresión del gen *MAGE B-2* y pueda ser utilizado como antígeno en un futuro en la inmunoterapia adoptiva.

- ❖ Realizar el seguimiento de los pacientes durante el desarrollo de su enfermedad para observar su relación que pueda existir entre la expresión del antígeno y el avance de la neoplasia.

9. APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SEPARACIÓN DE PBMC

FICOLL- HYPAQUE

9.8 g de Ficoll
 60 ml medio de contraste
 Ajustar a densidad de 1.077-1.078
 Aforar a 100ml con agua destilada , esterilizar y guardar a 4°C

AZUL DE TRIPANO

Azul de tripano.....0.3mg
 Agua destilada..... 50ml
 Filtrar y alicuotar. guardar a temperatura ambiente

PBS (Buffer de fosfatos salino)

NaCl2.74M
 KCl..... 53.6M
 MgCl₂..... 1M
 Na₂HPO₄..... 166mM
 KH₂PO₄..... 29.4mM
 Aforar a 1 litro en agua destilada, esterilizar y guardar a 4°C

EXTRACCIÓN DE RNA POR ISIOTICIONATO DE GUANIDINA / FENOL

Isioticionato de guanidina..... 4.2 M
 Citrato de Sodio..... 0.025 M, pH 7
 Sarkosyl..... 0.1 M
 Aforar a 50 ml. esterilizar y add 500µl de β-mercaptoetanol

Fenol saturado a pH 8
 Isopropanol
 Etanol 80%

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

BUFFER DE CORRIDA PARA TBE 10X pH=8.3 (Tris 890mM, Boratos 890mM, EDTA 20mM)

EDTA (Sigma).....7.4g
 Tris Base (Sigma).....108g
 Ácido Bórico(Sigma).....55g
 Ajustar el pH= 8.3 y aforar a 1000ml con agua destilada y esterilizar

SOLUCIÓN DE CORRIDA PARA ELECTROFORÉSIS

Para 10ml:

Azul de bromofenol (Sigma)0.025g
 Xylene cyanole (Biorad).....0.025g
 Glicerol (Merck).....3.0 ml
 Agua destilada.....10 ml
 Mezclar bien y filtrar utilizando membrana de 0.45µm, conservar a 4°C

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH= 8.0)

Mezclar los siguientes volúmenes:

Tris 1M, pH= 8.0.....1.0ml

EDTA 0.5M,pH=8.0.....0.2ml

Aforar a 100ml con agua destilada y esterilizar

ACETATO DE AMONIO 4M

10. APÉNDICE B

DATOS CLÍNICOS

DATOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE MUESTRAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA

	NOMBRE DEL PACIENTE	260nm	280nm	pureza	Concentración µg/µl	 para 1 µg
1	Diana López Hernández	0.077	0.038	2	1.5	0.66
2	Fabián Flores Anguiano	0.037	0.027	1.7	0.94	1.2
3	Adela Rosas	1.18	0.011	1.8	0.36	3
4	Alberto Méndez Méndez	0.021	0.011	2	0.42	2.3
5	Alejandro Villa Moreno	0.015	0.007	2	0.3	3.3
6	Anastasia Rojas Luna	0.106	0.042	2.5	2.12	0.5
7	Andrés Cruz Villalba	0.007	0.004	1.6	0.14	7
8	Antonio Pérez Clemente	0.033	0.017	1.9	1.3	0.75
9	Arturo Hernández castillo	0.01	0.006	1.6	0.2	5
10	Constantina Pérez Medina	0.104	0.056	1.85	2.08	0.5
11	Consuelo Pérez León	0.007	0.003	2	0.14	7
12	Daniel Granados Pérez	0.02	0.01	2	0.04	2.5
13	Gregoria Benítez Mata	0.005	0.002	1.8	0.1	10
14	Guadalupe López Montes	0.217	0.112	1.93	4.34	0.13
15	Inés Alonso Téllez	0.04	0.02	2	0.8	1.25
16	Jonathan Ayala López	0.008	0.011	0.8	0.16	6.3
17	Jorge Castro Mejía	0.005	0.002	1.8	0.1	10
18	Juan Carlos Rosales Escamilla	0.008	0.011	0.8	0.16	6.3
19	Juan Hernández Hernandez	0.048	0.037	1.3	0.96	1
20	Juana Chávez Rogel	0.104	0.056	1.85	2.08	0.5
21	Juana Gaytán García	0.057	0.028	2	1.14	1
22	Leticia Luis Pérez	0.005	0.002	1.7	0.1	10
23	Ligorio Vargas Hitario	0.014	0.011	1.2	0.28	3.6
24	Lourdes Rodríguez	0.033	0.017	1.9	1.3	0.75
25	Noe Coronel Olivares	0.073	0.04	1.8	1.46	1
26	Oscar Negrete Chávez	0.048	0.037	1.3	0.96	1
27	Patricia García Cruz	0.012	0.008	1.15	0.24	4.2
28	Rafael Vázquez	0.021	0.011	1.8	0.42	2.38
29	Raúl Zuñiga Cordero	0.021	0.011	2	0.42	2.3
30	Rosa Ma. Pastor German	0.096	0.052	1.8	1.92	0.5
31	Sandra Alarcón Mata	0.007	0.003	1.8	0.14	7
32	Ana De la Cruz Jiménez	0.04	0.018	2.2	0.8	1.25
33	Marcos Aguilar Avila	0.037	0.027	1.7	0.94	1.2
34	Consuelo Gómez Andón	0.027	0.13	2	0.54	2
35	Laura Morales Pérez	0.03	0.015	2	0.6	1.6
36	Margarita Rocha Hernández	0.271	0.157	1.7	5.42	0.2
37	Victor Manuel García Aguilar	0.024	0.012	2	0.048	2.08
38	Ana María Zavala Contreras	0.021	0.011	2	0.42	2.3
39	Claudia Rubalcava Vázquez	0.06	0.036	1.6	1.32	0.8
40	Sergio Rodríguez Vilchis	0.037	0.027	1.7	0.94	1.2
41	Teodoro Gómez Lechuga	0.065	0.032	1.9	1.3	0.76
42	Elvia Plata Hernández	0.01	0.006	1.6	0.2	5

43	M5	0.006	0.003	1.9	0.12	8
44	Jorge García Izquierdo	0.015	0.007	2	0.3	3.3
45	Guadalupe Pedroza Jiménez	0.006	0.003	1.9	0.12	8
46	Vicente Barrientos	0.015	0.007	2	0.3	3.3
47	Felipa Zepeda Ballinas	0.024	0.012	2	0.048	2.08
48	Miguel Espinoza	0.021	0.011	2	0.42	2.3
49	Carlos Chacón Villanueva	0.037	0.027	1.7	0.94	1.2
	PROMEDIO	0.066	0.025	1.8	0.85	3.10

DATOS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA DE LÍNEAS CELULARES

	Cel. en 20ml de sangre	260nm	280nm	pureza	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	[] para 1 μg
K562	10×10^6	0.342	0.171	2	6.84	0.2
Jurkat	8×10^6	0.279	0.014	1.9	5.58	0.2
Molt	7.5×10^6	0.325	0.162	2	6.5	0.2
HL-60	6×10^6	0.029	0.017	1.7	0.58	1.7
U937	8×10^6	0.015	0.008	1.8	0.3	3.5
RAJI	6×10^6	0.037	0.027	1.7	0.94	1.2

DATOS CLÍNICOS DE PACIENTES CAPTADOS CON LEUCEMIA

	NOMBRE	EDAD	Dx	Blastos	Leucos	Hto	Hb	Plaquetas
1	Diana López Hernández	29	LAL-L1	90	15000	6.9	28.3	26000
2	Fabián Flores Anguiano	39	LAL-L1	91	5300	5.5	16.6	60000
3	Adela Rosas	25	LAL-L2	90	6500	6.5	18.6	3000
4	Alberto Méndez Méndez	17	LAL-L2	82	35000	4.3	18.9	3500
5	Alejandro Villa Moreno	17	LAL-L2	93	8500	9.5	28.6	6000
6	Anastasia Rojas Luna	65	LAL-L2	92	3000	5.1	32.5	1500
7	Andrés Cruz Villalba	52	LAL-L2	80	1300	5.5	16.3	74,000
8	Antonio Pérez Clemente	67	LAL-L2	60	8600	6.5	11.2	8500
9	Arturo Hernández castillo	37	LAL-L2	38	4800	11	32.5	55300
10	Constantina Pérez Medina	17	LAL-L2	30	65000	10	18.3	7000
11	Consuelo Pérez León	24	LAL-L2	92	1300	5.5	16.3	74,000
12	Daniel Granados Pérez	25	LAL-L2	90	3000	5.1	15.3	70,000
13	Gregoria Benitez Mata	71	LAL-L2	96	6000	6.4	8.6	6000
14	Guadalupe López Montes	36	LAL-L2	100	87000	4.5	35.8	2500
15	Inés Alonso Téllez	43	LAL-L2	62	2800	7.6	21.4	9000
16	Jonathan Ayala López	16	LAL-L2	90	14,600	5.9	36.8	55000
17	Jorge Castro Mejía	54	LAL-L2	91	10,000	6.9	34.9	95,000
18	Juan Rosales Escamilla	36	LAL-L2	92	1500	4.6	16	6000
19	Juan Hernández Hernandez	40	LAL-L2	92	6900	9	16.3	75000
20	Juana Chávez Rogel	30	LAL-L2	90	12300	2.4	11.2	56300
21	Juana Gaytán García	41	LAL-L2	80	3600	6.5	26.5	5000
22	Leticia Luis Pérez	19	LAL-L2	95	55600	3.6	15.6	11,500
23	Ligorio Vargas Hilario	34	LAL-L2	90	2500	7.6	29.6	84000
24	Lourdes Rodríguez	24	LAL-L2	93	5000	5.6	9.6	9500
25	Noe Coronel Olivares	35	LAL-L2	77	56,300	3.7	11.2	11,200

26	Oscar Negrete Chávez	32	LAL-L2	82	3900	6.6	22.3	56000
27	Patricia García Cruz	20	LAL-L2	84	4500	5.6	17.6	65000
28	Rafael Vázquez	19	LAL-L2	92	121,000	11	30	3000
29	Raúl Zuñiga Cordero	28	LAL-L2	95	1100	3.2	29.4	3000
30	Rosa Ma. Pastor German	28	LAL-L2	95	1200	3.1	6.9	65000
31	Sandra Alarcón Mata	20	LAL-L2	90	1200	9.2	35.6	63000
32	Ana De la Cruz Jiménez	33	LAL-L3	63	7400	9.5	14	39,000
33	Marcos Aguilar Avila	26	LAM-M1	65	3360	4.5	13.3	56,000
34	Consuelo Gómez Andón	45	LAL-M2	80	600	7.5	21.3	7000
35	Laura Morales Pérez	19	LAL-M2	70	1400	2.4	8	13,000
36	Margarita Rocha Hernández	65	LAL-M2	87	700	3.2	9.5	12,000
37	Víctor Manuel García Aguilar	22	LAL-M2	65	3360	4.5	13.3	56,000
38	Ana María Zavala Contreras	35	LAM-M3	72	700	3.5	16.3	32,000
39	Claudia Rubalcava Vázquez	24	LAM-M3	80	1400	12	37	16,000
40	Sergio Rodríguez Vilchis	26	LAM-M3	92	61,100	11.6	34	47,000
41	Teodolfo Gómez Lechuga	56	LAM-M4	83	90000	6.2	32.4	9000
42	Elvia Plata Hernández	15	LAM-M5	72	9200	5.3	28.6	7500
43	m5	72	LAM-M5	93	8500	8.7	11.7	11000
44	Jorge García Izquierdo	40	LGC	97	10000	6.8	16.3	70000
45	Guadalupe Pedroza Jimenez	23	LGC	95	8200	3.6	15.2	2500
46	Vicente Barrientos	24	LGC	90	7500	8.5	12.2	46000
47	Felipa Zepeda Ballinas	26	LGC	88	5300	6.9	32.4	35000
48	Miguel Espinoza	65	LGC	95	3400	6.4	11.5	8000
49	Carlos Chacón Villanueva	72	LLC	96	36,100	10.9	35.1	92,000

EDAD EN INTERVALOS DE CLASE DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

EDAD	TIPO DE LEUCEMIA							
	L1	L2	L3	M1	M2	M3	M4	M5
15-19	0	6	0	0	1	0	0	1
20-29	1	8	0	1	1	2	0	0
30-39	1	7	1	0	0	1	0	0
40-49	0	3	0	0	1	0	0	0
50-59	0	2	0	0	0	0	1	0
60-69	0	2	0	0	1	0	0	0
70-79	0	1	0	0	0	0	0	1
TOTAL	2	29	1	1	4	3	1	2

INTERVALOS DE CLASE POR SEXO			
HOMBRES		MUJERES	
EDADES	PACIENTES	EDADES	PACIENTES
15-19	4	15-19	4
20-29	5	20-29	8
30-39	6	30-39	4
40-49	1	40-49	3
50-59	3	50-59	0
60-69	1	60-69	2
70-80	0	70-80	2
TOTAL	20	TOTAL	23

DATOS ESTADISTICOS

PARAMETROS ESTADISTICOS DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA

	Edad	Blastos	Leucos	Hb	Hto	plaquetas
Pacientes Positivos						
X media	26	75.5	1665	3.375	11.125	41,500
Mediana	25	71	1300	3.3	10.65	44,000
Rango	19-35	65-95	700-3360	2.4-4.5	6.9-16.3	13,000-65000
Amplitud	16	30	2660	2.1	9.4	52000
Desviación Estandar	7.07	13.32	1167.71	0.87	4.43	23558.43798
Varianza	50	177.66	1363566.6	0.76	19.70	555000000
Pacientes negativos						
X media	35.23076	82.15384	18855.38462	6.6615	22.14358	31007.69231
Mediana	32	90	6000	6.4	18.9	11500
Rango	15-72	26-100	600-121000	2.4-12	8.6-36	1500-95000
Amplitud	57	74	120400	9.6	27.4	93500
Desviación Estandar	16.51866	17.52222	29576.3748	2.459	9.133	29568.55
Varianza	272.8663	307.0283	874761946.6	6.0487	83.42620	874299149.8

DISTRIBUCION t (t STUDENT)

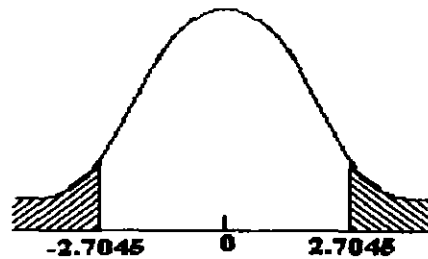
		\bar{x}	s	Valor de distribución t	p = 0.005
Edad	positivos	26 ±	7.07	-11.10	Con diferencia significativa
	negativos	35.23 ±	16.51		
Blastos	positivos	75.5 ±	13.32	-0.93	No significativa
	negativos	82.15 ±	17.52		
Leucos	positivos	1665 ±	116	-0.58	No significativa
	negativos	18885.38 ±	2957		

g.l 42
prueba bilateral (2 colas)

Area de Rechazo 

Area de Aceptación 

$H_0 = \bar{X} \text{ Negativos} = \bar{X} \text{ positivos}$
 $H_a = \bar{X} \text{ Negativos} \neq \bar{X} \text{ positivos}$



Nivel de significancia: Para todo valor de probabilidad igual o menor a 0.05 se acepta H_0 y se rechaza H_a .

Zona de rechazo: Para todo valor de probabilidad mayor a 0.05 se acepta H_a y se rechaza H_0 .

Edad . El valor calculado $t = -11.10$ cae dentro de la zona de rechazo para H_0 por lo tanto podemos decir que hay una diferencia significativa entre la edad de los pacientes negativos y positivos.

Blastos Según el valor calculado $t = -0.93$ se encuentra en la zona de aceptación de H_0 es decir, no hay diferencia significativa entre los blastos de pacientes que expresan *MAGE B-2* y los que no lo expresan.

Leucos Al igual que en los blastos el valor de $t = -0.58$ cae en la zona de aceptación de H_0 por lo que no se encontraron diferencias significativas entre positivos y negativos.

11. REFERENCIAS

1. Abdullaev FI, Rivera-Luna R, Roitenburd-Belacoriu V, Espinosa-Aguirre J. Pattern of Childhood Cancer Mortality in Mexico. *Arch Med Res.* 2000;31(5):526-531.
2. Allison RW. Treatment of primary breast cancer--lessons from a screening program? *Med J Aust.* 1995;162(1):51-57.
3. Bech-Hanson NT, Till Je, Ling V: Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cell: Cross-resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* 1996, 88: 23.
4. Bleutler E, Lichman M, Coller B, Kipps T. *Williams Hematology.* 6 Edición. MG Hill. New York, 2001.
5. Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordonez RM, Aguirre J, Martinez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutierrez M, Martinez A, Gariglio P. Molecular epidemiology of high-incidence cancers in Mexico *Gac Med Mex.* 1997;133 (1):35-41.
6. Boon, T., J.-C. Cerottini, P. Van Der Bruggen, and A. Van Pel. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol* 1991; 12: 337-365.
7. Brinkmann O, Vasmatazis A, Byungkook Lee, Noga Yerushalmi, Magnus Essand, and Ira Pastan. *PAGE-1*, an X chromosome-linked *GAGE*-like gene that is expressed in normal and neoplastic prostate, testis, and uterus 1998 ; 95 (18) 10757-10762.
8. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000 ;96(9):3102-8.
9. Buhring HJ, Kanz L Approaches to dendritic cell-based immunotherapy after peripheral blood stem cell transplantation. *Ann N Acad Sci* 1999;72 (2) 363-71.

10. Cardoso A, Seamon MJ, Alfonso HM, Ghia P, Boussiotis VA, Freeman JG, Sallan SE, Nadler LM: Ex vivo generation of human anti pre-B leukemia specific autologous cytotoxic T cells. *Blood* 1997; 90 (2):549-61.
11. Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G, T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000;182 (3):323-31.
12. Celis E, et al. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(6): 2105-2109.
13. Colum P. Walsh, and Timothy H. Bestor . Cytosine methylation and mammalian development 1999;13(1) 26-34.
14. Cortes JE, Kantarjian HM: Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* 1995; 76 (12):2393-2417.
15. Chambost H, Brasseur F, Coulie P, de Plaen E, Stoppa AM, Baume D, Mannoni P, Boon T, Olive D . A tumour - associated antigen expression in human hematological malignancies. *Br J Haematol* 1993;84(3): 524-526.
16. Champlin R, Gale RP: Acute lymphoblastic leukemia: recent advances in biology and therapy. *Blood* 1989;73(4):2051-2060.
17. Cheever MA, Disis ML, Bernhard H, Gralow JR, Hand SL, Huseby ES, Qin HL, Takahashi M. Immunity to oncogenic proteins. *Immunol Rev.* 1995;145(2):33-5.
18. Chen J, Ali O, GüreSolam Tsang¹, Elisabeth Stockert Elke Jäger, Alexander Knuth, and Lloyd J. Old Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library 1998; 95 (12): 6919-6923.

19. Choudhury A, James L. Gajewski, Jan C. Liang, Uday Popat, David F. Claxton, Kay-Oliver Kliche, Michael Andreeff, and Richard E. Champlin Use of Leukemic Dendritic Cells for the Generation of Antileukemic Cellular Cytotoxicity Against Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 1997; 89(4):1133-1142.
20. Dalerba P, Ricci A, Russo V, Rigatti D, Nicotra M, Mottolese M. High Homogeneity of MAGE, BAGE, GAGE, Tyrosinase and Melan-A/Mart-1 gene expression in clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma: Implications pour protocol design of therapeutic antigen-specific vaccination strategies. *Int.J.Cancer* 1998; 77(2): 200-204.
21. De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 1999; 59(13):3157-3165.
22. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gafori JJ, Szikora JP, Brasseur F. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of MAGE Family. *Immunogenetics*. 1994; 40 (5): 360-369.
23. De Smet C De Backer O, Faranoi, Lurquin C, Brasseur, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1996 (93) 7179-7153.
24. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter *Mol Cell Biol* 1999; 19(11): 7327-35.
25. De Smet.C. Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer* 1996; 68(4): 464-70.
26. Fatih M. Uckun, Martha G. Sensel, Lei Sun, Peter G. Steinherz, Michael E. Trigg, Nyla A. Heerema, Harland N. Sather, Gregory H. Reaman, and Paul S. Gaynon Biology and Treatment of Childhood T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia *Blood*. 1998; 93(1) 735-746.

27. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol* 1997; 8(4): 369-372.
28. Gnjatic S, Cai Z, Viguier M, Chouaib S, Guillet J G, Chopping J. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope present by breast carcinomas and melanomas. *The Journal of Immunology*, 1998, 160(1): 328-333.
29. Gnjatic, S., Nagata, Y., Jäger, E., Stockert, E., Shankara, S., Roberts, B. L., Mazzara, G. P., Lee, S. Y., Dunbar, P. R., Dupont, B., Cerundolo, V., Ritter, G., Chen, Y.-T., Knuth, A., Old, L. J. (2000). Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 130 (4) 10917-10922.
30. Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmaraowska A, Huebsch S, Maurer U, Bergmann L, Schmitt M. *Exp Hematology*. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia; 2000; 28(12): 1413-22.
31. Hennuy B, Reiter E, Cornet A, Bruyninx M, Daukandt M, Houssa P, N'Guyen VH, Closset J, Hennen G. A novel messenger ribonucleic acid homologous to human MAGE-D is strongly expressed in rat Sertoli cells and weakly in Leyding cells and is regulated by follitropin, lutropin, and prolactin. *Endocrinology* 2000; 141(10): 3821-31.
32. Itoh K, Hayashi A, Toh Y, Imai Y, Yamada A, Nishida T, Shichijo S. Development of cancer vaccine by tumor rejection antigens. *Int Rev Immunol* 1997; 14: 153-171.
33. Pellat-Deceunynck C, Medellín MP, Labarriere N, Jego G, Moreau-Aubry A, Harousseau JL, Jotereau F, Bataille R. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur J Immunol*. 2000; 30(3): 803-9.
34. Pinilla-Ibarz, K. Cathcart, T. Korontsvit, S. Soignet, M. Bocchia, J. Caggiano, L. Lai, J. Jimenez, J. Kolitz, and D. A. Scheinberg. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood* 2000; 95 (5): 1781-1787.

35. Khatlani TS, Ohno K, Sasaki K, Inokuma H, Onishi T. Cloning and sequencing of canine MAGE cDNA. *Tissue Antigens* 2000; 56(2): 166-9.
36. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol.* 1995; 154(8): 3961-8.
37. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 1994; 180(1): 347-52.
38. Kuramoto T. Detection of MAGE-1 antigen in brain tumor. *Kurume J Med* 1997; 44: 43-51.
39. Larson RA, Dodge RK, Burns P, Lee EJ, Stone RM, Schulman P, Duggan D, Davey FR, Sobol RE, Frankel SR, Hooberman AL, Westbrook CA, Arthur DC, George SL, Bloomfield CD, Schiffer CA: A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults *Exp. Med.* 1997; 186 (8) 1183-1187.
40. Larson RA, Dodge RK, Linker CA, Stone RM, Powell BL, Lee EJ, Schulman P, Davey FR, Frankel SR, Bloomfield CD, George SL, Schiffer CA: A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1998; 92:1556-63.
41. Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukenks J. *Wintrobe Hematología Clínica. 9 Edición.* Interamericana. Buenos Aires, Argentina. 1994.
42. Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH. Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res* 1999; 19(6): 5037-42.

43. Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akyoshi T. Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 3559-3563.
44. Lim SH, Austin S, Owen J, Robinson L. Expression of testicular genes in hematological malignancies. *Br J Cancer* 1999; 81(7): 1162-4.
45. Lim SH, Austin S, Owen-Jones E, Robinson L, Liu BB, Ye SL, He P, Liu YK, Tang ZY, Liu X, Peralta, E. A., Ellenhorn, J. D. I., Diamond, D. J. Targeting of Human p53-overexpressing Tumor Cells by an HLA A*0201-restricted Murine T-Cell Receptor Expressed in Jurkat T Cells. *Cancer Res*.2000; 60: 693-701.
46. Lotze, M.T., W.J. Storkus, L. Falo, J. Baar, I. Davis, T. Tueting, Paradise, and J.M. Kirkwood. Dendritic cells (DC) and the immunotherapy of melanoma. *Melanoma Res*. 1997; (7): 54 -62.
47. Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE -B5, MAGE -B6, MAGE -C2, and MAGE-C: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* 2000; 87 (1): 55-60.
48. Lucas S, de Smet C, Arden KC. Identification of a new MAGE gene with tumor - specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 1998; 58(4): 743-752.
49. Lurquin C, De Smet C, Brasseur F, Muscatelli F, Martelange V, De Plaen E, Brasseur R, Monaco AP, Boon T. Two members of the human MAGE B histological origins. *Genomics* 1997; 46(3): 397-408.
50. Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V Phase 1 study in melanoma patients of a vaccine with peptide- pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34+ haematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 2000; 86 (3): 385-92.

51. Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34 (+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 2000; 86(3): 385-92.
52. Martínez A. Expresión de antígenos tumorales en Leucemia Aguda y su posible uso en la inmunoterapia adoptiva. Tesis de Maestría. 2001. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav). Departamento de Genética y Biología Molecular.
53. Marshall E. Breast cancer. Reanalysis confirms results of 'tainted' study. *Science*. 1995 Dec 8; 270(5242): 1562-70.
54. Mc Curdy DK, Tai LO, Nguyen J, Wang Z, Yang HM, Udar N, Naiem F, Concannon P, Gatti RA. MAGE Xp-2: a member of the MAGE gene family isolated from an expression library using systemic lupus erythematosus sera. *Mol Genet Metab* 1998; 63(1): 3-13.
55. Mejia-Arangure JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernaldez-Ríos R, Paredes-Aguilera R, Flores-Aguilar H, Martínez-García MC. Incidence of acute leukemia in children in Mexico City, from 1982 to 1999. *Salud Publica Méx.* 2000; 42(5): 431-7.
56. Mims C, Interactions of viruses with the immune system. *Clin Exp Immunol* 1996; 66(1): 134-46.
57. Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR, Kurtzman SK, Ergin MT, Ozols J, Meehan J, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17):8078-82.
58. Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(11):4987-91.

59. Nestle, F.O., M. Gilliet, S. Alijagic, W. Wisner, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. Vaccination of melanoma patients with peptide-pulsed dendritic cells. *Melanoma Res.* 1997; 7(1): 514 -19.
60. Nishimura S, Fujista M, terata N, Tani T, Kodoma M; Itoh K. Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Nihon Risnscho Meneki* 1997; (20): 95-101.
61. Ohman Forslund K, Nordqvist K the melanoma antigen genes-any clues to their functions in normal tissues. *Exp Cell Res* 2001; (265): 185-94.
62. Osanto S, Schiphorst PP, Weijl NI, Dijkstra N, Van Wees A, Brouwenstein N, Vaessen N, Van Krieken JH, Hermans J, Cleton FJ, Schrier PI. Vaccination of melanoma patients with an allogeneic genetically modified interleukin 2-producing melanoma cell line. *Hum Gene Ther* 2000; 11(5): 739-50.
63. Österlund C, Tohonen V, Forslund KO, Nordqvist K Mage-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation. *Cancer Res* 2000; 60(4): 1054-61.
64. Özlem Türeci, Carsten Zwick, Michael Koslowski, Gerhard Seitz, and Michael Pfreundschuh Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens *Immunology* 1998; (95): 5211-5216.
65. Pold M, Zhou, Chen G, Hall J, Vescio R, Berenson J. Identification of a new unorthodox member of the MAGE gene family. *Genomics* 1999; 59 (1) 161-167.
66. Pui C-H, Behm FG, Crist WM: Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82(1): 343-52.
67. Reynolds SR, Celis E, Sette A, Oratz R, Shapiro RL, Johnston D, Fotino M, Bystryjn JC Identification of HLA-A*03, A*11 and B*07-restricted melanoma-associated peptides that are immunogenic in vivo by vaccine-induced immune response (VIIR) analysis. *J Immunol Methods* 2000; 244(1-2): 59-67.

68. Riker A, Comier J, Panelli M, Kammula U, Wang E, Abati A, Fetsch P, Lee KH, Steinberg S, Rosenberg S. Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery*. 1999; 126(2): 112-20.
69. Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, Marincola FM, Salgaller ML, Yannelli JR, Appella E, et al. Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *Int Rev Immunol* 1998; (21): 154-60.
70. Rosas A, Ayala M, Miranda E I: Analysis of the clinical relevance of the type of chimeric mRNA in chronic myeloid leukemia in the one Mexican population. *Cancer Research Therapy and Control*. 1999;(10): 73-80.
71. Rosenberg, S.A., Y. Kawakami, P.F. Robbins, and R.F. Wang. Identification of the genes encoding cancer antigens: implications for cancer immunotherapy. *Adv. Cancer Res*. 1996;(70): 145-177.
72. Russo, Tanzarella, Dalerba, Rigatti, Rovere, Villa, Bordignon, and Traversari. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted cell response *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97(5): 2185-2190.
73. Sadanaga N, Nagashima H, Tahara K, Yoshikawa Y, Mori M. The heterogeneous expression of MAGE-3 protein: difference between primary lesions and metastatic lymph nodes in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 1999; 6(5): 975-7.
74. Serrano A, Garcia A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F Differential MAGE-1 gene expression in two variants of an erythroleukemic cell line (K562). *Immunobiology* 1995; 194(4-5): 449-56.
75. Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Maiyajima J, Sagawa K, Itoh K. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. *Cancer immunol Immunother* 1995;(41): 90-103.

76. Smith G, Virus strategies for evasion of the host response to infection. Trends Microbiol 1994; (2): 181-188.
77. Sobol RE, Mick R, Royston I, Davey FR, Ellison RR, Newman R, Cuttner J, Griffin JD, Collins H, Nelson DA, Bloomfield CD: Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1987;(316): 11-17.
78. Spagnoli GC, Schaefer C, Willmann TE, Kocher T, Amoroso A, Juretic A, Zuber M, Luscher U, Harder F, Heberer M.. Peptide-specific CTL in tumor infiltrating lymphocytes from metastatic melanomas expressing MART-1/Melan-A, gp100 and Tyrosinase genes: a study in an unselected group of HLA-A2.1-positive patients. Int J Cancer. 1995; 64(5): 309-15.
79. Stern LJ, Wiley Antigen peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. Structure 1994;(2): 245-51.
80. Stone B, Schummer m, Peley PJ ,Crawford M, Ford M, Urban N, Nelson BH. MAGE F1, a novel ubiquitously expressed member of the MAGE superfamily. Gene 2000; 267 (2): 173-82.
81. Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A, Itoh K. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. J Orthop Res 1997;(15): 128-132.
82. Suzuki K, Tsujitani S, Konishi I, Yamaguchi Y, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of MAGE genes and survival in patients with hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 1999; 15(6): 1227-32.
83. Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. Cancer 1999; 85(6): 1234-40.
84. Takahashi K, et al. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. Cancer Res 1995; 55(16): 3478-3482.
85. Tanzarella S, et al. Characterization of antigenic peptide epitopes by reverse immunology: induction of cytotoxic T lymphocytes specific for exogenous peptide only. Int J Cancer 1997; 72(5): 912-915.

86. Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C. Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family; *Cancer Res* 1999; 59 (11): 2668-74.
87. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk ,Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 6; 190(11): 1669-78.
88. Toh Y, et al Expression of MAGE-1 gene by esophageal carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86(8): 714-717.
89. Traversari C, Meazza R, Copolecchia M, Basso S, Verrecchia A, Vander Bruggen P. INF-Gamma gene transfer restores HLA-Class I expression and MAGE.3 antigen presentation to CTL in HLA- deficient sammad cell lung cancer. *Gene Ther* 1997; 4: 1029-1035.
90. Türeci O, Sahin U, Zwick, Koslowki M, Seitz G, Pfreundschuh. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; (95) 5211-5216.
91. Van Baren, Francis Bresseur, Danièle Godelaine, Gérald Hames, Augustin Ferrant, Frédéric Lehmann, Marc André, Christophe Ravoet, Chantal Doyen, Giulio C. Spagnoli, Marleen Bakkus, Kris Thielemans, and Thierry Boon. Genes Encoding Tumor-Specific Antigens Are Expressed in Human Myeloma Cells *Blood* 1999; 94(4): 1156-1164.
92. Weiss A. Littman Dr. Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* 1994; (76): 263-74.
93. Yamada A, Kataoka A, Shichio S, Kamura t, Imai Y, Nishida T, Itoh K. Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE- 4a / -4b genes in ovarian tumors. *Int J Cancer* 1995;(64): 388-393.