



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL DEDO DE ZINC 695 (*ZNF 695*) EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

LUCERO BEATRIZ ANGELEZ PÉREZ

MÉXICO, D.F. 2014





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

VOCAL: Profesora: ARACELI MENDIETA RERGIS

SECRETARIO: M. EN C. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

2° SUPLENTE: Profesora: SILVIA KARINA GODÍNEZ PALMA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP)

ASESOR DEL TEMA: M. EN C. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

SUSTENTANTE (S): LUCERO BEATRIZ ANGELES PÉREZ

INDICE

INTRODUCCIÓN	4
1.- CÁNCER.....	4
2.-LEUCEMIA.....	5
2.1.-Clasificación.....	5
2.2.-Incidencia y Epidemiología	6
2.3.-Etiología.....	8
2.4.-Patogenia.....	8
2.5-Diagnóstico.....	9
2.6.-Tratamiento.....	12
2.7.-Factores Pronósticos	16
2.8.-La problemática actual	17
3.-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	18
4.-LA GENÉTICA MOLECULAR DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁTICA.....	19
5.-DEDOS DE ZINC.....	20
5.1.-Dedo de Zinc 695 (ZNF695)	22
6.-SPLICING Y CÁNCER.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
METODOLOGÍA.....	28
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA	52
A N E X O S	55

INTRODUCCIÓN

1.- CÁNCER

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que se extienden más allá de sus límites habituales, las cuales pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (OMS, 2013).

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican de acuerdo al órgano o tejido en el que se origina la neoplasia, así por ejemplo, un crecimiento excesivo de células epiteliales se denomina *carcinoma*, uno de células de tejido conectivo o muscular *sarcoma*, en células de la sangre se denominan *leucemias*, *mielomas* o *linfomas*, y del sistema nervioso *neuroblastomas* o *gliomas*.

Esta enfermedad está caracterizada por una serie de eventos que implican cambios dinámicos en el genoma, desde mutaciones puntuales hasta alteraciones en cromosomas completos. Hanahan y Weinber mencionan 10 eventos que modifican la fisiología de una célula normal para convertirla en una célula tumorigénica. Estos eventos son: la autosuficiencia de señales de crecimiento (oncogenes), insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasividad y metástasis, (siendo este proceso la principal causa de muerte por cáncer), evasión a la respuesta inmune, inestabilidad genómica y mutaciones, la promoción de la inflamación y finalmente la desregulación energética celular (Hanahan D., Weinberg R., 2000,2011).

En la actualidad existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales en conjunto representan la segunda causa de muerte a nivel mundial con un 21% de las Enfermedades No Transmisibles (ENT)(OMS, 2012). La neoplasia maligna de mayor prevalencia en la población en general (incluyendo mujeres y hombres) es el cáncer de pulmón, seguidos del cáncer de estómago, cáncer colorectal, cáncer de mama,

linfomas y mielomas múltiples, cáncer de próstata y leucemias (Mathers C, et .al.2008).

La frecuencia relativa de cada tipo de cáncer varía según el sexo, la edad y la región geográfica, por ejemplo, la leucemia es el tipo de cáncer que más afecta a la población pediátrica en todo el mundo.

2.-LEUCEMIA

La leucemia se define como una enfermedad maligna de la médula ósea que, provoca un aumento incontrolado de leucocitos. Se clasifica según al tipo de progenitor afectado y a la severidad de la misma, existiendo en total cuatro tipos de leucemia: la Leucemia Aguda Linfocítica (LAL), Leucemia Aguda Mielocítica (LAM), Leucemia Crónica Linfocítica(LCL) y Leucemia Crónica Mielocítica (LCM).

En general se conoce que las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación incontrolada de células muy inmaduras (blastos), proceso denominado *hiatus*; estas células infiltran la médula ósea superando un 20% la celularidad medular, desplazando de esta forma la hematopoyesis normal. A diferencia de las leucemias agudas, en las leucemias crónicas no existe *hiatus*, pues el trastorno solo afecta el proceso de proliferación mas no el de diferenciación.

2.1.-Clasificación.

Las leucemias se clasifican en agudas y crónicas. Las leucemias agudas se subdividen en: mielocíticas (LAM) y linfocíticas (LAL), las cuales a su vez poseen subtipos definidos por la clasificación FAB (Franco Américo-Británica).Tabla 1.

Tabla 1: Clasificación FAB (según morfología).	
LAM	LAL
M0:indiferenciada	L1: Linfoblástica típica. Afección a linfocitos B
M1:mieloide (o granulocítica) sin maduración	L2:Linfoblástica atípica .Afección a linfocitos T
M2:mieloide (o granulocítica) con maduración	L3:Parecida al Linfoma de Burkitt
M3:promielocítica	
M4:mielomonocítica	
M5: monocítica.	
M6:eritroleucemia	
M7:megacariocítica	

De las anteriormente mencionadas, se sabe que la leucemia aguda es la de mayor incidencia en la población pediátrica.

2.2.-Incidencia y Epidemiología

Las enfermedades neoplásicas en la población pediátrica es la segunda causa de muerte en niños menores de 15 años, sólo superada por los accidentes.

De ellas, las leucemias agudas son el tipo que se presenta con mayor frecuencia. En la Ciudad de México representan alrededor de 40% de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre 30 y 34 %. A su vez, la leucemia aguda linfoblástica (LAL) comprende el 85% de ellas, la leucemia aguda mieloblástica (LAM) constituye poco más de 14% y la leucemia no diferenciada ocupa alrededor de 1%.

La LAL atípica supone entre un 15 a 20% de todas las leucemias linfoblásticas, a pesar que los linfocitos T son predominantes en sangre periférica (SP),

representando un 80% de los linfocitos totales circulantes normales; de lo anterior se infiere que la de mayor incidencia es la LAL-típica (75-80%).

Por otra parte, en adultos la más común es la LAM seguida por la LCL, LCM y la LAL.

La incidencia media en la población general se sitúa entre 1 a 3 casos por cada 100,000 habitantes. En los últimos 20 años, los índices de incidencia y de mortalidad de la leucemia han disminuido ligeramente, sin embargo, se ha observado que los hombres tienen más probabilidad de presentar leucemia que las mujeres, aunque desde 1992 los índices de incidencia se han mantenido estables en los hombres pero han aumentado ligeramente en las mujeres (<http://www.cancer.gov>).

Se ha observado que la LAL ocurre con mayor frecuencia durante la primera etapa de la vida, sin embargo aún no es del todo clara la causa de que esto suceda. Figura 1.

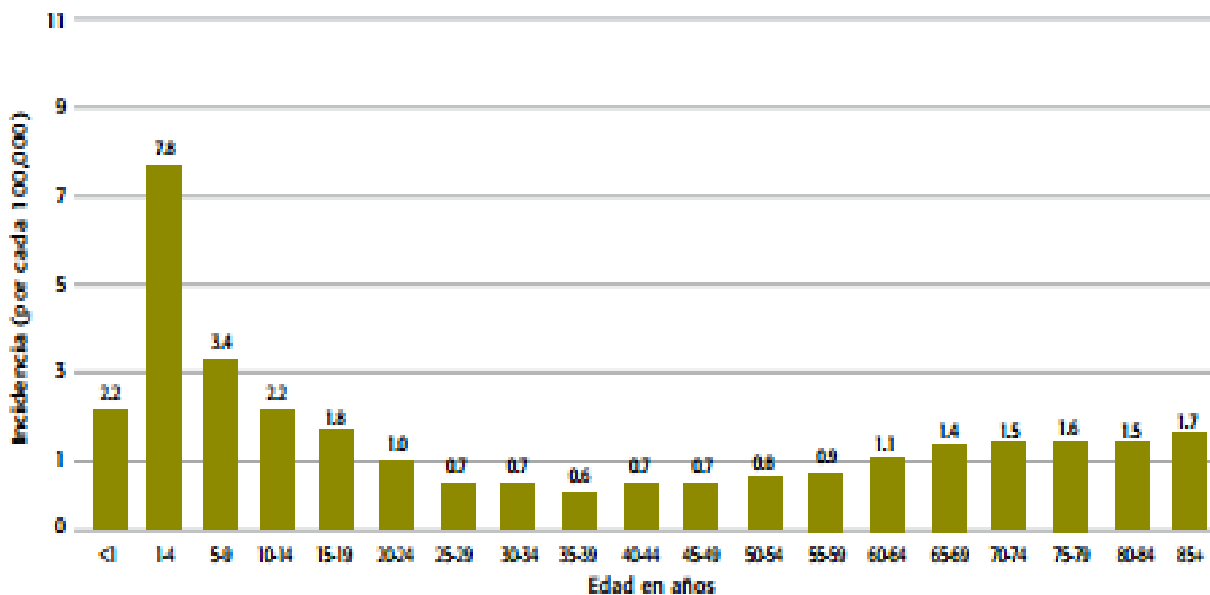


Figura 1: Incidencia de la Leucemia Aguda Linfoblástica por cada 100,000 (2003-2007). Los casos son agrupados por rangos de edades, de los cuales 1-4 años se observa la mayor incidencia (7.8).

Por otro lado, se ha notado que la incidencia de LAL en niños de dos a tres años es aproximadamente cuatro veces mayor que la de lactantes, y casi 10 veces mayor que en adolescentes de 16 a 21 años.

En cuanto al gasto monetario generado por la leucemia aguda, se calcula que se gastan aproximadamente 4,5 mil millones de dólares cada año en el tratamiento de la leucemia en Estados Unidos (<http://www.cancer.gov>).

En México son escasos los estudios realizados sobre el costo de los tratamientos de la LAL, sin embargo, un grupo de investigadores del Hospital Infantil de México demostraron que el costo anual unitario únicamente de la quimioterapia en un infante de 20 Kg y en uno de 30 Kg con LAL oscila entre 71,655.00 MXN (~\$5,430 USD) y 95,825.90 MXN (~\$7,260 USD)(Jasso L, *et. al.*, 2012).

2.3.-Etiología

La etiología de la LAL aún es desconocida, pero existen múltiples factores asociados al desarrollo de la enfermedad como pueden ser: la exposición a radiaciones ionizantes, a sustancias químicas como el benceno, conocido por su alto poder cancerígeno y a factores genéticos (inmunodeficiencias, Síndrome de Down, Síndrome de Fanconi, raza), por mencionar algunos. Estos factores favorecen el desarrollo de alteraciones en el DNA, que son finalmente las responsables de que una célula “normal” pueda transformarse en una célula cancerígena.

2.4.-Patogenia

Se sugiere que la LAL es ocasionada por la lesión adquirida de una sola célula de la médula ósea, la cual tuvo algún daño en genes reguladores del crecimiento ; lo que conlleva a tener fallas en los mecanismos del control negativo de la proliferación celular de la clona mutante, lo que a su vez provoca una sobreproducción descontrolada y exagerada de células denominadas linfoblastos o blastos leucémicos, células incapaces de madurar que son afuncionales. Estas células por lo general reemplazan la médula normal, interfiriendo con la función adecuada, las

cuales pueden invadir otros órganos como bazo, testículos, hígado, piel, SNC, etc.; las cuales si no se tratan adecuadamente pueden causar la muerte (Rodak F,2005).

2.5-Diagnóstico.

El diagnóstico requiere del estudio completo de sangre periférica y de médula ósea , los estudios realizados incluyen un análisis morfológico, inmunofenotípico, citoquímico y citogenético.

Análisis morfológico: El uso de microscopía óptica se realiza para diferenciar el tipo de Leucemia y subtipo. Tabla 2.

Tabla 2: Características morfológicas de los diferentes tipos y subtipos de leucemias.		
Tipo	Subtipo	
Leucemia Aguda Linfoblástica Nota: Generalmente los linfoblastos son más pequeños que los mieloblastos. Por lo común los linfoblastos tienen citoplasma escaso azul con cromatina gruesa distribuida de manera uniforme. Sus núcleos contienen pocos nucléolos.	L1	En los casos típicos los blastos L1 son más pequeños, a diferencia de los otros dos y por lo general tienen un tamaño casi dos veces mayor que el de un linfocito. Sus nucléolos son largos y redondos con cromatina homogénea, pueden o no ser visibles, por lo general no están definidos con claridad
	L2	Los blastos L2 son más grandes y tienen un núcleo con forma más irregular y nucléolos que suelen verse con facilidad.
	L3	Los blastos L3 son grandes, con núcleos redondos u ovalados muy visibles y citoplasma basófilo abundante. A menudo hay vacuolas en el núcleo.

Leucemia Aguda Mieloblástica		Los mieloblastos son células más grandes con nucléolos más destacados. El citoplasma es moderado y más gris que el de los linfoblastos. La cromatina es homogénea y finalmente granular. Suelen tener dos o más nucléolos destacados.
------------------------------	--	---

Clasificación citoquímica: En el panel actual de estudios citoquímicos de la clasificación FAB se incluye mieloperoxidasa, Sudán Negro B, cloroacetato esterasa y esterasa inespecífica. En ocasiones se utiliza la coloración de ácido periódico de Schiff (PAS). (Hernán V., *et. al*,2004.)

Clasificación inmunitaria: Se realiza mediante el uso de anticuerpos monoclonales y citometría de flujo para distinguir entre un tipo de leucemia u otra y sus subtipos. Mediante éste estudio, se aumenta a un 95 % la exactitud para la identificación de la línea celular aberrante (Hernán V, *et. al*,2004).

1.-Subtipo de linfocitos B: se identifica al encontrar en los blastos marcadores de superficie celular idénticos a los linfocitos B normales.

2.- Subtipos de linfocitos T y de linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés): se identifican mediante la detección en los blastos, marcadores de superficie celular idénticos a los linfocitos T normales. Alrededor del 15 por ciento de los casos son subtipos de células T y células citolíticas naturales.

Una vez que se determinan estos tipos de células, los términos usados para categorizar al subtipo incluyen:

1.- Leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B (pre linfocitos-B); alrededor de 85 por ciento de los casos son del subtipo de precursores de linfocitos B (pre linfocitos-B)

2.- Leucemia linfoblástica aguda B

3.- Leucemia linfoblástica aguda T

Tabla 3: Inmunofenotipo									
Subtipo	Inmunofenotipo							Frecuencia%	
	CD3	CD5	CD10	CD19	IgC	IgS	TdT	Adultos	Niños
T	+	+	-	-	-	-	+	24	13
proB	-	-	-	+	-	-	+	11	5
Común	-	-	+	+	-	-	+	52	63
preB	-	-	+/-	+	+	-	+	9	16
B	-	-	+/-	+	-	+	-	3	3

IgC=inmunoglobulina citoplasmática TdT= desoxirribunocleotidil transferasa

IgS=inmunoglobulina de superficie

Citogenética: en la LAL se han caracterizado una diversidad de alteraciones citogenéticas que suelen afectar a genes concretos, muchos de ellos regulan diferentes procesos celulares, los cuales al verse afectados promueven el crecimiento incontrolado de las células linfoides.; estas alteraciones se detectan por técnicas de biología molecular. En la siguiente tabla se describen las alteraciones más importantes en las leucemias independientemente de su estirpe.

Tabla 4: Alteraciones citogenéticas y moleculares más frecuentes.				
Translocación	Alteración molecular	Frecuencia %		Características clínicas
		A	N	
t (1;19)	Fusión E2A/PBX1	3	5-6	Mal pronóstico (más en adultos) hiperleucocitosis en niños , compromiso del SNC, pre –B

t(9;22)	Fusión BCR/ABL	20-30	3-5	Muy mal pronóstico (más en adultos) , hiperleucocitosis, mayor edad , pre –B.
t(4;11)	Fusión MLL/AF4	2-4	1-2	Muy mal pronóstico, hiperleucocitosis , predominio en lactantes y niños pequeños, pro – B
t(8;14)	Fusión Myc/IgH	2-4	1-2	Mejor pronóstico con tratamiento intensivo (menos en adultos) , predominio masculino , compromiso extra medular ,LAL3B
t(1;14)	Fusión TTG2/TCRg	1	3-4	Pronóstico intermedio, poca experiencia en adultos, predominio masculino, hiperleucocitosis, compromiso extra medular , T.
t(12;21)	Fusión TEL/AML	1-2	18-20	Pronóstico favorable (poca experiencia en adultos).
A= Adultos N= Niños				

En este tipo de estudios se utilizan pruebas de laboratorio conocidas como hibridación in situ con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), en las que se estudian las células de una muestra de médula para buscar determinados cambios en la estructura o la función de los genes (Hernán V, *et. al*,2004).

2.6.-Tratamiento

Algunos tipos de cáncer, a pesar de ser diseminados, como las leucemias, tienen tasas de curación elevadas si se tratan adecuadamente (OMS, 2012)

Existen varios factores que afectan la selección y el resultado del tratamiento, incluyendo:

- El subtipo de LAL
- La presencia de pocas o muchas células de leucemia en la sangre y el tipo de linfocitos leucémicos determinados según su aspecto
- El inmunofenotipo o la composición cromosómica
- Si el paciente recibió quimioterapia anteriormente para tratar otro tipo de cáncer
- Si la LAL se encuentra en el sistema nervioso central
- Si la LAL no ha respondido al tratamiento o si hubo una recaída
- La presencia de una infección sistémica en el momento del diagnóstico
- La edad y el estado general de salud del paciente.

El tratamiento engloba quimioterapia y/o trasplante de médula ósea, los cuales se describen a continuación:

Quimioterapia. Este tratamiento de la LAL se divide en tres etapas: inducción a la remisión, consolidación (también llamada intensificación) y mantenimiento.

Inducción a la remisión: Es la fase inicial de la quimioterapia, su objetivo es eliminar los blastos de la leucemia que estén visibles en sangre y en médula ósea. En general, si los blastos siguen siendo evidentes luego del primer ciclo de quimioterapia de inducción, se administra un segundo ciclo. La duración aproximada de esta primera etapa es entre 4 y 6 semanas.

Existe una variada gama de fármacos que actúan mediante diferentes mecanismos de acción, en su mayoría interactúan con el ADN de las células cancerosas. Tabla 5.

Tabla 5: Fármacos utilizados para el tratamiento de LAL.

<p>Antibióticos Antitumorales</p> <p><i>Interactúan directamente con el DNA, interfiriendo con la supervivencia celular.</i></p> <p>e.j.:daunorrubicina (Cerubidine), doxorrubicina (Adryamicin), mitoxantrona (Novantrone), idarrubicina (Idamycin)</p>	<p>Inhibidores de la Tirosina cinasa</p> <p>ej.: mexilato de imatinib (Gleevec), dasatinib (Sprycel), nilotinib (Tasigna) .</p>
<p>Inhibidores de enzimas reparadoras del ADN</p> <p><i>Estos fármacos actúan sobre determinadas proteínas (enzimas) que ayudan a reparar los daños del DNA. Previenen que las enzimas funcionen y por lo tanto el DNA es más susceptible a dichos daños.</i></p> <p>ej.: etopósidos (VP-16, VePesid, Etopophos), tenipósidos (VM-26, Vumon), tepotecán (Hycamtin).</p>	<p>Antimetabolitos</p> <p><i>Estas sustancias químicas son muy similares a los bloques de construcción del DNA o RNA. Se modifican lo suficiente a partir de las sustancias químicas naturales de modo tal que cuando la sustituyen, bloquean la capacidad de las células de formar DNA o RNA , evitando que la célula crezca.</i></p> <p>ej.: azacitidina (Vidaza),cladribina(2-CdA, Leustatin),clofarabina(Clolar),citarabina (citosina arabinosida , ara -C, Cytosar- U),fludarabina (Fludara),hidroxicarbamida(Hydrea), 6-mercaptopurina (Purinethol), metotrexato,nelarabina (Arranon),6-tioguanina(tioguanina, Tabloid)</p>
<p>Inhibidores de la síntesis de DNA.</p> <p><i>Este fármaco reacciona con el DNA para modificarlo químicamente y prevenir la proliferación celular.</i></p> <p>ej.: carboplatino (Paraplatin)</p>	<p>Fármacos que evitan la división celular</p> <p><i>Estos fármacos interfieren con las estructuras necesarias para permitir la división celular. Este efecto puede evitar el ritmo de proliferación de la célula leucémica.</i></p> <p>ej.: vincristina (Oncovin)</p>
<p>Fármacos que dañan el DNA</p> <p><i>Fármacos relacionados con el gas mostaza, que han sido diseñados para interactuar, transformar y</i></p>	<p>Hormonas sintéticas</p> <p><i>Tipo de hormonas que al ser administradas en dosis altas, pueden destruir las células</i></p>

<i>dañar el DNA.</i> ej. ciclofosfamida(Cytosan), isofosfamida (Ifex)	<i>tumorígenicas.</i> ej.: prednisona, prednisolona, dexametasona.
Enzimas que impiden la supervivencia de las células. ej.: asparaginasa (Elspar), peraspargasa (PEG-L asparaginasa,Oncaspar)	

Consolidación y Mantenimiento: Segunda y tercera etapa de la Quimioterapia. Después de la remisión quedan células residuales de leucemia que no se pueden detectar en exámenes de sangre ni de médula ósea. El tratamiento óptimo de la LAL requiere una terapia adicional intensiva después de la remisión. La terapia de consolidación se suele administrar en ciclos durante 4 a 6 meses. La terapia de mantenimiento se administra durante aproximadamente 2 años. En la mayoría de los casos, la quimioterapia posterior a la remisión también incluye fármacos que no se utilizaron durante el tratamiento de inducción

Al finalizar esta etapa más de 95% de los niños con LAL logran la remisión completa, por lo que se espera que aproximadamente 80% de los pacientes de LAL de 1 a 18 años recién diagnosticados, sobrevivan sin complicaciones a largo plazo (<http://www.cancer.gov>).

Enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés). Existen técnicas moleculares sensibles, que permiten la identificación de pequeñas cantidades de células residuales de leucemia, en momentos que la sangre y la médula ósea parecen normales. Este enfoque de tratamiento puede usarse si las células de leucemia tienen una anomalía molecular detectable. También puede permitir un seguimiento más sensible de los pacientes en remisión, y puede ayudar a determinar si es necesario administrar un tratamiento adicional. Puede que la detección de MRD durante el día 29 del tratamiento (fin de la inducción) resulte útil para determinar la necesidad de una terapia de inducción adicional. En algunas instituciones

pediátricas, los médicos buscan enfermedad residual mínima en el día ocho como indicador de pacientes con respuesta inicial lenta.

Una opción para mejorar el estado del paciente es el uso de quimioterapia apoyada en la realización de un trasplante de médula ósea. Actualmente entre el 75 y el 80% de los niños tratados por LAL no necesitarán recibir un trasplante (Hernán V, *et. al*,2004).

2.7.-Factores Pronósticos

La unión de los factores pronósticos a las características clínicas y paraclínicas de cada paciente, han permitido adaptar los tratamientos en las probabilidades estimadas de recaída.

Entre los factores de mal pronóstico se encuentran: el sexo masculino, edad menor a 2 años y mayor a 10 años, y presencia de masa tumoral importante.

Otros factores son determinados por el laboratorio, los cuales son de mal pronóstico: la presencia inicial de leucocitosis mayor a 100,000 células /ml, presencia de trombocitopenia, aumento en el nivel de la deshidrogenasa láctica (LDH) (reflejo de la masa tumoral) y el compromiso meníngeo por punción lumbar.

En cuanto al cariotipo, la hiperdiploidía representa buen pronóstico (se libra el 80% de los casos de la enfermedad), cariotipo normal confiere un pronóstico intermedio (50 a 60 % de sanación), en tanto que presentar una hipodiploidía es de mal pronóstico (30% de sanación). Translocaciones como la t(4,11) o t(9,22) son de muy mal pronóstico mientras que las translocaciones t(12,21), t(8,14) se asocia con un pronóstico favorable, esta última usando quimioterapia intensiva a corto plazo (Hernán V, *et. al*, 2004).

Finalmente, también interviene en el pronóstico el tipo de citología de los blastos, donde L1 es de mejor pronóstico, L2 es el menos caracterizado y aún se discute acerca de su pronóstico, y el tipo L3 de muy mal pronóstico.

2.8.-La problemática actual

Pocas décadas atrás, las tasas de curación tanto de niños como de adultos con un diagnóstico de LAL eran muy bajas. Hoy en día, casi el 80 por ciento de los niños y el 40 por ciento de los adultos pueden esperar una supervivencia a largo plazo sin leucemia, y probablemente una cura, gracias a los tratamientos actuales. En la actualidad se hace énfasis no sólo en mejorar la tasa de curación, sino también en mejorar la calidad de vida durante el tratamiento y posterior a él (Leuckemia & Lymphoma Society, 2010).

Durante el tratamiento de la LAL pueden ocurrir repetidas recaídas del paciente pediátrico, siendo el origen de ellas aún indeterminado; sin embargo, se han realizado estudios donde se relacionan algunos genes a la resistencia de fármacos empleados en la quimioterapia, como lo demostraron Duan Zhenfeng, *et. al.*, al asociar la presencia del gen ZNF93 en diferentes líneas celulares, con la resistencia a dos fármacos anticancerígenos (PM00104 y ET-743) (Duan Zhenfeng, *et. al.*, 2009).

A este tipo de marcadores se les denomina *marcadores pronóstico*, los cuales podemos definir como a aquellos que permiten predecir el curso natural de una enfermedad en específico. Permite diferenciar a aquellos pacientes que tienen un mejor pronóstico de aquellos que no. Estas moléculas están relacionadas con proliferación celular, indiferenciación, angiogénesis, invasión o metástasis

Por otra parte, se habla de *marcadores predictivos* a aquellas moléculas que proveen información acerca de si un paciente será o no beneficiado por un tipo de terapia. Pacientes que muestren estos marcadores tienen la alternativa de modificar el cuadro de terapia a seguir, además de ajustar la dosis adecuada y predecir la toxicidad por la administración de un tipo de medicamentos (Duffy M., *et. al.*; 2011).

3.-REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión genética en el genoma humano es regulada principalmente a través de un control transcripcional.

Existen diversos mecanismos de control transcripcional que actúan a diferentes niveles: de DNA, RNA e incluso de proteínas. Estos mecanismos de control pueden suceder a nivel pre-tanscripcional, transcripcional, a nivel de procesamiento y transporte del RNA, a nivel del control de la estabilidad del RNA, mediante un control de la traducción y finalmente a nivel pos-traduccional, como lo muestra la figura 2:

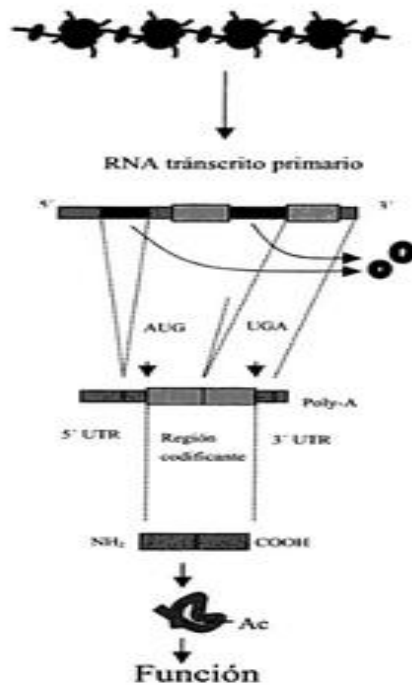
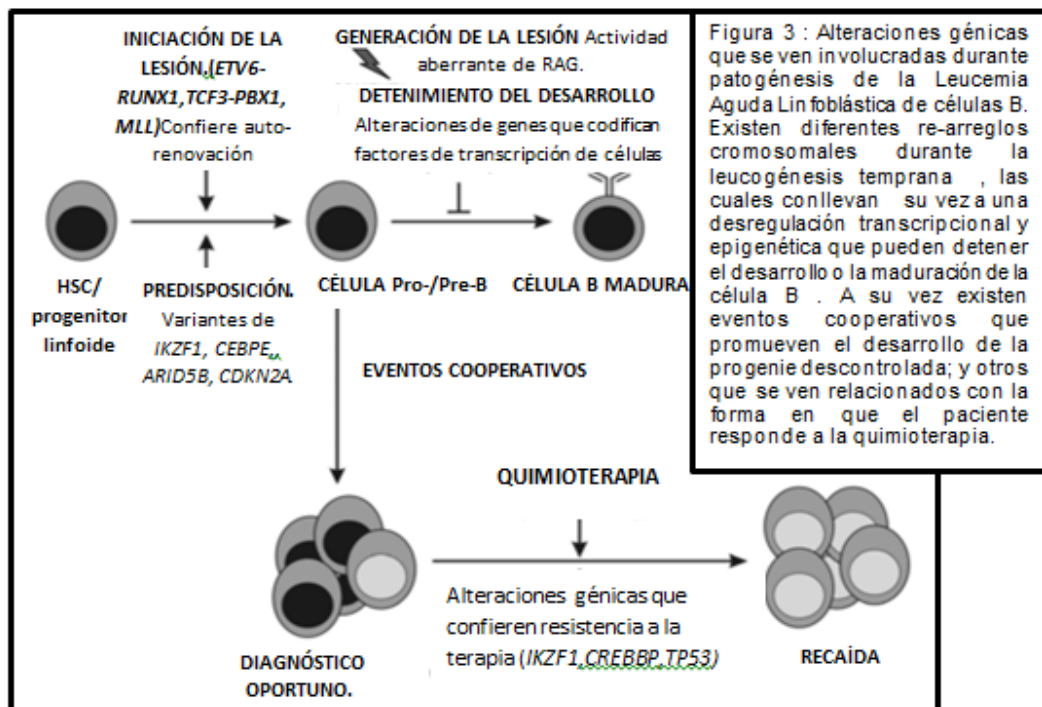


Figura 2: Niveles a los cuales se da el control transcripcional.

4.-LA GENÉTICA MOLECULAR DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA.

Entre los años 2007 y 2008 se han realizado estudios moleculares como análisis comparativos o de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), donde se han buscado algunas alteraciones a nivel de DNA. En dichos estudios se observó que aproximadamente el 50% de los pacientes presentaron tanto deleciones como amplificaciones, que pudieran modificar la secuencia de uno o varios genes.

Específicamente en la LAL se han identificado alteraciones de genes codificantes de proteínas clave que participan en: el desarrollo de células linfoides (*PAX5, IZKF1, EBF1, and LMO2*), en la regulación del ciclo celular y en la supresión tumoral (*CDKN2A/CDKN2B, PTEN, and RB1*), en la señalización linfoide (*BTLA, CD200, TOX*, y el receptor glucocorticoide *NR3C1*), en la regulación transcripcional y en la coactivación (*TBL1XR1, ETV6, and ERG*). La suma de todos estos cambios explican la patogénesis de la enfermedad (Figura 3) (Mullighan C.,2012)



5.-DEDOS DE ZINC

Los dedos de zinc son motivos de proteínas relativamente pequeñas que contienen múltiples salientes en forma de dedos en tándem que hacen contactos con su molécula diana. Estos dominios se unen a un ion de zinc.

Esta familia fue identificada por primera vez en la especie *Xenopus laevis* como un factor de transcripción de unión al DNA. Actualmente se sabe que aproximadamente 700 genes codifican para alguna de estas proteínas, las cuales pueden unirse a DNA, RNA, proteínas y/o lípidos. Sus propiedades de unión dependerán de la secuencia de aminoácidos de los dedos de zinc, de su *linker* y del número de dedos presentes. (<http://ghr.nlm.nih.gov>).

La función de esta familia se encuentra relacionada con: la transcripción de genes (como factor de transcripción), la traducción, el tráfico del ARNm, la organización del citoesqueleto, el desarrollo epitelial, la adhesión celular, el plegamiento de proteínas, la remodelación de la cromatina y la detección de zinc, por nombrar algunos. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Basados en la naturaleza y forma en que se encuentran presentes los residuos que unen al átomo de zinc, Cybele C. clasifica a esta familia en:

C2HC: a través de este motivo las proteínas interaccionan con RNA y otras proteínas. Esta proteína está involucrada en funciones esenciales para la replicación de virus como el empaquetamiento del RNA viral

C4 (lazo o cinta): las proteínas que contienen este motivo son en su mayoría enzimas involucradas en la replicación y transcripción del DNA, como las primasas de los fagos T4 y T7, presentan motivos C4 reconociendo específicamente tres pares de nucleótidos (5' GTC 3') de una hebra simple de DNA. Por otro lado, los factores TFIIS y TFIIB interactúan tanto con DNA de cadena simple, como con DNA doble cadena y RNA. La mutación de este motivo pareciera ser suficiente para bloquear el reconocimiento, sin embargo el motivo pudiera no ser el único determinante para la especificidad de estas interacciones

C4 (familia GATA): la familia GATA incluye factores de transcripción que regulan la expresión de genes en diversos tejidos durante el desarrollo celular. El factor GATA-1 está involucrado en la regulación del desarrollo de los glóbulos rojos y presenta dos zinc fingers del tipo C4

C6: la proteína más estudiada que presenta este motivo es la GAL4 de las levaduras; esta proteína activa la transcripción de genes involucrados en la utilización de la galactosa y la melibiosa. Es un monómero en ausencia de DNA, sin embargo se une a una secuencia de 17 pares de bases del DNA, en forma de dímero

C8: este motivo está presente en varios receptores intracelulares proteicos como el estrógenos , glucocorticoides, y receptores de ácido retinoico. Los residuos que conforman el motivo se unen a dos secuencias de DNA de 6 pares de bases, que constituyen el elemento de respuesta hormonal. La unión al DNA requiere la dimerización del motivo C8

RING fingers (C3HC4 - C3H2C3): el motivo RING finger es un dedo de zinc particular que reúne dos subtipos denominados C3HC4 (RING-HC) y C3H2C3 (RING-H2) . En este grupo se encuentran proteínas de diversos orígenes como: Rad5, involucrada en la reparación del DNA de levaduras, la proteína humana RAG1, esencial para el re arreglo en las inmunoglobulinas, el péptido del gen 63 del virus herpes equino tipo 1, la proteína Z de los arenavirus y la proteína humana de la leucemia promielocítica PML

H2C2 finger: el dominio H2C2 se encuentra altamente conservado en las integrasas de los retrovirus y los retrotransposones. La comparación de varias integrasas sugiere que este dominio constituye un nuevo grupo de motivos de dedos de zinc. Estos dominios al unirse a su molécula blanco, cambian la conformación de la proteína

El dominio LIM: constituye un motivo dedo de zinc “doble”, y se lo encuentra en una gran variedad de proteínas como factores transcripcionales, quinasas y proteínas

involucradas en la organización del citoesqueleto, desarrollo de órganos y linaje celular

C₂H₂: Algunas de las proteínas caracterizadas que presentan este motivo son: el factor de transcripción TFIIIA de *X. laevis*, el factor de transcripción humano asociado a RNA polimerasa I, Sp1, y el factor de transcripción murino, Zif268 (García; Cybele, 2006). Esta sub familia fue la primera clase a caracterizar. Contiene dominios conservados beta plegados y alfa hélices (beta/beta/ alfa hélice), donde dos residuos de cisteína y dos de histidina unen al átomo de zinc en un arreglo tetraédrico

A su vez esta familia puede dividirse en tres grupos basados en el número y patrón de dedos presentes: Triple C₂H₂ (une un solo ligando), múltiple C₂H₂ (une múltiples ligandos) y parejas de C₂H₂ separadas. (<http://smart.embl.de/smart/>). Los factores de transcripción usualmente contienen motivos de dedos de zinc capaces de realizar contactos múltiples a lo largo del DNA. Los motivos C₂H₂ reconocen secuencias específicas en el DNA y posteriormente se unen al surco mayor a través del alfa hélice que abarca de 3 a 4 pares de bases (pb) (<http://smart.embl.de/smart/do>)

5.1.-Dedo de Zinc 695 (ZNF695)

En particular, *ZNF 695* pertenece a la familia C₂H₂. El gen se encuentra codificado en el cromosoma 1 en la posición 44 del brazo largo (1:q44) (Figura 2.). Tiene una extensión de 62,547,000 pb. Se encuentra constituido por 6 exones, los cuales mediante *splicing alternativo* dan lugar a tres isoformas (hasta el día de hoy reportadas), de las cuales dos codifican para proteínas y una no codificante. Adicionalmente, mediante estudios realizados en el INP, se conoce la existencia dos nuevas variantes del gen, ambas RNA no codificantes. Figura 3.

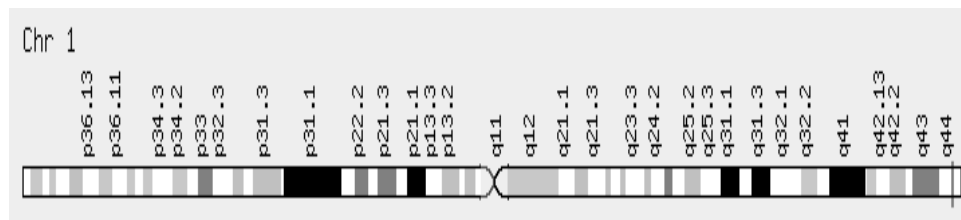
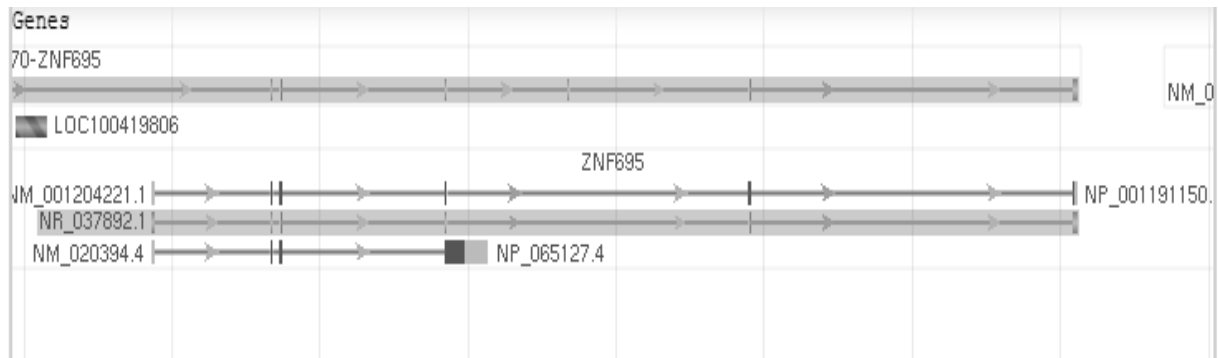


Figura 2: Posición cromosómica donde se encuentra el gen *ZNF 695* (1:q44) (Gene Cards, 2013)

A)



B)

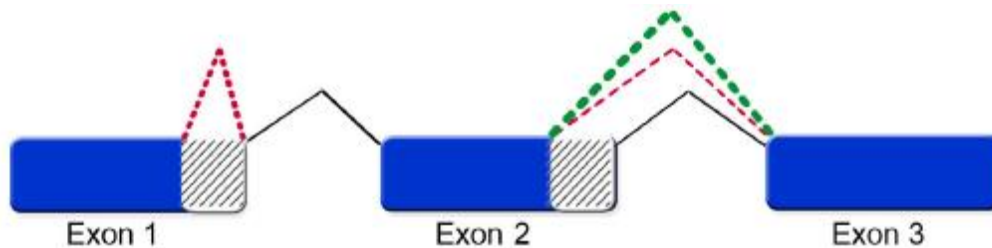


Figura 3: Representación gráfica del RNAm e isoformas de ZNF695. A) NCBI: La primer línea representa el RNA mensajero (RNAm) de ZNF 695. La segunda línea ilustra la primera variante, la tercera línea representa la segunda variante, ambas codificantes para una proteína. La segunda línea representa la isoforma no codificante para una proteína, de tal forma que se le puede denominar un RNA largo no codificante (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57116> , NCBI, 2013). B) Variantes reportadas experimentalmente por Juárez M. *et.al.*. La línea negra representa tanto a las variantes 1 y 2, pues contiene a los exones 1, 2 y 3 completos. La línea punteada verde representa el sitio de splicing del amplicón intermedio (Variante nueva). La línea punteada roja indica los sitios de splicing de la variante más pequeña (Variante nueva) (Juárez-M., *et. al.*, 2013).

Estructuralmente, la primera variante de ZNF695 (RNAm) codifica para la isoforma más larga con 3392 pb, divididos en 4 exones. El exón 4 representa el más largo pues ahí se encuentran codificados la mayor parte de los 8 dedos de zinc dobles presentes en la proteína. Además, según bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se encuentra presente un dominio denominado Kruppel Associated Box (KRAB-A). Este dominio es un modulador de la represión transcripcional, representan el mayor grupo de reguladores transcripcionales en mamíferos y solo se encuentran en tetrápodos. La caja acoplada puede ser del tipo A, AB B o C, en este gen únicamente se encuentra presente la caja A, la cual es

crucial para poder ejercer una represión transcrpcional, mientras que las cajas B y C no lo son tanto. El dominio KRAB se encuentra localizado en el extremo amino terminal de la secuencia de la proteína, y los dedos de zinc se encuentran en el carboxilo terminal. (Figura 4).

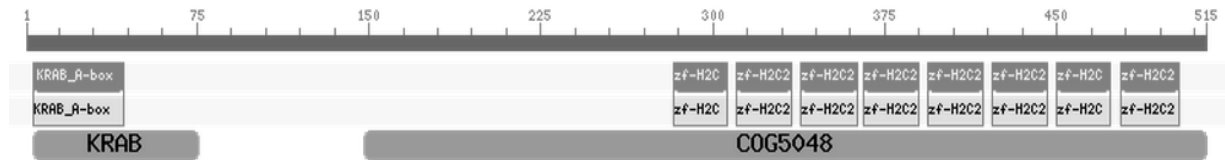


Figura 4: Motivos para los cuales la primer variante del gen ZNF 695. Codifica para una proteína que contiene en su estructura una caja KRAB-A que se ubica cerca del extremo amino terminal y 8 dedos de zinc dobles que se localizan cerca del extremo carboxilo terminal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

La función de este dominio es crucial, ya que modula la interacción proteína-proteína que reprime la transcripción mediante el reclutamiento de co-represores. Un mecanismo por el cual sucede dicho fenómeno parece ser el siguiente: el complejo KRAB-AFP unido al DNA, recluta al co-represor KAP1 (KRAB Associated Protein-1). A su vez KAP1/KRAB-AFP recluta a la proteína de heterocromatina 1 (HP1) y otras proteínas involucradas en la modulación de la cromatina, lo que finalmente conduce a la represión transcripcional a través de la formación de heterocromatina. (Figura 5).

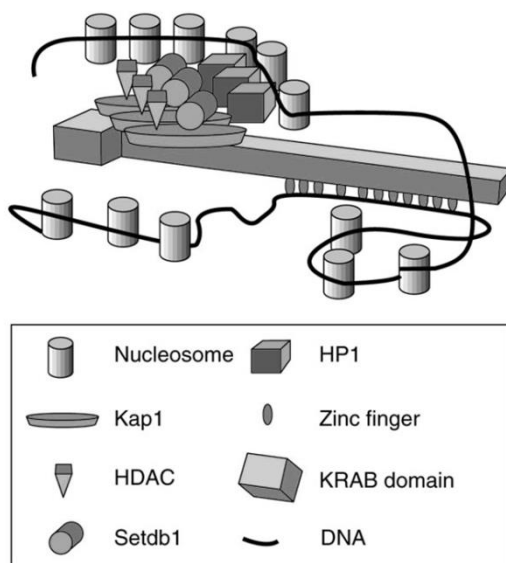


Figura 5. Proteína dedos de Zinc con dominio KRAB. Modelo propuesto por el cual proteínas que contienen el dominio KRAB inhiben la transcripción. El modelo propone la formación de heterocromatina mediante el reclutamiento de moléculas co-represoras como KAP 1 Y HP1.

La segunda variante difiere respecto a la primera en la región codificante 3' UTR, además posee un carboxilo terminal más corto; sin embargo, conserva el dominio KRAB-A. Tiene en total 954 pb debido a un *splicing* en el exón 4 (4a) que conlleva a la pérdida de los dedos de zinc. (Figura 6).

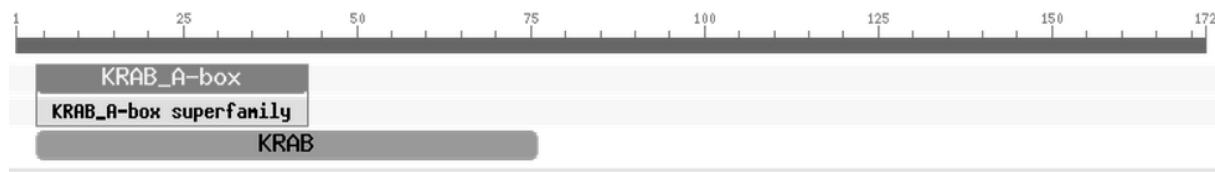


Figura 6: Motivos para los cuales la segunda variante del gen ZNF 695 Codifica la caja KRAB-A , sin embargo existe una pérdida de los dedos de zinc debido al fenómeno de *splicing*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

En si, la función de este gen es aún desconocida, sin embargo, se sabe que codifica una proteína de igual nombre que el gen (ZNF 695). La primer variante codifica para una proteína 515 a.a y la segunda 172 a.a. Basados en información de diferentes genes con una estructura similar, podemos intuir que la función de esta proteína se ve involucrada en la represión transcripcional, aunque aún no se conoce con exactitud que genes regula. Para ello, es necesario realizar una investigación formal que pueda responder esta y más preguntas.

6.-SPLICING Y CÁNCER

El *splicing alternativo* se define como el proceso de corte y empalme del RNA mensajero, mediante el cual el acervo protéico aumenta considerablemente.

Se ha observado que durante el crecimiento humano normal, éste evento se presenta especialmente en cerebro y testículos; sin embargo, también se ha notado que diferentes tipos de *splicing* de algunos genes se han correlacionado con la presencia de ciertas enfermedades, incluyendo: la deficiencia de la hormona de crecimiento, el síndrome de Frasier, la enfermedad de Parkinson, fibrosis cística, retinitis pigmentosa y atrofia muscular. En cáncer, se ha observado igualmente aberraciones en los sitios de *splicing* y la presencia de exones e intrones alternativos (Venabeles J.,2004)

En la tabla se presentan ejemplos de genes donde alteraciones o aberraciones en el *splicing alternativo* se ven directamente correlacionadas con algún evento cancerígeno (Dibier A., *et.al.*, 2012).

Tabla 6: Alteraciones en el splicing alternativo de algunos genes .		
Gen	Función	Referencia
Receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR)	Alteraciones en el splicing esta asociado a la transición de células epiteliales-mesenquimales, un paso importante para la formación de metástasis.	K. Holzmann,et.al.
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF),	Splicing alternativo en VEGF, produce isoformas con funciones opuestas en el control de la angiogénesis .	Hilmi, et. al.
<i>TP53, TP63, and TP73</i>	Evidencias demuestran que la aberración de la expresión de las diferentes variantes contribuyen a la progresión, y en algunos casos a la resistencia al tratamiento	J. Wei, et. al.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la leucemia aguda linfoblástica representa la primer causa de muerte por cáncer entre la población pediátrica y adultos jóvenes a nivel mundial, es importante realizar investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de nuevos marcadores moleculares, los cuales puedan ayudarnos a proporcionar mejor diagnóstico, pronóstico o tratamiento en esta población.

Los dedos de zinc son una familia de proteínas cuya función se ve involucrada con el control transcripcional. Se ha observado que la desregulación de la expresión de estos factores, provoca a su vez la alteración de la expresión de otros genes, muchos de ellos relacionados a cáncer.

Por lo anterior, se estudiará la expresión del Dedo de Zinc 695 sea en la presente tesis como un posible marcador génico asociado a la leucemia aguda linfoblástica

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión del gen *ZNF 695* en muestras de pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Caracterizar las variantes *ZNF 695* expresadas en LAL.
- 2.- Identificar características clínicas de los pacientes en estudio.
- 3.- Evaluar el valor pronóstico de la expresión del gen *ZNF695* en pacientes con LAL.

METODOLOGÍA

Selección de muestras

A partir de la base de datos del Banco de Tejidos del Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP) se realizó una búsqueda de RNA total de aquellas muestras cuyo diagnóstico fuese Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL).

Los criterios de inclusión para la elección de estas muestras fueron los siguientes:

- 1.- Pacientes tratados en el INP
- 2.- Expediente clínico completo
- 3.- Tener una concentración mínima de RNA total de 100 ng/μl
- 4.- Que el valor de la relación 260/280 se aproximara a 2, y el de la relación 260/230 se encontrara en un intervalo entre 2.0 y 2.2.

Las muestras control fueron donadas por cinco individuos sanos de entre 21 a 24 años, siendo algunos criterios de inclusión:

- 1- Tener una concentración mínima de RNA total de 100 ng/μl
- 2.- Que el valor de la relación 260/280 se aproximara a 2, y el de la relación 260/230 se encontrara en un intervalo entre 2.0 y 2.2.

Revisión de expedientes clínicos

Durante la revisión de expedientes se incluyeron los siguientes datos clínicos: género, diagnóstico , edad de diagnóstico , fecha de diagnóstico , estatus actual , si hubo o no respuesta a la ventana de esteroides , si existió o no inducción a la remisión , si hubo presencia de recaídas; y de ser el caso cuántas hubieron.

Procesamiento de las muestras

Una vez obtenida la información anterior, las muestras se procesaron de la siguiente manera:

RT-PCR

La Retro-Transcripción se realizó en dos pasos de la siguiente manera:

Se preparó el DNA complementario (cDNA) por el kit *High Capacity cDNA Reverse* de la siguiente forma :

Se cuantificó y verificó la pureza del RNA total con el espectrofotómetro *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000*. En un tubo Eppendorf de 200µl se colocó Buffer de DNasa llegando a una concentración final (Cf) de 1x y 1 u DNasa. Para cada muestra se tomó el volumen necesario del vial primario para convertir 2 µg de RNA a cDNA y se aforó a 10 µl con Agua desionizada. Se incubó en el termociclador *Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystem (AB)* a 37 °C por 30 minutos. Fue añadido EDTA (5Mm) a cada tubo y se prosiguió incubando a 65 °C por 10 minutos.

Tomando en cuenta la cantidad del número de reacciones, se preparó un Master Mix con los siguientes reactivos por reacción: RT Buffer Kit (Cf=2x) , dNTPs(Cf=8 mM), RT Random Primers (Cf=2x) , Multiscribe Reverse Transcriptase (50 u) y agua desionizada .

Se agregaron 10 µl del Master Mix a cada tubo Eppendorf y se inició la incubación en el termociclador con la siguiente programación: 25 °C /10 minutos, 27 °C/120 minutos , 85°C/ 5 minutos y 4 °C/ α .

Amplificación RPL4

Se evaluó la integridad del RNA total mediante la realización de una PCR con el gen *RPL4 (house keeping)* bajo las siguientes condiciones:

Por reacción se preparó un Master Mix con Buffer de Taq (Cf=1.2x), MgCl₂ (2.6 mM), dNTPs (Cf=0.4 mM), Primer Forward 5' CGA ATG AGA GCT GGC AAA GGC AAA 3',(Cf=20 pM) y Primer Reverse 5' ACG CCA AGT GCC GTA CAA TTC ATC 3'Secuencia (Cf=20 pM), Taq Polimerasa (1.25 u), 16.75 µl de agua desionizada y el volumen necesario para agregar 100 ng de cDna(2ul).

Para evidenciar la presencia del gen RPL4 se preparó un gel de Agarosa al 2.0% con Bromuro de Etidio y se dejó correr por 60 minutos a 60 Volts en una solución de TBE al 0.5%. El gel fue revelado en el transiluminador *High Performance UV Transilluminator (UVP)*,

Amplificación ZNF695

Se realizó una PCR del gen de interés (*ZNF 695*) bajo las siguientes condiciones por reacción: de Buffer de la Taq 15u , MgCl₂ (3mM), dNTPs (0.4 mM), primers (forward y reverse 0.5 pM) con las siguientes secuencias respectivamente: Forward sequence ZNF695 - 5'-GCC TTT GTC TCC TTG CGG C-3', Reverse Sequence ZNF 695 5'-GGC TGT CTT CTC TGT GTT CAC GTT-3', Taq Polimerasa (1.5U), 15.75 µl de agua desionizada y el volumen necesario para agregar 100 ng de cDna(2 ul).

Esta reacción se llevó al termociclador cuyo programa de ciclaje fue el siguiente: 94°C/5 minutos, 94°C/45 segundos, 63°C/45 segundos, 72°/45 segundos, 72 °C/7 minutos, 4°C/ α por 35 ciclos.

Después se preparó un gel de Agarosa al 2.5 %, el cual se corrió a 80 volts por 80 minutos en una cámara de electroforesis con una solución de TBE al 0.5 %. Se reveló el gel en el transiluminador y se capturó dicha imagen en el fotodocumentador.

Caracterización de isoformas

Por otra parte se secuenciaron dos de la tres bandas (banda B yC) presentes en el gel de agarosa mediante el kit *Big Dye*. Para ello las bandas fueron purificadas mediante una columna de membrana.

Una vez purificado el cDNA, en un tubo Eppendorf se colocó Buffer de secuenciación Big Dye (0.5 x), Mix de reacción (0.4x), Primer forward o reverse (16 pM) ,10 ng del templado y el volumen de agua desinozada necesaria para aforar a 20 ul la reacción, la cual se dejó correr en el termociclador bajo el siguiente ciclaje:96°C/2 minutos, 95°C/30 segundos, 55°C/15 segundos, 72°/40 segundos, 72 °C/1 minutos, 4°C/ α por 25 ciclos.

Finalmente la muestra se introdujo al secuenciador *Applied Biosystems 3130 Analyzer*, el cual nos proporcionó las secuencias finales que posteriormente fueron editadas y obtenidas mediante el programa *Bio edit*.

Análisis de imagen.

Se realizó un análisis densitométrico óptico relativo mediante el *software* computacional de libre acceso *Image J*. Dicho programa mide la intensidad de luz de las bandas presentes en el gel, en una escala de grises, a los cuales les proporciona valores numéricos discontinuos.

Evaluación de la expresión de ZNF695.

Finalmente se evaluó la expresión de *ZNF695* vs muestras control la cual se correlacionó posteriormente con los parámetros clínicos previamente recopilados.

Análisis estadístico.

Para realizar dicho análisis, se utilizó el programa SPSS Versión 20.0, del cual se emplearon las pruebas de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos, la prueba de T-Student para comparar los datos entre los grupos formados y la regresión logística para relacionar los eventos clínicos con los diferentes tipos de expresión.

RESULTADOS

A partir de 70 muestras de RNA de pacientes con leucemia aguda linfoblástica almacenadas en el Banco de Tejidos del Laboratorio de Oncología Experimental, 31 muestras cumplieron los criterios de inclusión para la selección de las mismas.

Una vez seleccionadas las muestras, se evaluó la integridad del RNA mediante la presencia del gen RPL4. Como se muestra en la figura 1, todas las muestras expresaron dicho gen, observándose una banda en el gel de agarosa de aproximadamente 250 pb ; representando ello un control interno de expresión y de referencia.

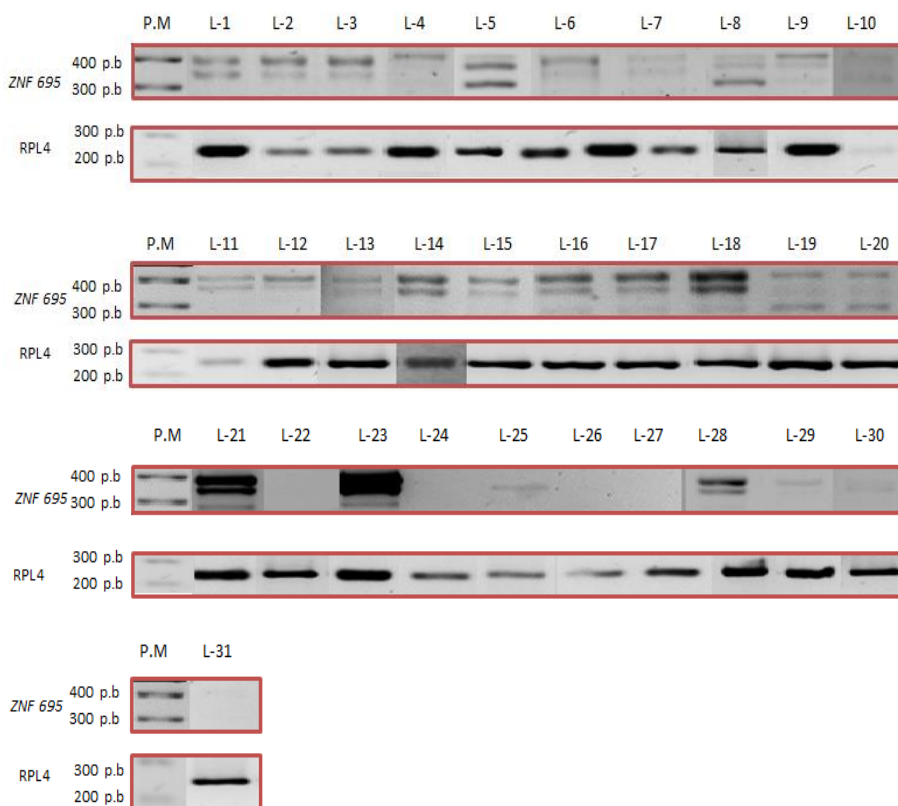


Figura 1. Expresión de ZNF695 y RPL4 en pacientes con leucemia aguda linfoblástica. Se observa una expresión variable, tanto en el tipo de isoformas expresadas como en la intensidad de las mismas.

Una vez asegurada la integridad del RNA, se prosiguió a evaluar la expresión del gen *ZNF695*; se denota la presencia de 1, 2 y /o 3 bandas en las muestras de pacientes con leucemia aguda linfoblástica. La primera banda (A) representa tanto a la primera, la segunda y tercera isoforma del gen *ZNF 695* con un peso de aproximadamente 400 pb. Amplificaron todas las isoformas debido a que los primers diseñados no fueron específicos para alguna de ellas. Tanto la segunda banda (B) como la tercer banda (C) representan nuevas variantes aún no reportadas, las cuales no codifica para una proteína. Esto se comprobó mediante la secuenciación de las bandas. Figura 2 y 3.

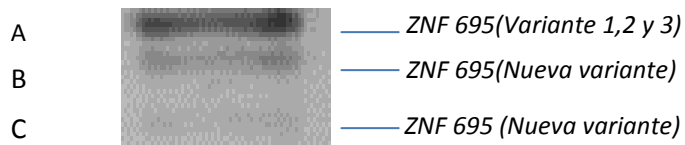
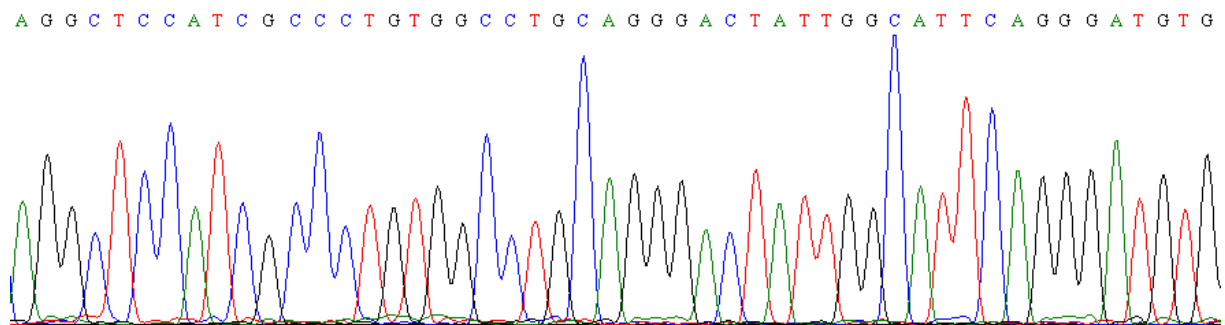


Figura 2. Bandas presentes en el gel de agarosa al 2.5%. Se observa la presencia de tres bandas (banda A, B, C). La banda A representa a la variante 1, 2 y 3, la banda B representa a una nueva variante y la banda C a otra nueva variante no codificante.

A)



B)

AGGCTCCATCGCCCTGTGGCCTAAAGGACTATTGGCATTTCAGGGATGTGGCTCT
 AGAATTCTCTCCAGAGGAGTGGGAATGCCTGGACCCAGCTCAGCGGAGTTTGT
 ATAGGGATGTGATGTTAGAGA

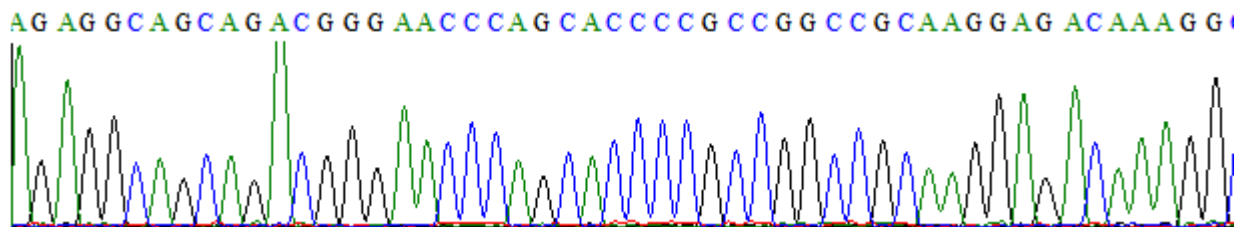


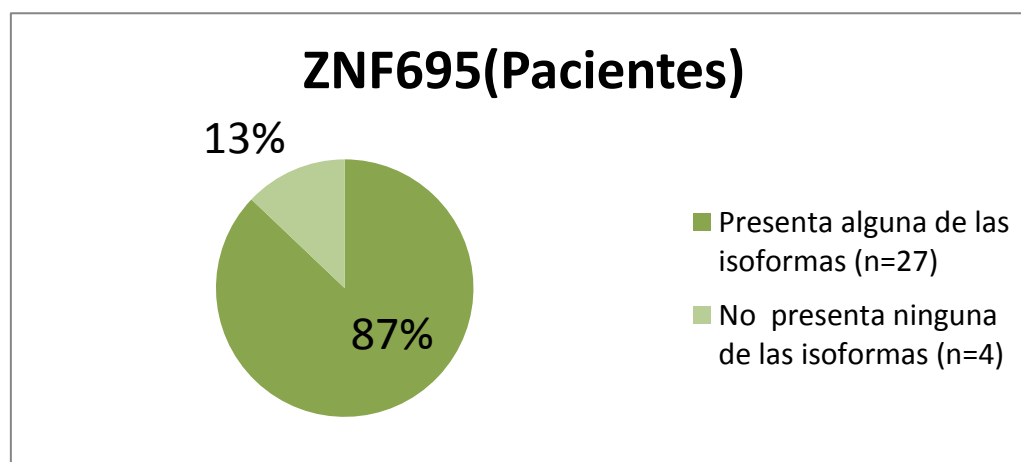
Figura 3: Secuenciación amplicón intermedio y pequeño. A) Secuencia correspondiente al amplicón de mediano peso molecular. Se identificó un sitio de splicing entre el segundo y tercer exón B) Secuencia formada por el programa *Bioedit* a partir de la secuencia 3'→5'. Se identificaron dos sitios de splicing, uno entre el exón 1 y 2 y otro entre el exón 2 y 3.

Expresión de ZNF695

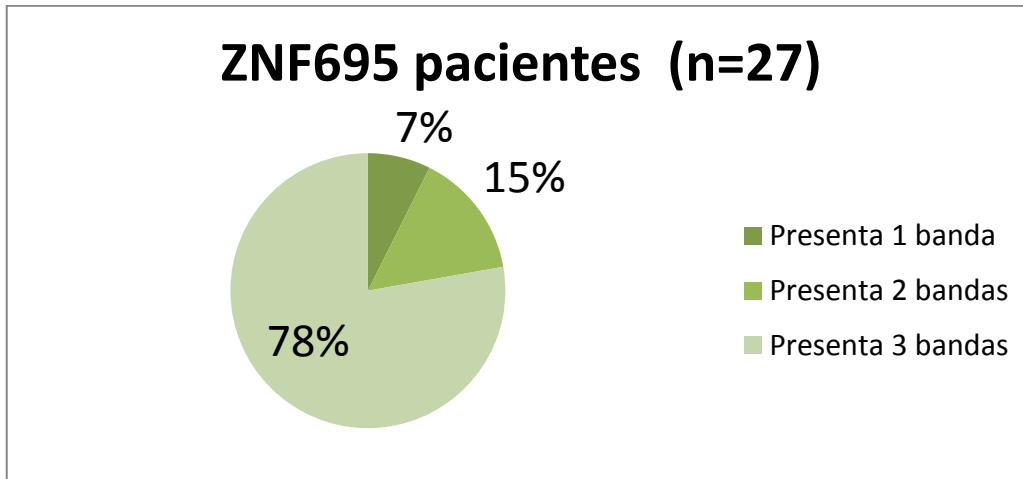
En general, se aprecia que el 87% de la población expresa alguna de las isoformas de ZNF695 (n= 27), mientras que el 13 % restante (n=4) no mostró la presencia de alguna de ella. Gráfica1 (a).

Del 87% (n=27) de los pacientes que presentaron alguna banda, el 78 % de ellos expresaron las tres bandas, 15% dos bandas y solo 7% presentó una banda Gráfica 1.

A)



B)



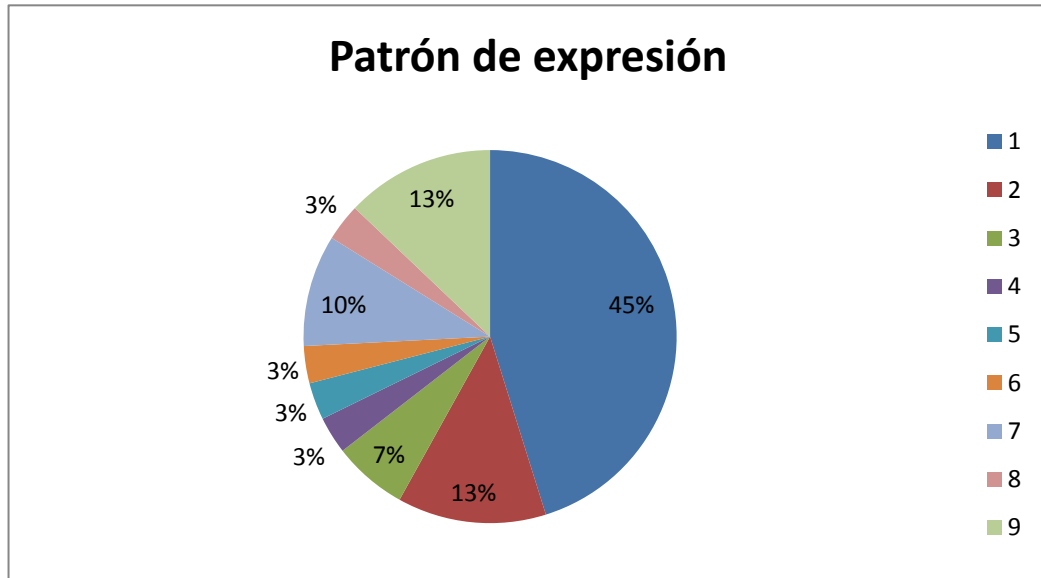
Gráfica 1: Expresión de ZNF695 en pacientes con LAL A) Expresión general de ZNF695. B) Expresión desglosada de ZNF695.

Estas tres bandas se expresan de diferente manera en cada paciente, de ello que se pudieran evidenciar que existen diferentes patrones de acuerdo al grado de expresión que cada una de ellas presentaba. Figura 3.



Figura 3: Patrones de expresión de ZNF695 Se evidenciaron nueve diferentes patrones de expresión entre la población, siendo el más frecuente el patrón 1 (n=14), donde la banda mayormente expresada es la A, seguida de la B y C.

De lo anterior, se denotó que el 45% de los pacientes presentaron el primer patrón de expresión, seguidos en orden decreciente del patrón 2 y 9 con un 13%, el patrón 7 con un 10%, el patrón 3 con un 7% y los patrones 4,5,6 y 8 con un 3% Gráfica 2.



Gráfica 2: Porcentaje de pacientes que mostraron los diferentes patrones de expresión de ZNF695.

Una vez conocida la expresión de ZNF695 en pacientes con leucemia aguda linfoblástica, se evaluó la expresión en muestras controles para poder identificar si existía una desregulación en el tipo de expresión de dicho gen.

La imagen 4 muestra la expresión de las muestras control. En la imagen se observa una clara disminución de la expresión de ZNF695 en las muestras control.

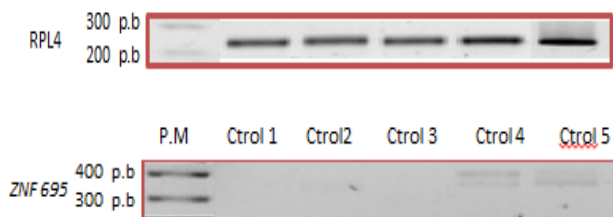
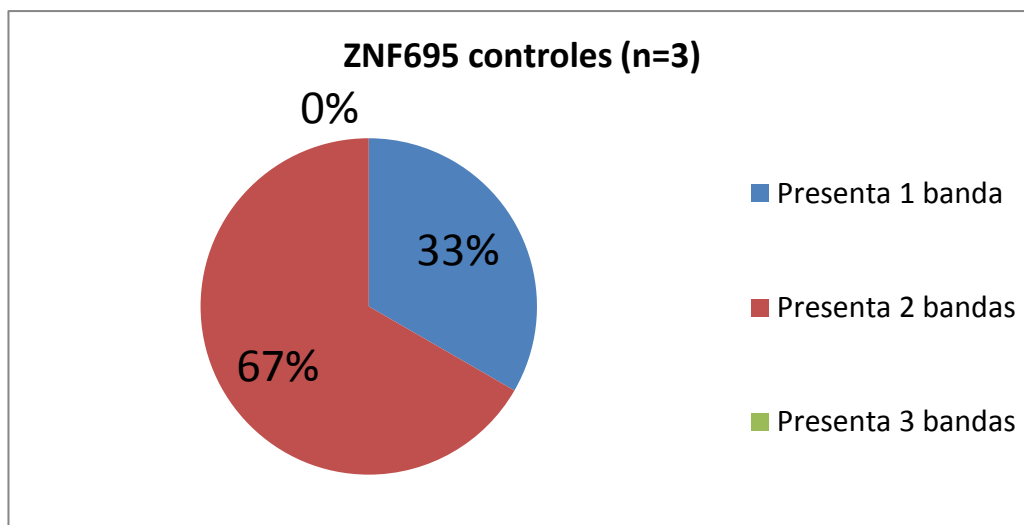
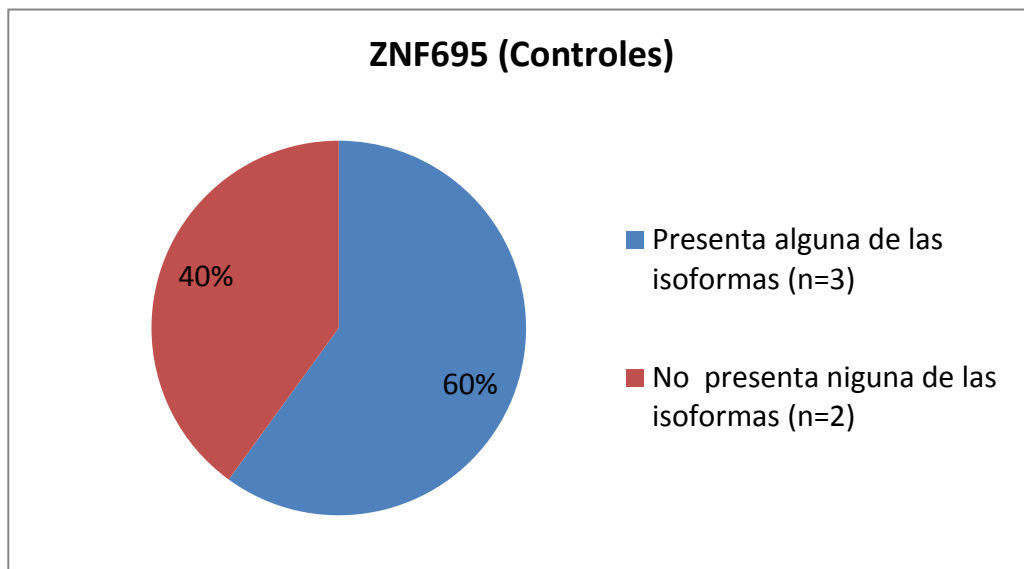


Figura 4: Expresión de ZNF695 en cinco muestras control. La expresión del gen de interés en las muestras control se observa disminuida comparada con las muestras de los pacientes con LAL; además de que solo se observa la expresión de la banda A y B.

El 60% de las muestras control presentan alguna de las bandas y 40% de ellas no presentaron la expresión de ninguna de ellas Gráfica 3(a).

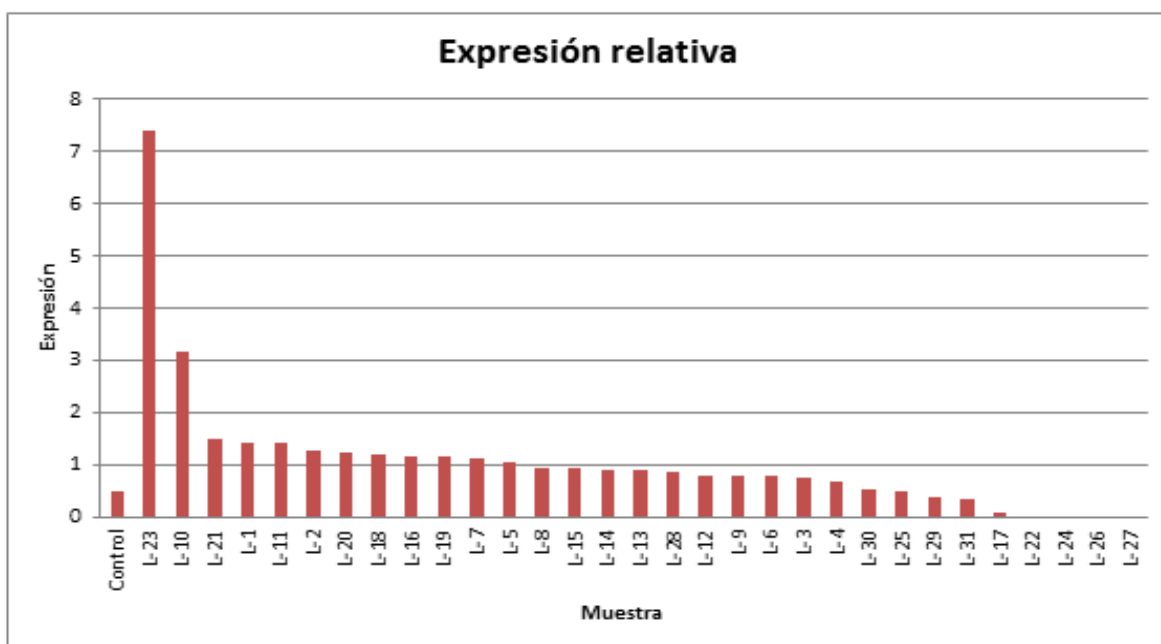
Del 60% que presentaron alguna de las bandas, 67% presentaron dos bandas (Banda Ay B) y 33% presentó una sola banda (Banda B). Gráfica 3 (b).



Gráfica 3: Expresión de ZNF695 en muestras control.A) Expresión general de ZNF695. B) Expresión detallada de ZNF695 en muestras control.

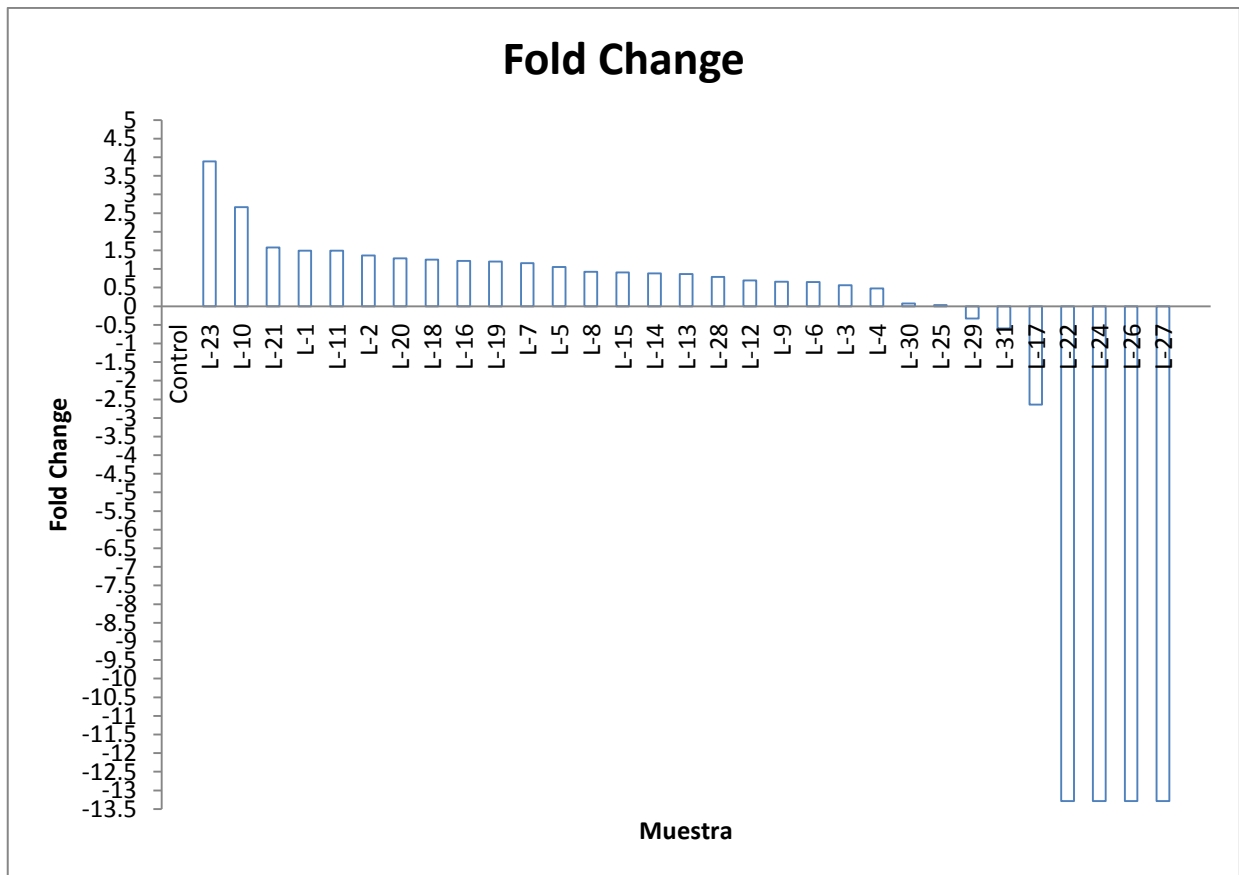
Expresión relativa de ZNF695

Después de realizar el análisis densitométrico óptico de cada banda mediante el programa *Image J*, clasificado como un análisis semicuantitativo y relativo (Anexo 1), se construyó la gráfica de expresión relativa que se muestra a continuación. Gráfica 4. En dicha gráfica se utilizaron los datos de la expresión de ZNF695, teniendo como referencia los datos del RPL4 de cada muestra; es decir, se calculó la relación donde al valor obtenido en el análisis densitométrico del gen RPL4 se le fue asignado un valor de 1 y por consecuente se determinó un valor al gen de interés.



Gráfica 4. Expresión relativa de ZNF 695.

Posteriormente se agruparon las muestras en tres grupos. El primer grupo representa a aquellas muestras que aumentaron la expresión en un 50%, el segundo grupo a aquellas donde su expresión fue igual al 50%, y el tercer grupo es aquel donde se observa una disminución de expresión igual o mayor al 50% Gráfica 5.



Gráfica 5: Fold change de ZNF 695.

Para determinar si estadísticamente este cambio en la expresión era significativo, se verificó primeramente la normalidad de los datos con la Prueba de Kolmogorv-Smirnov Z; al ser positiva dicha verificación, se aplicó posteriormente una T-Student, tendiendo como valor a comparar el valor normalizado de las muestras control (Control=0) Tabla1.

Tipo de expresión	Número de pacientes y porcentaje.	Prueba de Kolmogorov - Smirnov Z (valor de p)	T-test (valor de p)
Aumento de expresión	20 (64.52%)	0.137	0.00000001
Expresión normal	6 (19.35%)	0.995	0.854
Disminución de la expresión	5 (16.13%)	0.241	0.006

Tabla1: Pruebas estadísticas realizadas mediante el programa SPSS V.20. Los grupos denominados como: aumento, de expresión, expresión normal y disminución de expresión. Prueba de Kolmogorov-Smirnov Z. Se observa que los tres grupos cumplen con la prueba de normalidad, ya que $p > 0.05$ en todos los casos.

Los grupos donde hubo un cambio estadísticamente significativo fueron los grupos denominados de aumento y disminución de la expresión ($p < 0.05$); dichos grupos son los que posteriormente se utilizaron para tratar de identificar si existía alguna relación entre estos tipos de expresión y algún evento clínicos.

Asociación de tipo de expresión de ZNF695 (aumento o disminución) con distintos datos clínicos (Inducción a la remisión, Respuesta a la ventana de esteroides, reinducciones y estatus).

El conjunto de gráficas (Gráfica 6-17) describen cómo es el comportamiento de la asociación entre el aumento o disminución de expresión respecto a diferentes eventos clínicos.

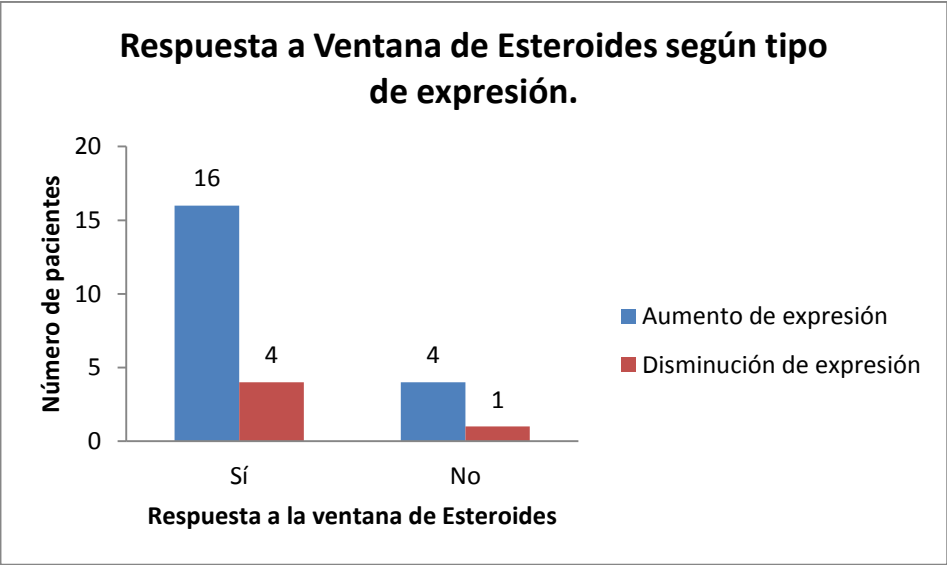
Respecto a la respuesta a la ventana de esteroides, no se observa un cambio considerable entre ambos grupos, ya que se sigue la misma tendencia, pues en 80% de los casos hubo respuesta a la ventana de esteroides y en un 20% no, esto se observó en los dos grupos.(Gráfica 6-8).

Para el parámetro clínico “Inducción a la remisión” se notó que en los pacientes donde hubo un aumento de expresión, en el 70% de los casos existió un inducción a la remisión, mientras que en el porcentaje restante no. Para los pacientes donde

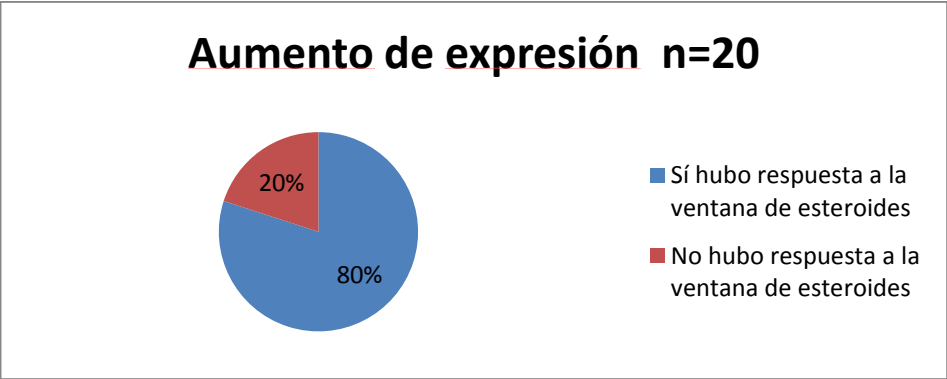
hubo una disminución estadísticamente significativa de la expresión de ZNF795, en el 100% de los pacientes hubo una inducción a la remisión.(Gráfica 9-11).

Respecto a las recaídas, se observó el 40% de los casos donde hubo un aumento de expresión no hubo recaída alguna, mientras que en el segundo grupo el porcentaje disminuyó a un 20%.(Gráfica 12-14).

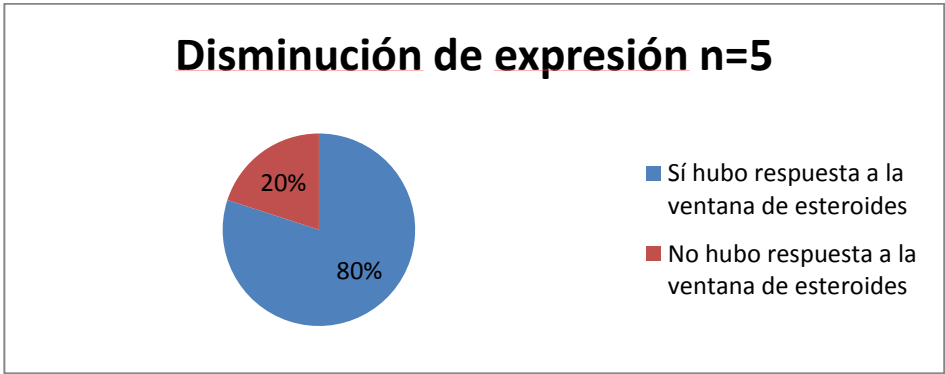
De las muertes causadas por la enfermedad (n=7), se observa que cuando la expresión aumenta a un 50%, el 83% de ellas se localizan dentro de este grupo. Al momento de aumentar el valor de corte a un aumento de 100%, se observa que 67% de los pacientes que murieron por la enfermedad se mantienen en este grupo.(Gráfica 15-17).



Gráfica 6.

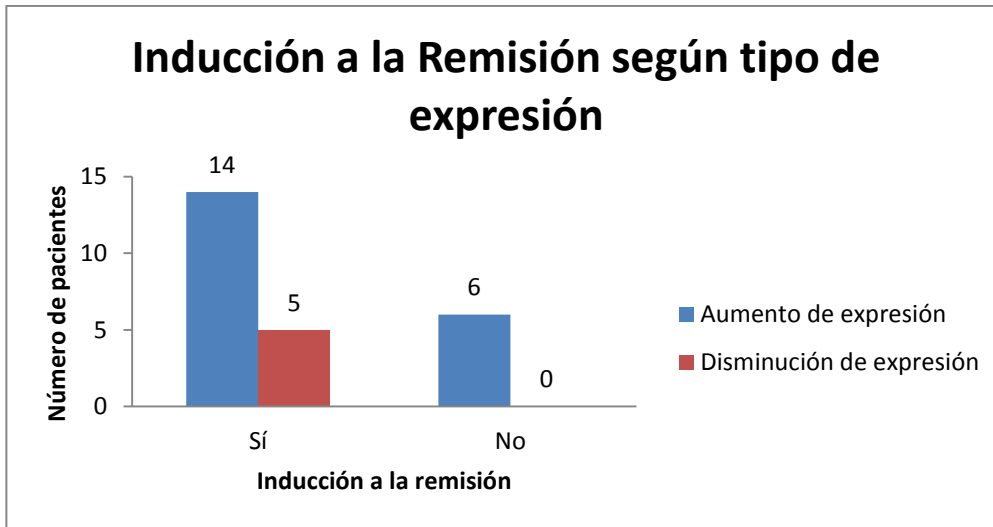


Gráfica 7.

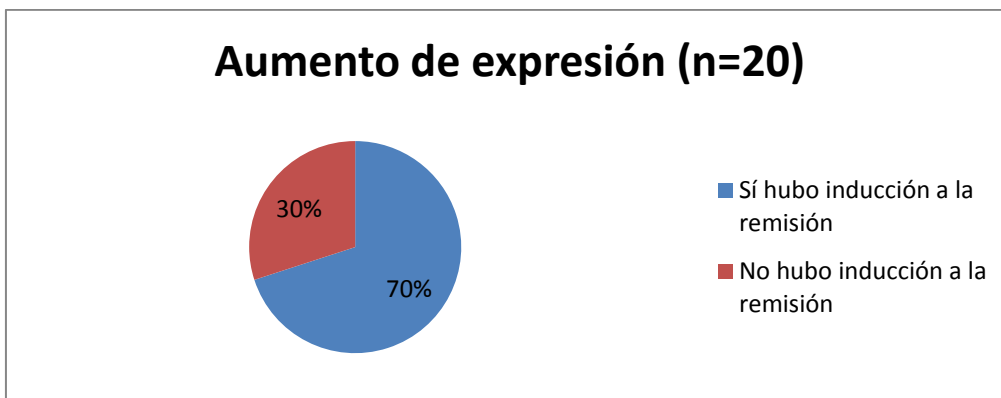


Gráfica 8

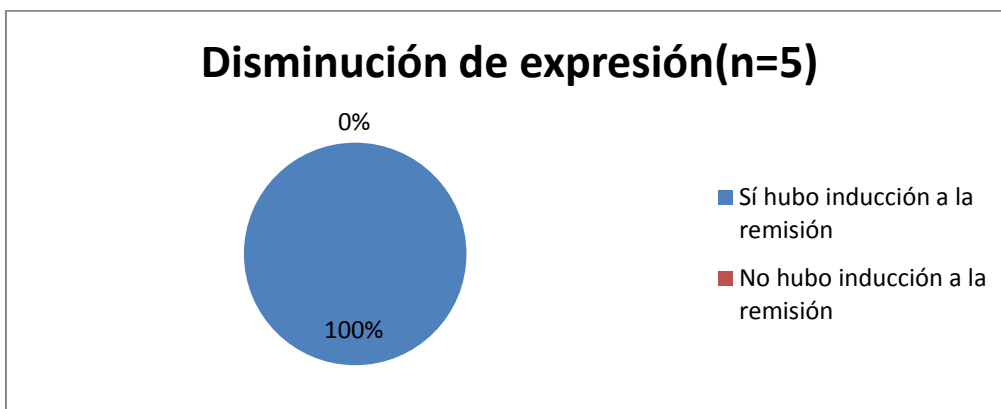
Gráfica 6-8. Respuesta a la ventana de esteroides según tipo de expresión de ZNF695.



Gráfica 9

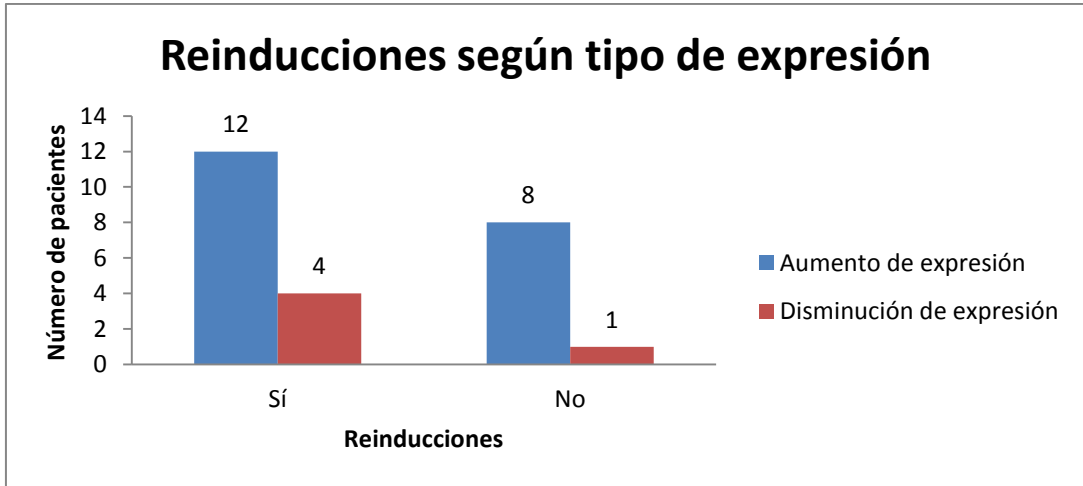


Gráfica 10

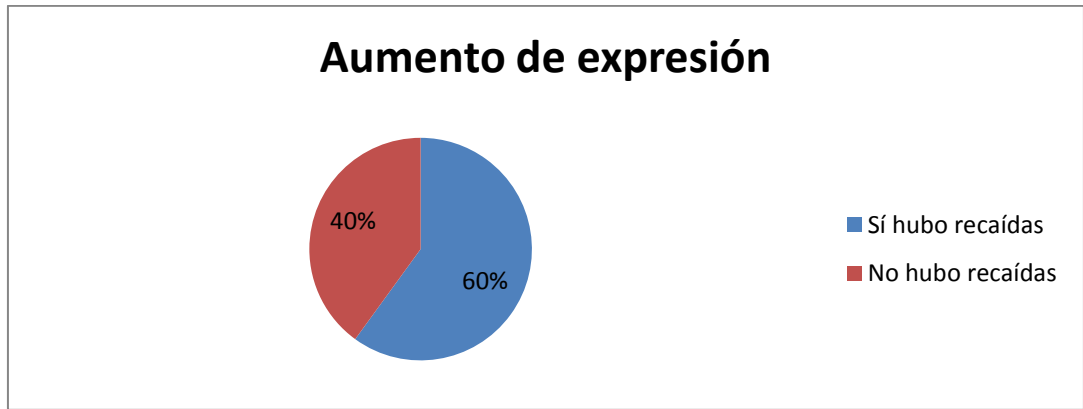


Gráfica 11

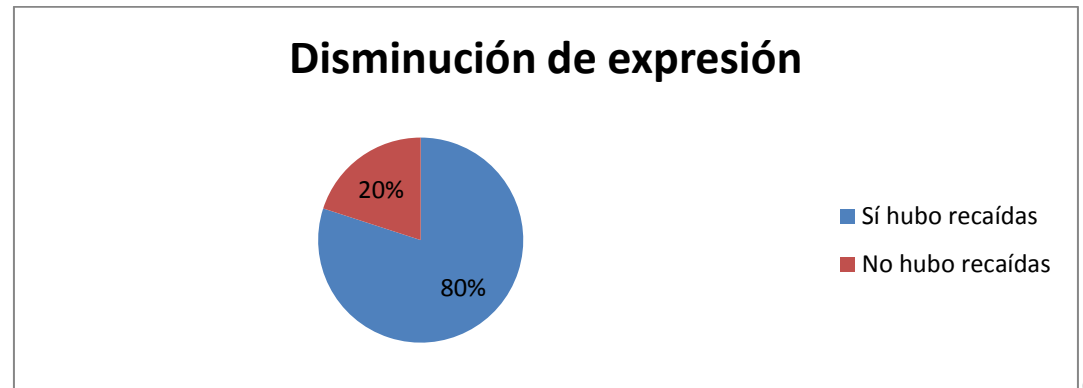
Gráfica 9-11. Inducción a la remisión según tipo de expresión de *ZNF695*.



Gráfica 12

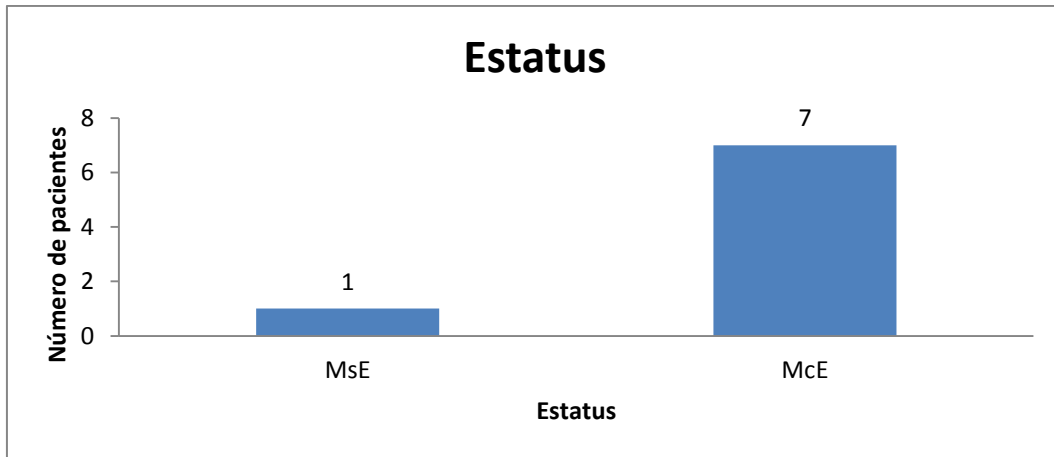


Gráfica 13

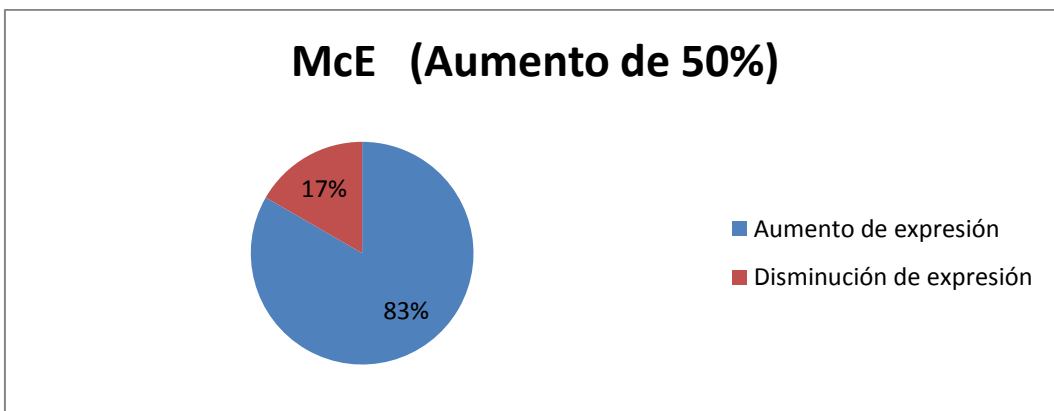


Gráfica 14

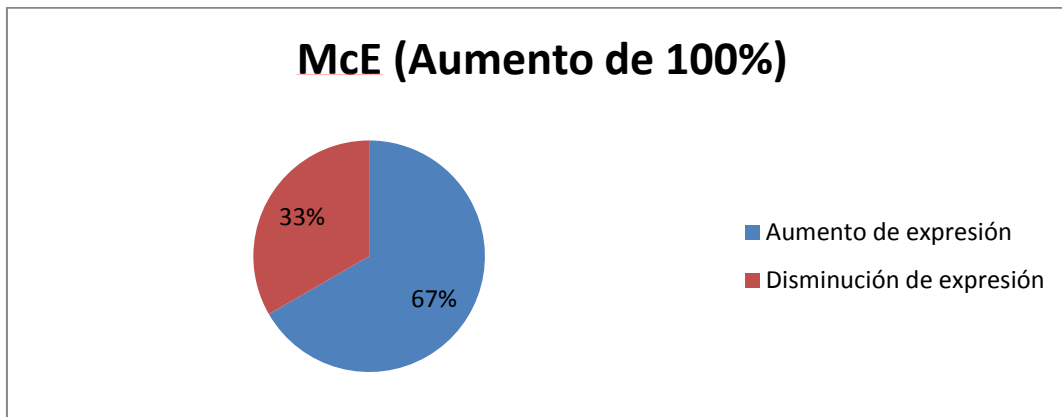
Gráfica 12-14. Reinducciones según tipo de expresión de *ZNF695*.



Gráfica 15



Gráfica 16



Gráfica 17

Gráfica 15-17. Muertos con enfermedad (McE) según tipo de expresión de ZNF695.

A los datos descritos anteriormente se les aplicó una prueba estadística denominada regresión logística binomial, la cual indica si existe una relación de las características clínicas (inducción a la remisión, respuesta a la ventana de esteroides, recaídas y muertes causada por la enfermedad) con los diferentes tipos de expresión.

Se evaluaron los grupos de pacientes con un aumento de expresión vs pacientes con expresión normal y los pacientes con una disminución de expresión vs expresión normal para determinar si el tipo de expresión se asocia con algún evento clínico descrito en la base de datos.

Las Tablas 2 Y 3 muestran que ninguna de las variables se asocia de manera directa con el tipo de expresión presente en los dos grupos (aumento y disminución de expresión) ya que el valor de p, en todos los casos, es mayor a 0.05.

Tabla 2: Valor de significancia obtenido después de realizar la regresión logística binomial del grupo de aumento vs expresión normal.	
Variable	Significancia
Inducción a la remisión	0.999
Respuesta a la ventana de esteroides	0.856
Recaídas	0.940
Estatus (McE)	0.999

Tabla 3: Valor de significancia obtenido después de realizar la regresión logística binomial del grupo de disminución de expresión vs expresión normal.

Variable	Significancia
Inducción a la remisión	0.999
Respuesta a la ventana de esteroides	0.859
Recaídas	0.877
Estatus (McE)	0.983

DISCUSIÓN

Actualmente la leucemia aguda linfoblástica representa a nivel mundial el tipo de cáncer más frecuente entre la población pediátrica y adultos jóvenes. Aunque en general se ha observado que la tasa de mortalidad ha disminuido considerablemente en los últimos años, debido al avance de la medicina; también es un hecho que aproximadamente el 20% de los pacientes no responden al tratamiento, mientras que el porcentaje restante, aunque responden al tratamiento, tienden a presentar recaídas recurrentes.

Dichas recaídas se encuentran asociadas a factores de predisposición génica, los cuales dependiendo de su presencia o ausencia, favorecen o predispone el pronóstico del paciente. En particular, es poco conocida la participación de los dedos de zinc en la leucemia aguda linfoblástica, sin embargo se sabe que muchos de ellos regulan la expresión génica, inhibiendo o promoviendo la transcripción de diferentes genes, como por ejemplo *IKAROS*. Esto nos permitiría encontrar un marcador génico que nos pudiera guiar acerca del comportamiento de la enfermedad, ya que de esta manera se le podría proporcionar al paciente el pronóstico más certero, que a su vez ayudaría a brindar el tratamiento más apegado a sus necesidades, y por lo tanto a tener una completa remisión de la enfermedad.

La expresión del gen ZNF695 en los pacientes con leucemia aguda linfoblástica se observó una gran diversidad en el grado y tipo de expresión de las variantes. Esto concuerda con lo descrito en literatura, pues se ha definido a la leucemia como una enfermedad con un amplio espectro de expresión de diferentes moléculas causada por la complejidad de la enfermedad misma y por la variabilidad biológica de cada individuo. Por ejemplo, los antígenos expresados en las distintas leucemias son muy variados, y aunque se sabe que algunos de ellos se utilizan como guía para poder diagnosticar la leucemia aguda, la forma y grado de expresión de estas moléculas son diferentes en cada paciente. Este comportamiento se observa igualmente en la tan heterogénea expresión de las variantes de ZNF 695 tanto en tipo como en grado de expresión presentado.

La presencia de las tres bandas en el 78% de los pacientes nos indica que existe una co-expresión. Esta co-expresión podría verse implicada con la patogénesis de la leucemia, ya que al comparar estos resultados contra la de los controles es claro que la mayoría de las muestras normales únicamente presenta dos bandas (A y B).

Por otro lado, ninguna muestra control expresó la tercer banda, esto podría sugerir que la desregulación de la expresión de esta isoforma se encuentra relacionada con algún evento en particular del cáncer; sin embargo, para poder responder esta pregunta sería necesario realizar estudios funcionales que nos indiquen cual es el papel que juega esta isoforma en la leucemia aguda linfoblástica; aunque gracias a la secuenciación realizada, la cual se comparó contra la secuencia ya reportada, se sabe que estructuralmente es un RNA largo no codificante, pues no presenta el nucleótido que codifica para el codón de inicio. En general se conoce que los RNA largos no codificantes funcionan como moduladores transcripcionales mediante la regulación epigenética del DNA que finaliza en la remodelación de la cromatina. (Esteller M., 2009)

Respecto a las patrones de expresión, se observa que el primer patrón se presenta en la mayoría de los pacientes; sin embargo, este en particular no se encuentra relacionado con ningún evento clínico del grupo en específico, aunque esto no significa que no se encuentre relacionado con algún otro suceso como la metástasis, la angiogénesis o el crecimiento descontrolado celular, por dar algunos ejemplos, para lo cual se propone realizar posteriormente estudios asociados a las variables anteriormente mencionadas.

Es bien sabido que la expresión de todos los genes debe estar bien regulada, y más aquellos genes que regulan la expresión de otros, como lo es *ZNF 695*, ya que un aumento en la expresión podría incrementar a su vez la represión de la expresión de otros genes, basados en la estructura de KRAB. Es más, incluso se podría decir que la expresión debe ser regulada de manera casi perfecta , pues un aumento sutil de ella podría ser la diferencia entre mostrar un evento patológico o encontrarse sano (Cooper T., et. al, 2009).

La comparación de la expresión entre las muestras controles y las muestras de pacientes con LAL, mostró que la mayoría de los pacientes aumentaron más del 50% la expresión total del gen (64.52%). Este aumento podría a su vez incrementar la función represora de las variantes 1, 2 y 3. Ahora bien, después de conocer que en el 83.87% de los pacientes, la expresión del gen se encuentra desregulada, fue importante indagar si alguno de los eventos clínicos más importantes, se encontraban relacionados con dicha alteración, para lo cual, se compararon los resultados del grupo con LAL contra el grupo denominado "expresión normal". El análisis descriptivo nos indicó una probable asociación entre el aumento de la expresión y las muertes producidas por la enfermedad, ya que del 100% de los pacientes que fallecieron (n=8), 7 murieron por la enfermedad y aumentaron su expresión un 50%. Al aumentar el valor de corte a un 100% de aumento de expresión, se mantuvo el 67% de las muestras con la enfermedad; esta información refuerza la idea acerca de que las muertes pueden estar relacionadas de alguna manera con el aumento de la expresión del gen ZNF695. Respecto a los demás eventos clínicos (respuesta a la ventana de esteroides, recaídas e inducción a la remisión) no se observó una diferencia clara entre los grupos, probablemente por la desigualdad en el tamaño muestral de cada uno; sin embargo, si solo nos enfocamos al grupo donde hubo un aumento de expresión, debido a que el tamaño muestral es más representativo (n=20), se observa que existe una respuesta favorable en más del 60% de los pacientes en las variables de inducción a la remisión y respuesta a la ventana de esteroides. Mientras que para la variable de recaídas se observa igualmente que el 60% de ellos tienen alguna. Esto nos podría indicar que la desregulación de este factor de transcripción finaliza en la activación o inactivación de diversos genes con funciones totalmente diferentes.

Pues bien, después de haber mostrado los resultados obtenidos durante esta tesis, es importante puntualizar que esta línea de investigación abre las puertas para seguir realizando otros experimentos que puedan responder alguna de las preguntas generadas durante la misma, pues la aportación que puede llegar a tener en el ámbito médico puede ser de importancia, ya que la leucemia, y el cáncer en general, es una de las enfermedades más complejas y de mayor incidencia en el mundo.

CONCLUSIONES

- 1.-Se observó el incremento de la expresión en 64.52 % de los pacientes y una disminución 16.13% de los mismos, lo que nos habla de una clara desregulación de la expresión de este gen, la cual podría verse implicada con la presencia de la enfermedad *per se*.
- 2.-Se lograron identificar dos nuevas variantes, de las cuales la tercera podría verse implicada con la patogénesis.
- 3.-Se encontró una relación aparente con las muertes provocadas por la leucemia aguda linfoblástica.

BIBLIOGRAFÍA

Muñoz , Alberto ; *Cáncer.Genes y nuevas terapias*; Editorial Hélice; España ; 1997; p. 18.

Organización Mundial de la Salud; *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012* [On line] , **2012**, p.p 35.

Hanahan, Douglas ; Weinberg , Robert A. ; The Hall Marks of Cancer [En línea]. *Cell*. **2010**. Vol.100, p.p 57-70.

Hanahan, Douglas ; Weinberg , Robert A. ; Hall Marks of Cancer: The next generation [En línea]. *Cell*. **2011**. Vol.144, p.p 646-674.

Rodak, F.Bernadete; *Hematología : fundamentos y aplicaciones clínicas* ; 2ª edición ; Médica Panamericana ; Buenos Aires ; 2004 ; p.p 455-463.

Hernán Vélez A, *et. al*; *Hematología* ; 6ª Edición , Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB),Colombia, 2004, p.p 118-122 .

Mejía, Juan; *et.al.* ; Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 1 [Eb línea] ; *Revista Médica del IMMS*, 2005,43(4), p.p 323-333.

National Cancer Institute ; *Instantánea . La leucemia* [On line], **2011** , p. 2.

Jasso, Luis ; *et.al.*; Estudio de caso: estimación de los costos de la quimioterapia aplicando el protocolo completo en niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin [En línea] , *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* , **2012**,.69 (1).

Labardiniti, Juan, *et.al.*; Leucemia Aguda Promielocítica [En línea]. *Cancerología* .**2011**, 6, p.p 104.

Leuckemia & Limphoma Society ; *Leucemia Linfoblástica Aguda* [On line] **2010** , p. 52.

Duan, Zhenfeng , *et.al.*;ZNF 93 Increase Resistance to ET-743 (Trabectedin; Yondelis) and PM00104 (Zalypsis) in Human Cancer cell lines [En línea]. *Plos ONE*. **2009**,Vol. 4 (9) , p.p 1-10.

Duffy, Michael J.; *et.al.* ; Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients [En línea] . *Cancer Treatment Reviews*, **2011**, Vol. 37, p.p 151-159.

García, Regie ; et, al . ; Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana [En línea] , *Rev. Ciencias de la Salud*, **2012**, Vol 10 (1).

García ,Cybele; Las versátiles proteínas *Zinc Fingers* [En línea], *Revista Química Viva* , 2006 ,Vol. 5 (1) , p.p 8-18 .

Oliva Virgili, Rafael , *et.al.*, *Genética Médica*, 3ª Edición, Publicaciones i Edicions, 2005, España, p.p 41,42.

Venables,Julian P. Aberrant and Alternative Splicing in Cancer,*Cancer*,**2004**,Vol.64,p.p 7647-7654

Juárez-Méndez, Sergio, *et.al.*, Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cáncer,*Journal of Ovarian Research*,**2013**,6:61.

Esteller, Manel, Non-coding RNAs in human disease ,*Natures Reviews Genetics*,**2011**,Vol. 12.

Cooper,Thomas A., et. al, RNA and Disease,*Cell*,**2009**,Vol.136,p.p 777-793.

PÁGINAS CONSULTADAS

Organización Mundial de la Salud (OMS),
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.

Instituto Nacional de Cáncer de EE.UU , <http://www.cancer.gov> .

SMART, <http://smart.embl.de/smart/do>

GENEN CARDS, <http://www.genecards.org>

Genetic Home Reference, <http://ghr.nlm.nih.gov>

A N E X O S

A N E X O I -Resultados del análisis densitométrico óptico

Muestra	Banda A (Área)	Banda B (Área)	Banda 3C (Área)	Suma
L-1	8024.820	6130.456	0	14155.276
L-2	8211.355	6130.456	0	14341.811
L-3	7921.284	4945.213	0	12866.497
L-4	6225.042	0	2805.607	9030.649
L-5	2799.314	6029.749	6624.577	15453.64
L-6	6308.042	4466.192	2914.778	13689.012
L-7	5234.556	4545.435	3993.071	13773.062
L-8	4403.021	4229.556	7497.991	16130.568
L-9	6204.335	4315.556	4325.607	14845.498
L-10	6533.071	4131.24	6343.485	17007.796
L-11	5435.042	4805.213	2096.243	12336.498
L-12	7466.406	3462.435	2137.657	13066.498
L-13	5529.385	6805.971	2080.950	14416.306
L-14	8105.820	6181.042	2632.192	16919.054
L-15	6256.698	4854.163	2501.950	13612.811
L-16	7695.406	6831.991	3130.899	17658.296
L-17	8624.820	5906.627	2729.071	17260.518
L-18	9060.991	7814.749	2204.485	19080.225
L-19	6870.163	5158.071	6443.335	18471.569

L-20	6701.335	5111.657	6395.335	18208.327
L-21	10403.042	8515.577	5111.799	24030.418
L-22	0	0	0	0
L-23	11142.971	100777.556	5166.021	117086.548
L-24	0	0	0	0
L-25	0	6028.213	0	6028.213
L-26	0	0	0	0
L-27	0	0	0	0
L-28	7227.3550	4269.042	2464.799	13961.196
L-29	3083.627	2047.263	1222.950	6353.84
L-30	3120.021	3752.556	1821.950	8694.527
L-31	3167.364	0	0	3167.364
CONTROLES				
Muestra	Banda A (Área)	Banda B (Área)	Banda 3C (Área)	Suma
1	0	0	0	0
2	0	2690.092	0	2690.092
3	0	0	0	0
4	3224.042	2374.556	0	5598.598
5	2412.849	3262.213	0	5675.062

RPL4							
Muestra	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7
RPL4	10076.376	11182.205	17415.669	13002.477	14960.669	17559.406	12385.598
Muestra	L-8	L-9	L-10	L-11	L-12	L-13	L-14
RPL4	17062.426	18821.477	5394.891	8792.548	16209.577	15915.062	18474.163
Muestra	L-15	L-16	L-17	L-18	L-19	L-20	L-21
RPL4	14605.062	15256.355	215916.062	16071.012	16173.061	14946.184	16191.598
Muestra	L-22	L-23	L-24	L-25	L-26	L-27	L-28
RPL4	17729.062	15840.698	13134.305	11872.184	10405.255	13518.962	16276.305
Muestra	L-29	L-30	L-31				
RPL4	16054.335	16590.062	9612.033				
CONTROLES							
Muestra	1	2	3	4	5		
RPL4	6968.548	7707.619	7296.083	7489.134	8096.355		

A N E X O II.- Datos Normalización.

Normalización							
Muestra	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5	L-6	L-7
	1.405	1.283	0.739	0.695	1.033	0.780	1.112
Muestra	L-8	L-9	L-10	L-11	L-12	L-13	L-14
	0.945	0.789	3.153	1.403	0.806	0.906	0.916
Muestra	L-15	L-16	L-17	L-18	L-19	L-20	L-21
	0.932	1.157	0.080	1.187	1.142	1.218	1.484
Muestra	L-22	L-23	L-24	L-25	L-26	L-27	L-28
	0.000	7.392	0.000	0.508	0.000	0.000	0.858
Muestra	L-29	L-30	L-31				
	0.396	0.524	0.330				
CONTROLES							
Muestra	1	2	3	4	5		
	0	0.349	0	0.748	0.701		
Promedio							0.499

A N E X O III: Base de datos clínicos.

Vial	Paciente	Sexo	Edad	Expresión(Sí/No)	Expresión(Fold change)	Estatus	Respuesta a la ventana de esteroides	Inducción a la remisión	Reinducción
126	L-1	M	11	Sí	2.818	VsE	Sí	Sí	Sí
128	L-2	M	9	Sí	2.573	McE	Sí	Sí	Sí
130	L-3	M	10	Sí	1.482	VsE	Sí	Sí	No
132	L-4	F	5	Sí	1.393	VsE	Sí	Sí	Sí
139	L-5	M	4	Sí	2.072	McE	Sí	No	No
141	L-6	F	3	Sí	1.564	VsE	Sí	Sí	Sí
142	L-7	M	13	Sí	2.231	McE	Sí	No	Sí
144	L-8	F	6	Sí	1.896	VcE	No	No	Sí
157	L-9	M	8	Sí	1.582	McE	No	No	No
164	L-10	F	2	Sí	6.324	VsE	No	Sí	Sí
173	L-11	M	8	Sí	2.814	VsE	Sí	Sí	Sí
175	L-12	M	12	Sí	1.617	McE	Sí	No	Sí
248	L-13	M	15	Sí	1.817	VsE	Sí	No	No
183	L-14	F	9	Sí	1.837	VsE	Sí	Sí	Sí
202	L-15	M	3	Sí	1.870	VsE	Sí	Sí	No
212	L-16	M	3	Sí	2.322	VcE	No	Sí	Sí
218	L-17	M	5	Sí	0.160	VsE	Sí	Sí	No
250	L-18	M	3	Sí	2.381	McE	Sí	Sí	Sí
260	L-19	F	9	Sí	2.291	MSE	Sí	Sí	No
280	L-20	F	11	Sí	2.444	VsE	Sí	Sí	No
316	L-21	F	2	Sí	1.574	VcE	Sí	Sí	Sí

776	L-22	M	4	Sí	0.108	VsE	No	Sí	Sí
350	L-23	M	14	Sí	14.827	VcE	Sí	Sí	No
342	L-24	M	9	No	0.000	VcE	Sí	Sí	Sí
371	L-25	F	4	Sí	1.019	VcE	Sí	Sí	Sí
379	L-26	M	8	No	0.000	McE	Sí	Sí	Sí
397	L-27	F	4	No	0.000	VsE	Sí	Sí	Sí
417	L-28	M	4	Sí	1.721	VcE	Sí	Sí	Sí
468	L-29	F	4	Sí	0.794	vSE	Sí	Sí	Sí
712	L-30	M	8	Sí	1.051	VsE	Sí	Sí	Sí
748	L-31	M	1	Sí	0.661	VsE	No	Sí	Sí