



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CDK1, CCNB1, CDKN3 Y ESCO2 EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MIRIAM ELENA DIEGO JACINTO



MÉXICO, D.F.

2016



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: Profesor: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

VOCAL: Profesor: Dr. Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: Profesor: Dr. Sergio Juárez Méndez

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. María Benita Leonor Fernández Salgado

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Instituto Nacional de Pediatría (INP)

ASESOR DEL TEMA: Dr. Sergio Juárez Méndez

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Vanessa Villegas Ruíz

SUSTENTANTE: Miriam Elena Diego Jacinto

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCION.....	6
Cáncer.....	6
Leucemia.....	7
Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)	10
Epidemiología.....	10
Bases genéticas de LLA	12
Bases genéticas de LLA de células B	13
Presentación clínica y parámetros relacionados al curso del tratamiento de la LLA	15
Tratamiento.....	17
Cáncer y ciclo celular	20
Ciclo celular	20
Regulación del ciclo celular	22
Checkpoint mitótico y cinasa dependiente de ciclina/ciclina B1 (CDK1/CCNB1).....	24
Salida de mitosis y el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3 (CDKN3).....	26
Errores en el checkpoint mitótico y la implicación de CDK1 y CCNB1 en cáncer	28
CDKN3 y cáncer	30
Acetiltransferasa Establecedora de cohesina 2 (ESCO2): funciones durante fase S y su relación con cáncer	31
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPÓTESIS.....	36



OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Criterios de inclusión.....	37
Construcción de base de datos.....	37
Diseño de oligonucleótidos.....	39
Síntesis de cDNA.....	40
PCR punto final.....	40
Electroforesis.....	42
Análisis estadístico.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
Agrupación de la población muestral con base en género y edad.....	45
Electroforesis.....	46
Análisis cualitativo de la expresión de los genes en estudio en la población muestral	49
Descripción gráfica de patrones de expresión entre los genes de estudio en la población muestral.....	50
Descripción gráfica del porcentaje de expresión relativa de los genes en estudio en la población muestral.....	51
Análisis del número de recaídas en función de la presencia o ausencia de expresión de los genes de estudio en la población muestral.....	53
Análisis del número de recaídas en función del nivel de expresión de los genes de estudio en la población muestral.....	54

Análisis del pronóstico a 3 años del paciente pediátrico en función de la expresión de los genes en estudio en la población muestral.....	57
Análisis entre el estatus de fallecido a 3 años del paciente pediátrico contra el nivel de expresión de los genes en estudio en la población muestral.....	59
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS.....	61
ANEXO A: BASE DE DATOS.....	62
ANEXO B: GRÁFICA: NÚMERO DE RECAÍDAS POR PACIENTE EN LA POBLACIÓN MUESTRAL.....	64
REFERENCIAS.....	65

RESUMEN.

La leucemia es un tipo de cáncer que inicia en la médula ósea caracterizado por la proliferación descontrolada, supervivencia y diferenciación truncada del precursor linfocítico o mielocítico. Existen cuatro subgrupos: leucemia linfoblástica crónica (LCM), leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia mieloblástica crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA). Alrededor del mundo y en México la LLA es el cáncer infantil más común.

Debido a la naturaleza de los linfocitos, la LLA muestra dos subtipos: LLA de células B (LLA-B) y LLA de células y el T (LLA-T). De todos los casos que se diagnostican cada año en los Estados Unidos, entre el 80 y el 85% corresponde a LLA-B, y el resto al tipo T. La mayoría de los pacientes pediátricos con LLA-B muestran una supervivencia media de solo 60 meses. Puesto que la recurrencia de la enfermedad es alta y existe una pobre respuesta al tratamiento por parte de algunos pacientes, es importante la identificación de nuevas moléculas cuyo uso pueda ayudar a establecer un diagnóstico más eficiente, de tal manera que sea posible aplicar mejores esquemas de tratamiento, lo que daría como resultado un mejor manejo del paciente.

En la célula durante el ciclo celular, se duplica con exactitud el DNA de los cromosomas para segregar las copias con precisión en dos células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales: G1 (Gap1), S (Síntesis), G2 (Gap 2) y M (Mitosis). Es regulado mediante un sistema de control independiente cuyos componentes son las proteínas cinasas dependientes de ciclina (CDK), cuya actividad depende de la asociación con subunidades reguladoras denominadas ciclinas. Los complejos ciclina-CDK involucrados directamente en el ciclo celular incluyen durante la interfase a CDK2, CDK4 y CDK6, en mitosis a CDK1 y 10 ciclinas que pertenecen a cuatro diferentes clases, ciclinas A, B, D y E.



Alteraciones en la expresión o actividad de las CDKs, en particular CDK1, son frecuentemente observadas en varios tipos de tumores sólidos como: cáncer de pulmón, colon y mama. En LMA, se observó la expresión de CDK1 en núcleo y su correlación pronóstica es favorable. La localización subcelular de CDK1 se vio influenciada por RAR (receptor para ácido retinoico) cuando el tratamiento incluyó ácido retinoico. Por otra parte, CDK1 es activado por ciclinas tipo A, formando específicamente un complejo con ciclina B1 (CCNB1), en conjunto regulan la transición a la mitosis.

Adicionalmente, la expresión sostenida de CCNB1 mantiene a CDK1 activa, promoviendo el arresto mitótico e inducción a la apoptosis por fosforilación de proteínas proapoptóticas (BCL).

Por otra parte, evidencia indica que complejos específicos ciclina-CDK son modulados por inhibidores, responsables de mantener el estado quiescente en diferentes poblaciones celulares, importante para mantener la homeostasis de la célula. Se sabe que el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 3 (CDKN3), se une selectivamente a CDK2 inhibiendo la expresión de proteínas requeridas para la transición G1/S. En contra parte, en carcinoma hepatocelular se ha reportado la sobreexpresión del gen CDKN3, y su relación con el pronóstico desfavorable.

Finalmente, durante la fase S la cohesión de las cromátidas hermanas es mediada por cohesina, y regulada por soronina, en conjunto son esenciales para la segregación cromosómica, el reclutamiento de estas dos moléculas depende de las acetiltransferasas (ESCO 1 y 2), pero principalmente ESCO2, sugiriendo un papel importante durante la fase S en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

INTRODUCCION

Cáncer

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades ocasionadas por cambios en los mecanismos de proliferación, muerte y diferenciación celular, consecuentemente las células afectadas adquieren la capacidad de migrar e invadir tejidos [56].

El proceso mediante el cual se genera el cáncer, se conoce como carcinogénesis e involucra múltiples pasos (iniciación, promoción, transformación y progresión). Es ocasionado por modificaciones en protooncogenes y genes supresores de tumor, que predisponen a la célula a la adquisición de alteraciones genéticas, que a su vez ocasionan la obtención de un completo estado neoplásico [1,56].

Weinberg y colaboradores proponen que para el desarrollo de cáncer, las células sanas progresan hacia un estado neoplásico adquiriendo sucesivamente características esenciales (*hallmarks*). Actualmente están validados seis *hallmarks* [1] (Figura 1).

Figura 1. Características esenciales del cáncer. 1. Señales de proliferación sostenida, 2. Evasión de los supresores de crecimiento, 3. Invasión y metástasis, 4. Inmortalidad, 5. Inducción de angiogénesis, 6. Resistencia a señales de muerte. Modificada de *Hallmarks of cancer: the next generation. (2011)*



Con base en el sitio de aparición del tumor la enfermedad se clasifica en [2]:

Carcinoma: se origina en la piel o en los tejidos que revisten los órganos internos.

Sarcoma: en hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido de sostén.

Linfoma: en células del sistema linfático.

Mieloma: en células plasmáticas.

Leucemia: en tejido hematopoyético.

Leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer que ataca a células del sistema hematopoyético. Principalmente daña a células en la médula ósea, pero también puede afectar el bazo, ganglio linfático, timo e hígado. En la médula ósea provoca la producción de gran número de células sanguíneas inmaduras y su salida hacia el torrente. Se ha propuesto que la enfermedad, se origina por la alteración de los mecanismos de crecimiento, diferenciación, proliferación y muerte en células progenitoras (*stem cells*) hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) [3,8].

El proceso mediante el cual se generan células sanguíneas maduras al mismo ritmo al que se pierden, se conoce como hematopoyesis. Una HSC, posee un gran potencial de autorenovación. A lo largo de la vida del organismo, esta población se encarga de regenerar todos los tipos celulares sanguíneos por diferenciación a alguna estirpe definida, dicho proceso, causa que el potencial de desarrollo de estas células quede gradualmente restringido [3,57].

Factores de transcripción y remodeladores de la cromatina regulan el desarrollo hematopoyético en etapas tempranas, antes de la generación del progenitor multipotente (MPP por sus siglas en inglés). Su desregulación está implicada en mecanismos genéticos que provocan: a) translocaciones, que generan la fusión de genes o que desregulan la expresión génica, b) aberraciones en el número de copias de cromosomas o, c) mutaciones en genes específicos; promoviendo el desarrollo de leucemia de células B o T [3, 57].

Un paso temprano en la hematopoyesis, consiste en el proceso mediante el cual el MPP queda comprometido hacia el linaje linfoide o mieloide, resultando en la formación del progenitor común linfoide (CLP por sus siglas en inglés) o el progenitor común mieloide (CMP por sus siglas en inglés) [3, 57].

Respecto al linaje linfoide, la pérdida de la capacidad de autorrenovación de la HSC a largo plazo es acompañada por la expresión del receptor tirosín cinasa Flt3 (Flk2) en células MPP. Las células MPP Flt3+ se diferencian al progenitor linfocítico temprano (ELP por sus siglas en inglés), que experimentará rearrreglos en el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina. El ELP probablemente da lugar al ya identificado progenitor del linaje T (ETP por sus siglas en inglés) en el timo, y al CLP en la médula ósea, que puede diferenciarse a cuatro distintos tipos celulares: células B, células T, células *Natural Killer* (NK por sus siglas en inglés) y células dendríticas (DC). La subsecuente expresión del marcador de células B, B220, coincide con la diferenciación a células CLP-2, que entran a la vía de diferenciación de células B bajo la inducción de la expresión de CD19, en la etapa de célula pro-B, que posteriormente se convertirá en célula pre B. El rearrreglo exitoso de genes de la cadena ligera de inmunoglobulina, lleva al surgimiento de células B inmaduras, que migrarán de la médula ósea a los

órganos linfoides periféricos, para de esta forma madurar [3, 57] (Figura 2).

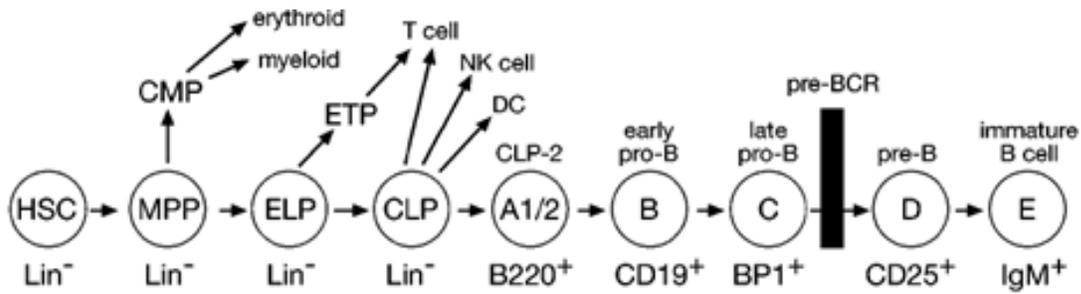


Figura 2. Control transcripcional del desarrollo de la célula B inmadura. Representación de los diferentes estadios por los que atraviesa una HSC hasta convertirse en célula inmadura B, además muestra el perfil de expresión de algunos genes relevantes para el desarrollo y diferenciación de estas células. *Modificada de Transcriptional control of early B cell development, Busslinger (2004).*

La leucemia puede ser crónica o aguda, la primera se caracteriza por la expansión de las clonas hematopoyéticas de forma masiva conservando su habilidad para diferenciarse, y la aguda por la pérdida de la habilidad para diferenciarse por parte de las clonas hematopoyéticas [54,55].

De acuerdo a lo anterior, se conocen cuatro subclases: Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), Leucemia Mielocítica Aguda (LMA) y Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) [3]. La Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) es el cáncer infantil más común alrededor del mundo y en México [2,4].

Leucemia Linfocítica Aguda (LLA).

•Epidemiología.

Múltiples reportes realizados en Canadá, Estados Unidos y el Reino Unido indican que en niños menores de 15 años la incidencia de LLA se encuentra entre los 20 y los 35 casos por millón. En contraste, en México Pérez-Saldivar y colaboradores realizaron un estudio recopilando datos de pacientes pediátricos con leucemia atendidos en 13 hospitales, tanto del sector público como privado (entre ellos el Instituto Nacional de Pediatría (INP)) en el Distrito Federal. Este muestra que la incidencia de LLA es de 49,5 casos por millón, revelando que la incidencia de este tipo de leucemia en México es elevada respecto a lo que ocurre en otros países [4].

La LLA afecta principalmente a niños entre el primer y cuarto año de edad, no obstante, infantes entre los 10 y 14 años también son susceptibles e incluso son considerados de alto riesgo para la recaída [4].

Por la naturaleza de los linfocitos, la LLA muestra dos subtipos: LLA de células B y LLA de células T, dentro de la LLA de células B destaca la LLA de células precursoras tipo B (LLA de células pre B). Numerosos reportes coinciden que la LLA de células pre B presenta mayor incidencia [4], esta se manifiesta generalmente durante el primer y el sexto año y, entre los 9 y 10 años de edad. Respecto a la LLA de células T aunque es menos común, puede presentarse durante el primer y cuarto año [4] (Figura 3).

Además, es importante destacar que la incidencia es mayor en niños que en niñas, e incluso se ha llegado a considerar el género como un factor pronóstico [7]



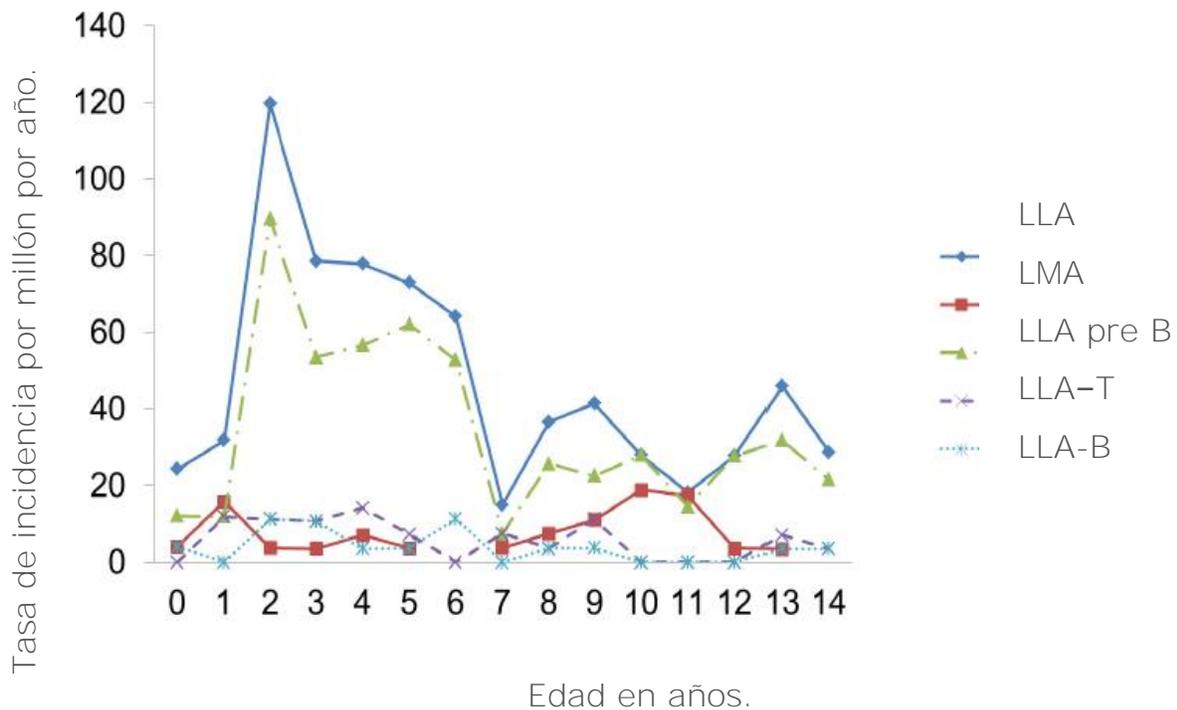


Figura 3. Incidencia de leucemia por edades en niños de la Ciudad de México entre los años 2006 y 2007. La incidencia es mayor para la LLA destacando la LLA de células pre B según lo muestra la gráfica. La LMA presenta elevada incidencia alrededor de los 10 u 11 años de edad, sin embargo este tipo de leucemia es más frecuente durante la edad adulta. *Modificada de Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology, Pérez-Saldivar (2011).*



•Bases genéticas de LLA.

Las causas de LLA en la gran mayoría de los casos son desconocidas. Un pequeño porcentaje está asociado con el síndrome de Down, los niños con esta enfermedad tienen entre 15 y 20% mayor probabilidad de desarrollar leucemia, además se ha reportado que la susceptibilidad de estos infantes **aumenta cuando son expuestos a campos magnéticos ≥ 6 mG. También,** existe predisposición al desarrollo de LLA en pacientes con síndromes que involucran inestabilidad genómica, como Ataxia telangiectasia o síndrome de Bloom [3, 8, 9].

Además, se sospecha que en el desarrollo de leucemia están involucrados eventos *in utero*, pues existen múltiples estudios que concuerdan con esta teoría, por ejemplo: el análisis molecular de muestras sanguíneas neonatales almacenadas, conocidas como cartas Guthrie, en las que de 1/100 a 1/1000 nacimientos presentan translocaciones pre leucémicas. Aunado a lo anterior, se encuentra el hecho de que en algunos pacientes durante el diagnóstico, la presencia de clonas leucémicas puede ser detectada como una población hematopoyética menor durante el nacimiento, no obstante, el alcance de esta asociación que implica susceptibilidad genética aún es ambiguo [3, 8].

Las características genéticas asociadas a LLA incluyen: translocaciones, aneuploidías y mutaciones en genes específicos que generan subgrupos moleculares de LLA de células T o B con diferentes cursos clínicos y diferente respuesta a la terapia [3].



•Bases genéticas de LLA de células B.

Han sido descritas gran número de translocaciones para la LLA de células B con una variada frecuencia. La translocación más común es la t(12;21) (*TEL/AML1*) e implica un buen pronóstico, la segunda es la t(1;19) (*PBX1/E2A*) que junto con la t(9;22) (*ABL/BCR*) y la t(4;11)(*MLL/AF4*) están asociadas al mal pronóstico [8] (Ver tabla 1).

Las translocaciones que promueven el desarrollo de este tipo de LLA, a menudo involucran factores de transcripción y remodeladores de la cromatina, que regulan la maduración normal del linaje B., éstos incluyen factores que controlan el desarrollo de la *HSC*, por ejemplo; *AML1 (RUNX1)* que controla el surgimiento de la *HSC* en sitios hemogénicos fetales (por ejemplo hígado fetal); o genes que inician la diferenciación de la célula hacia el linaje B como *EBF* o *E2A*, y también genes que comprometen a la célula hacia este linaje, como *PAX5* [3].

La translocación más conocida es la del gen *BCR* (Breakpoint Cluster Region) en el cromosoma 22 con *ABL* (Abelson) en el cromosoma 9, dando como resultado el cromosoma Filadelfia, presente en 5% de los niños con LLA de células B (Ph+). El oncogen *BCR-ABL* codifica para dos oncoproteínas de fusión con distintos pesos moleculares (190 y 210 KDa respectivamente), aproximadamente el 90% de los niños con esta translocación expresan la p190. Como consecuencia de la fusión, la capacidad de tirosina cinasa de ABL queda activada constitutivamente, y de esta manera, promueve la desregulación de las vías *RAS-MAPK* y *PI3K-AKT*, dos vías de transducción de señales que controlan la proliferación, el tamaño y la supervivencia de la célula [3].



Tabla 1. Translocaciones más comunes en LLA de células B.

Enfermedad	Translocación	Genes	Características
LLA de células pre B	t(9; 22)(q34; q11) Cromosoma Filadelfia	<i>ABL-BCR</i>	Pobre pronóstico.
LLA de células pre B tempranas	t(1; 19)(q23; p13)	<i>PBX1 E2A</i>	Asociado con alto conteo de células blancas, requiere terapia intensiva.
	t(4; 11)(q21; q23)	<i>AF-4 ALL1/MLL/HRX</i>	También está asociado con LMA.
	Dic(9; 12)(9p11-p12; p12)	<i>Desconocidos</i>	Predominantemente en hombres, asociado al buen pronóstico en terapia con antimetabolitos.
	t(5; 15)(q31; q32)	<i>IL-3 IgH(enhancer)</i>	
	t(11; 19)(q23; p13)	<i>ALL1/MLL/HRX ENL</i>	
	t(9; 11)(p21-p22; q23)	<i>AF-9 ALL1/MLL/HRX</i>	
	t(17; 19)(q22; p13)	<i>HLF E2A</i>	
	t(12; v)(p12-p13; V)	<i>TEL o KIP1</i>	
	t(12; 21)(p12; q22)	<i>TEL AML1</i>	
LLA de células B	t(8; 14)(q24; q32.3)	<i>MYC IgH</i>	Asociado a morfología L3, predominante en hombres, favorable pronóstico con terapia intensiva corta.
	t(8; 22)(q24; q11)	<i>MYC IgL</i>	Asociado a morfología L3.
	t(2; 8)(p11-p12; q24)		Asociado a morfología L3.

Modificada de Principles and practice of pediatric oncology, Chapter 19: Acute Lymphoblastic Leukemia, Fifth edition, 2006. Philip A Pizzo, David G. Poplack Lippincot. Williams and Wilkins.



Aunado a las translocaciones, existen eventos genéticos que aparecen durante la génesis y la progresión de la leucemia, que no son detectables con los modelos citogenéticos clásicos. Estos incluyen pequeñas deleciones, algunas mutaciones o desregulación epigenética, lo que permite la inactivación de genes supresores de tumor o activación de oncogenes. También están implicados genes que participan en procesos regulatorios clave que controlan la proliferación hematopoyética (autorrenovación), diferenciación, apoptosis, entre otros [8]. Nuevas y diversas lesiones moleculares en LLA pediátrica han sido descubiertas y su relevancia clínica aún se desconoce [10, 11, 12].

•Presentación clínica y parámetros relacionados con el curso del tratamiento durante la LLA.

Los síntomas del infante con LLA reflejan el grado de infiltración de las células leucémicas en la médula ósea. Los síntomas típicos son manifestaciones de la anemia, trombocitopenia y neutropenia asociadas a la enfermedad, que en conjunto revelan fallas en el proceso hematopoyético. Se presentan comúnmente palidez, fatiga, dolor de huesos, petequia, sangrado púrpura y fiebre [8].

El diagnóstico, se hace con base en las manifestaciones clínicas, exploración física y datos de laboratorio. El diagnóstico da certeza, se establece mediante los hallazgos en médula ósea, clasificando a la LLA según los siguientes aspectos:

Morfológico Este estudio está basado en lo propuesto por el Grupo de Trabajo en Cooperación Francés- Americano- Británico (FAB) y consiste en aplicar a una laminilla con células de médula ósea la tinción de Romanovsky o Giemsa. No está particularmente relacionado con el



inmunofenotipo o la citogenética, sin embargo, los criterios de la FAB son el primer paso hacia el diagnóstico de la mayoría de los pacientes. Dicho sistema define tres categorías de linfoblastos (L1, L2 y L3) dependiendo del tamaño, forma del núcleo, nucléolos y de la cantidad de citoplasma, principalmente [8].

Inmunitario Se basa en la detección de moléculas de membrana asociadas con los diferentes linajes hematopoyéticos. Actualmente existen más de 200 anticuerpos monoclonales diferentes, pero la elección del panel de diagnóstico depende de la institución, generalmente se incluyen anticuerpos contra CD3, CD5 y/o CD7 para el linaje de células T y CD10 (también llamado antígeno común ALL o CALLA) CD19, CD20 y CD22 para el linaje B. El 85% de las leucemias son del tipo B y con el inmunofenotipo es posible hacer la clasificación en: pre B temprana, pre B, pre B transicional y pre B tardía [8].

Genético

Este estudio consta de los siguientes análisis:

Estudio citogenético. Se buscan alteraciones cromosómicas, numéricas o estructurales, visibles en el estudio microscópico.

Estudio molecular. Identifica alteraciones cromosómicas estructurales específicas que no son detectables en el estudio citogenético. Se realiza por medio de FISH o RT-PCR.

Índice de DNA. Es un indicador indirecto de la ploídía, se determina por citometría de flujo y es complementario al estudio citogenético [8].



•Tratamiento.

La LLA es una enfermedad heterogénea, en la que los pacientes se pueden estratificar en diferentes grupos de riesgo (bajo riesgo, riesgo habitual, alto riesgo o muy alto riesgo). Basados en los estudios morfológico, inmunitario y genético, la terapia es diferencial, puesto que el conocimiento actual sobre la enfermedad ha mejorado, el enfoque respecto al tratamiento se ha vuelto más complejo. Los regímenes de tratamiento actuales dividen la terapia en cuatro elementos principales [8, 58] (Figura 4).

•Inducción a la remisión. Es la fase inicial del tratamiento, el objetivo es reducir de 100 a 1000 veces la carga leucémica. La remisión, se ve reflejada en la desaparición clínica de enfermedad detectable, recuperación hematológica, disminución de blastos en médula ósea (MO) a menos de 5%, ausencia de blastos en líquido céfalo-raquídeo (LCR) y un nivel de enfermedad mínima residual detectable por PCR o citometría de flujo menor a 10^{-5} . Lo anterior, puede lograrse en 98% de los casos, mediante una combinación de medicamentos en un programa intensivo, durante las primeras semanas (cuatro), que incluye el uso de quimioterapia intratecal [8, 58].

Según el protocolo [58], esta fase dura cuatro semanas. La primera semana incluye una ventana terapéutica con esteroide (prednisona) [13] que sirve para evaluar la respuesta al medicamento como factor pronóstico, y reducir las complicaciones metabólicas relacionadas con la carga leucémica que se presentan al iniciar la quimioterapia. Las siguientes tres semanas se administra una combinación de vincristina, L-asparaginasa y prednisona. En esta fase debe de iniciar el tratamiento presintomático al sistema nervioso central (SNC), el cual tiene como objetivo reducir el número de recaídas al



SNC, utilizando diferentes estrategias que incluyen la administración regional de quimioterapia (por vía intratecal) con hidrocortisona y citarabina, así como altas dosis de metotrexato [8, 58].

•**Consolidación.** El principal objetivo es intensificar de manera temprana el tratamiento a sitios santuario (SNC y testículos) administrando altas dosis de antimetabolitos en intervalos de una a dos semanas hasta cubrir tres o cuatro dosis [8,58].

•**Mantenimiento.** El objetivo es eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar las células leucémicas. Esta fase debe contemplar el uso de tratamiento presintomático al SNC, una fase de reinducción y el esquema de continuación basado en antimetabolitos, además de la administración de vincristina y dexametasona cada cuatro semanas [8,58].

•**Evaluación de la respuesta al tratamiento.** Durante esta fase del tratamiento, se realiza aspirado de MO cada semana hasta demostrar remisión (días 0, 7 y 14); en los casos sin remisión al día 14, el paciente debe recibir un protocolo para leucemia de alto riesgo [8, 58].

En los días 0 al 7, el paciente recibe una ventana de esteroides, al término se determina la respuesta al medicamento basado en el número de blastos en la biometría hemática. Se considera buena respuesta cuando hay menos de 1000 blastos en sangre periférica [8, 58].



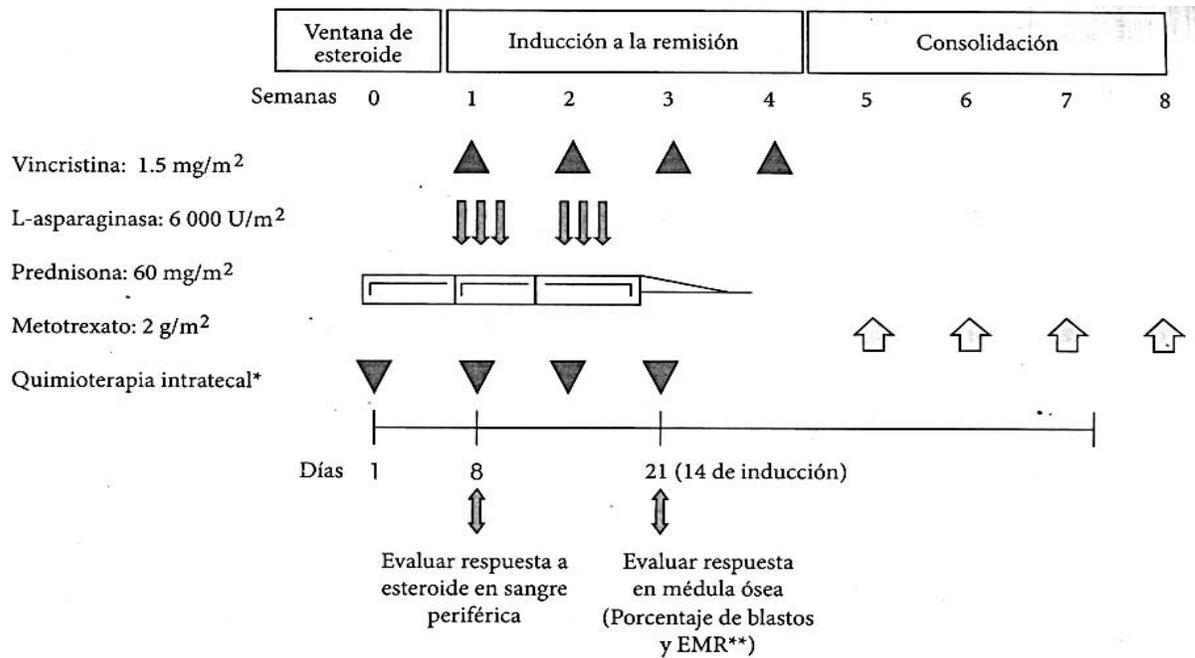


Figura 4. Fases de tratamiento durante la LLA en población pediátrica. La administración de prednisona (esteroide), es un paso esencial durante el tratamiento, pues con base en la respuesta del paciente durante la primera semana, se diseñará el régimen de tratamiento posterior. El diagrama muestra tanto la dosis correspondiente a cada medicamento, como las semanas de administración de los mismos. Modificada de *Protocolos técnicos, INP, Aurora Medina Sansón (2011)*.



Cáncer y ciclo celular.

Se sabe que la proliferación descontrolada durante el cáncer es consecuencia de la activación errónea de la maquinaria del ciclo celular, de tal manera que la célula prolifera en ausencia o presencia de señales mitogénicas o antimitogénicas apropiadas, respectivamente. Esto puede ocurrir como resultado de la acumulación de mutaciones en las células tumorales, que como consecuencia ocasionan inestabilidad genómica [15].

La proliferación descontrolada y la inestabilidad genómica, son los defectos más importantes del ciclo celular, pues incrementan la susceptibilidad a la adquisición de alteraciones genéticas adicionales, que contribuyen a la progresión del tumor y adquisición de fenotipos más agresivos [16].

Ciclo celular.

En la célula el papel del ciclo celular, es duplicar con exactitud el DNA (fase S (síntesis)), para después, segregar las copias con precisión en dos células hijas idénticas (fase M (mitosis)) [14].

La mitosis, comienza cuando las cadenas de DNA recién duplicadas, se compactan en cromosomas, lo cual es necesario para que se puedan separar. Después, la envoltura nuclear se fragmenta y los cromosomas replicados, cada uno constituido por un par de cromátidas hermanas, se unen a los microtúbulos del huso mitótico. Durante la mitosis, la célula se detiene brevemente en metafase, cuando los cromosomas están alineados en el ecuador del huso mitótico, preparados para la segregación. La separación súbita de las cromátidas hermanas señala el comienzo de la anafase, durante



la cual, los cromosomas se trasladan a los polos opuestos del huso mitótico, donde se condensan y se forma nuevamente el núcleo. A continuación, la célula se divide en dos células hijas mediante la división citoplasmática (citocinesis) y la división celular finaliza [14].

La mayoría de las células tardan mucho más tiempo en duplicar su masa de proteínas y organelos, que en replicar su DNA y dividirse. Por esto, se intercalan fases de cese que les permite disponer de más tiempo para duplicar su masa (la fase G1 entre la fase M y la fase S, y la fase G2 entre la fase S y la mitosis) [14]. Así, el ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 (interfase) y M. Las fases G1 y G2, proporcionan tiempo para que la célula compruebe el medio interno y externo, para así asegurarse de que las condiciones son adecuadas antes de la fase S y de la mitosis. La duración de la fase G1, puede variar dependiendo de las condiciones externas, y de las señales extracelulares procedentes de otras células. Si las condiciones extracelulares son desfavorables, las células retrasan su progresión a través de la fase G1, y pueden entrar en un estado de reposo especializado llamado G0 (quiescencia). Si las condiciones extracelulares son favorables y hay señales para crecer y dividirse, las células en G1 temprana o G0 progresan a través de un punto de **determinación próximo al final de G1 denominado "punto de restricción"** (Figura 5). Superando este punto, las células quedan determinadas para replicar el DNA, incluso aunque desaparezcan las señales extracelulares que estimulan el crecimiento y división celular [14].



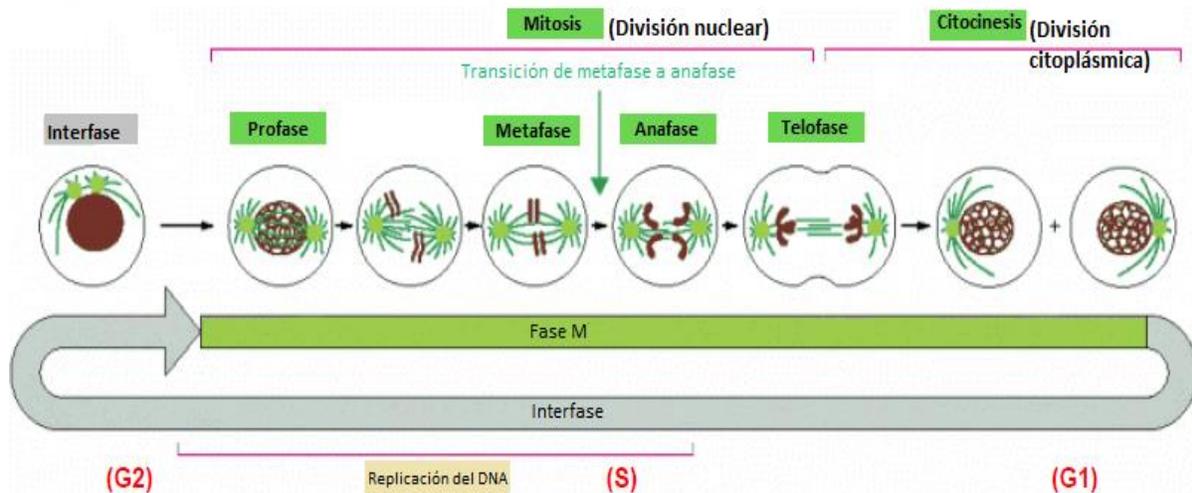


Figura 5. Ciclo celular. Segregación de los cromosomas durante la fase M hasta la citocinesis en donde el resultado son dos células hijas. Para después entrar en fase G1 y posteriormente a la fase S en donde se sintetizará el DNA para así incorporarse a fase G2 y de nuevo a mitosis. Modificada de *The Biology of Cancer, Garland Science (2007)*

Regulación del ciclo celular.

El proceso de división celular, en cualquier tipo de célula, requiere de un complejo grupo de controles moleculares, coordinados en parte por las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de las CDKs, requieren de la unión de subunidades reguladoras conocidas como ciclinas. Las ciclinas son sintetizadas y degradadas en momentos específicos del ciclo celular, de esta manera, el proceso está altamente regulado [16].

Las células humanas, contienen loci que codifican CDKs y ciclinas (loci 13 y 25, respectivamente) [17]. Sin embargo, solo un subgrupo de complejos ciclina-CDK está directamente involucrado en el control del ciclo celular; estos incluyen tres CDKs durante la interfase (CDK2, CDK4 y CDK6), una CDK mitótica (CDK1; también conocida como proteína 2 de control de



división celular (CDC2)) y diez ciclinas que pertenecen a 4 diferentes clases (ciclinas tipo A, B, D y E) [16].

Al inicio del ciclo, las señales mitogénicas, son censadas por la expresión de ciclinas tipo D (D1, D2 y D3), que preferencialmente se unen y activan a CDK4 y CDK6 durante G1 [18]. La activación de estos complejos, lleva a la activación parcial de las proteínas *pocket* RB, RBL1 (p107) y RBL2 (p130), para permitir la expresión de ciclinas tipo E (E1 y E2), que se unen y activan a CDK2. Los complejos CDK2-ciclina E, fosforilan a las proteínas *pocket*, llevando a su completa inactivación [19] (Figura 6).

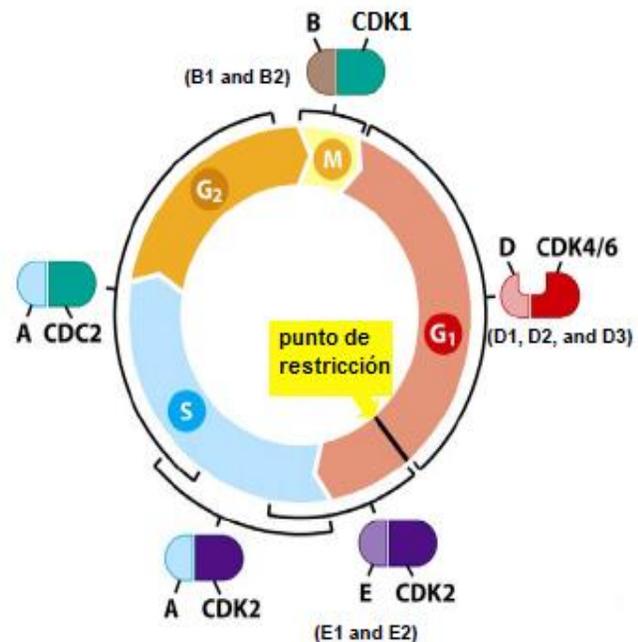


Figura 6. Complejos ciclina-CDK.

Participación de los complejos cinasa/ciclina y su activación durante las diferentes etapas del ciclo. Modificada de *The Biology of Cancer, Garland Science (2007)*.

La disponibilidad de las ciclinas E durante el ciclo celular, está fuertemente controlada y limitada en etapas tempranas de la síntesis de DNA (etapa S). Posteriormente CDK2, es activado por la ciclina A2 durante etapas tardías de la replicación de DNA, lo que lleva a la transición de la fase S a mitosis, periodo conocido como fase G2. Finalmente, CDK1 es activado por ciclinas tipo A, al final de la interfase, para facilitar la entrada en mitosis. A continuación, la envoltura nuclear se rompe y las ciclinas tipo A son degradadas, facilitando la formación del complejo CDK1-ciclina B, responsable de dirigir el paso a través de la mitosis [17].



Lo anterior, evidencia que cada fase del ciclo celular es dirigida por CDKs específicas, no obstante, se ha revelado que CDK2, CDK4 y CDK6, no son esenciales para el ciclo celular en la mayoría de los tipos celulares, la pérdida de estas solo provoca defectos en el desarrollo de tipos celulares especializados. En contraste, la eliminación de la cinasa mitótica CDK1 causa el arresto de ciclo celular en el embrión [16].

Dentro del ciclo celular, el estado de quiescencia es necesario para prevenir el agotamiento prematuro, de la habilidad de repoblación de las células progenitoras a lo largo de la vida de los individuos. Evidencia indica que, dicho estado puede estar a cargo de los inhibidores de CDK (CDKI), que como su nombre lo indica, tienen la función de modular complejos específicos ciclina-CDK. Existen reportadas dos familias de inhibidores: proteínas INK4, que incluye a las INK4A, INK4B, INK4C e INK4D, y la familia Cip y Kip compuesta por p21, p27 y p57. Algunos estudios muestran que, estos inhibidores del ciclo celular bloquean la proliferación de células progenitoras adultas en múltiples tipos de tejidos [16].

Checkpoint mitótico y Cinasa Dependiente de Ciclina/ Ciclina B1 (CDK1/CCNB1).

Uno de los procesos de regulación del ciclo celular que controla la segregación de los cromosomas durante la mitosis, es el **checkpoint** mitótico, una compleja cascada de señalización, que es esencial para la sobrevivencia de las células [20].

El **checkpoint** mitótico, promueve el arresto del ciclo celular en la mitosis, incluso si un único cromosoma no ha sido apropiadamente adherido al huso [21].



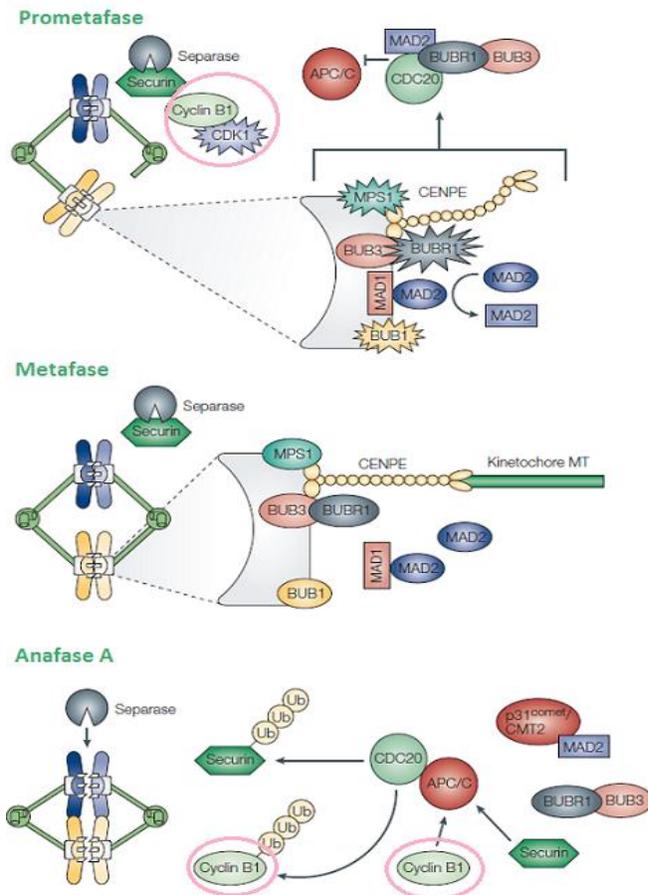


Figura 7. Activación del checkpoint mitótico.

Uno de los cinetocoros libre activa los componentes del *checkpoint*. Consecuentemente se inhibe a CDC20 y de esta forma APC/C no reconoce a la Ciclina B1 para su degradación previniendo la entrada en anafase. Así se inhibe la entrada en anafase y por tanto la progresión a través del ciclo. Modificado de *On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic*, Kops, Weaver, & Cleveland, (2005).

El arresto se logra mediante la inhibición del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) y la ubiquitina ligasa E3, proteínas esenciales para la progresión mitótica [21].

Cuando los cinetocoros están libres se activa el *checkpoint*, cuyos componentes catalizan la conversión y liberación de los mismos, de tal forma que inhiben a CDC20 (homólogo 20 del ciclo de división celular), evitando su unión a APC/C y así este no reconoce a ciclina B1 "principal regulador de la mitosis" para su degradación, de esta manera se previene la entrada en anafase, es decir, ocurre el arresto mitótico [21, 23] (Figura 7).

Las vías que dirigen el destino de la célula una vez ocurrido el arresto aún no son claras. Trabajos recientes sugieren que



degradación de ciclina B1 y la que genera señales de muerte por activación de las caspasas. Se ha demostrado que CDK1/Ciclina B1 son proteínas que directamente regulan la apoptosis por fosforilación y a su vez inactivación de miembros antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl2 (Bcl-2, Bcl-xL, y Mcl-1) caspasa 9, caspasa 2 y survivina [24, 25]. Hallazgos sugieren que la expresión sostenida de ciclina B1 mantiene a CDK1 en estado activo, y así manifiesta su papel dual: mantiene el arresto mitótico e induce apoptosis por fosforilación de Bcl-xL y degradación de Mcl-1. La disminución de la expresión de ciclina B1 promueve la inactivación de CDK1, originando la salida de mitosis y la protección de apoptosis por fosforilación de Bcl-xL y mantenimiento de la expresión de Mcl-1. La expresión persistente de ciclina B1 promueve el arresto mitótico y la muerte en mitosis [24].

Por el lado contrario, cuando el APC/C está activo ejerce actividad proteolítica, para esto requiere del factor CDC20, unidos reconocen e interactúan con sus sustratos mitóticos. La ciclina B1 es una de las proteínas blanco de APC/C para la proteólisis, una vez degradada la ciclina es posible la entrada en anafase. Este evento es controlado por el *checkpoint* mitótico [22].

Salida de mitosis e Inhibidor de Cinasa Dependiente de Ciclina 3 (CDKN3).

El Inhibidor de Cinasa Dependiente Ciclina 3 (CDKN3) también llamado KAP; pertenece a la familia de proteínas fosfatasa duales específicas, fue identificado como correpresor de proteínas dedos de zinc con dominios de represión KRAB [26]. Actualmente se sabe que su papel más importante es en la regulación del ciclo celular, por su unión a CDK1 y CDK2 [27].



Una vez que se ha llevado a cabo de manera adecuada el *checkpoint* mitótico, se disparan un conjunto de señales que dirigen la salida de mitosis, proceso que se sabe está mediado por la degradación de ciclina B1 que secuencialmente inactiva a CDK1 [21, 22].

Recientemente se sugirió que la actividad residual de CDK1 puede ser silenciada mediante la desfosforilación de la treonina (Thr) 161 (la forma fosforilada activa a CDK1), asegurando la salida apropiada de mitosis. CDKN3 es una fosfatasa capaz de llevar a cabo la desfosforilación eficientemente, contribuyendo a la salida de mitosis. Se ha demostrado la presencia de CDK1^{pThr161} en el cinetocoro y en los centrosomas durante la mitosis temprana lo que sugiere, que la localización subcelular de CDKN3 cambia a través del ciclo celular. Aunado a lo anterior, se ha observado que la pérdida de CDKN3 provoca la desregulación de mitosis, y la generación de un número muy elevado de centrosomas, además hallazgos muestran que CDKN3 controla la mitosis a través de la vía de señalización de CDK1 [28].

Respecto a la interacción de CDKN3 y CDK2, la unión promueve la disminución de la capacidad de fosforilar a la proteína de retinoblastoma (Rb) por parte de CDK2. Rb no fosforilada se une al factor de transcripción E2F1, inhibiendo la generación de proteínas requeridas para la transición de G1/S [29].

Otra de las funciones de CDKN3 es como proteína de unión a Mdm2, una vez unidos se forma un complejo con p53 éste suprime la actividad de p21 (blanco de p53) y así se facilita la progresión a través del ciclo celular [30].



Errores en el checkpoint mitótico y la implicación de CDK1 y CCNB1 en cáncer.

Diversos estudios muestran que defectos en el *checkpoint* mitótico contribuyen a la tumorigénesis, pues células sanas, tienen un checkpoint consolidado, para el que uno o más cinetocoros libres, producen fuertes señales que bloquean la actividad de APC/C, y así se inhibe la progresión hacia anafase. Esto no ocurre, cuando los componentes del checkpoint están mutados o sus concentraciones están reducidas [21].

La desregulación de la actividad y/o expresión de CDK1 está bien documentada para tumores sólidos, incluidos: cáncer de pulmón, colon y mama [31, 32].

Respecto a su papel en la leucemia, en pacientes con LMA, altos niveles de expresión de CDK1 fueron detectados en células leucémicas con delección del 5q [33]. Además, se ha demostrado que la vía CDK1/ciclina B1 es activada de manera defectuosa por el receptor FLT3, que usualmente está mutado en LMA, como consecuencia, el complejo CDK1/ciclina B1 inhibe la función del **factor promotor hacia la diferenciación granulocítica C/EBP α** . Si se inhibe al receptor FLT3 o **a la CDK1, se puede restaurar la actividad de C/EBP α e** inducir la maduración mieloide de los blastos leucémicos. De esta manera, CDK1 se convierte en un interesante blanco, para el tratamiento de la LMA en pacientes que presentan resistencia a inhibidores de FLT3 [32].

También se ha propuesto, que células con alteraciones en las vías que involucran CDKs, pueden escapar de señales antimitogénicas, inducidas por medicamentos utilizados durante la quimioterapia. Se ha demostrado que los niveles de expresión de CDK1 son significativamente altos en pacientes con LMA. La localización subcelular de CDK1 también es relevante, pues pacientes con altos niveles de CDK1 nuclear, tienden a un pobre pronóstico respecto a los que tienen niveles más bajos. El mismo estudio mostró que, la



función de CDK1, es requerida por el ácido retinoico, para lograr su óptimo efecto en células leucémicas y por primera vez se expuso que RAR γ (Receptor para **Á**cido Retinoico) en conjunto con el ácido retinoico, regulan los niveles de CDK1 y su localización subcelular, lo que tiene relevancia clínica en el tratamiento contra la leucemia. De forma general el estudio revela nuevos mecanismos por los que CDK1 y RAR γ coordinados con ácido retinoico, influyen la progresión a través del ciclo celular y la diferenciación celular [31].

Los primeros estudios de CDK1 sugirieron que la regulación de CDK1 no es solo a nivel transcripcional, pues durante el estudio del ciclo celular en células linfoides, se observó variación de los niveles de mRNA vs proteína, lo que llevo a proponer a la proteína CDK1 como marcador del estado de proliferación tumoral [50]. Aunado a lo anterior recientemente, debido al efecto del terameprocol en CDK1, se incorporó a este fármaco en estudios de fase I, por su efecto inhibidor de Cdc2/CDK1 y AKT, en el tratamiento de pacientes adultos con leucemias avanzadas. Durante el estudio de farmacodinamia se vio que dicho medicamento, reduce los niveles de proteína de CDK1 y AKT [51].

Respecto a la Ciclina B1, se ha demostrado que juega un papel importante en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, durante la metástasis hacia nódulos linfáticos en cáncer gástrico (CaG) [34]. Otro estudio sugiere que la expresión podría ser considerada como un marcador para la forma agresiva en CaG [35], carcinomas en el esófago [36], pulmón [37], e hígado [38]. En carcinoma esofágico escamoso, se ha revelado que la elevada expresión de ciclina B1 atenúa el efecto del cisplatino, mientras que su abatimiento aumenta su sensibilidad [39]. En contraste, otro grupo no encontró significado estadístico entre la expresión de Ciclina B1 y el pronóstico de pacientes con adenocarcinoma de estómago y recto [40].



CDKN3 y cáncer.

Respecto al papel de CDKN3 en cáncer, se reportan diferencias en los niveles de expresión en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, el gen está deletado o sobre expresado en cáncer de mama y próstata respectivamente [41]. En carcinoma hepatocelular; la expresión elevada de CDKN3 está relacionada con pobre diferenciación del tumor y el avance hacia estadios más agresivos. En carcinoma hepatocelular estudios funcionales demuestran que CDKN3 participa en la proliferación ya que promueve la transición G1/S, pero no impacta en la apoptosis o invasión. En consecuencia, se piensa que CDKN3 actúa como un oncogen para este tipo de cáncer [42]. En tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos el incremento en la expresión de CDKN3 y CCNB1 se ha asociado con niveles bajos del gen supresor de tumor ATM, promoviendo proliferación [43]. En células de neuroblastoma, la deficiencia de colina está relacionada con la inhibición de la proliferación celular por hipometilación de la región promotora de CDKN3, que actúa sobre la vía de unión a CDK2 [44].

En LMC (BCR-ABL) CDKN3 actúa como gen supresor de tumor en tumorigénesis inducida por dicho oncogen. Se observó que niveles altos de expresión de CDKN3 retrasan la transición de G1 a S, en células sensibilizadas a apoptosis inducida por imatinib, e inhibe el crecimiento de leucemia en ratones desnudos, además disminuye significativamente la transformación mediada por Bcr-Abl de células FDCP1, que es una línea celular de leucemia. Además se encontró que CDKN3 reduce la supervivencia de la célula por abatimiento de la expresión de XIAP mediado por CDK2. En resumen, se propone a CDKN3 como un potencial blanco terapéutico en leucemias que involucran al oncogen Bcr-Abl [53].



Acetiltransferasa Establecedora de cohesina 2 (ESCO2): Funciones durante fase S y su relación con cáncer.

El anillo de cohesina está formado por un complejo de subunidades multiproteicas: SMC1A, SMC3, RAD21/SCC1 y SCC3 y juega un papel importante durante el ciclo celular, al asegurar la correcta transmisión del material genético, ya que participa en la cohesión de las cromátidas hermanas en la fase S, y de su correcta segregación a las células hijas durante la metafase [45, 46] (Figura 8).

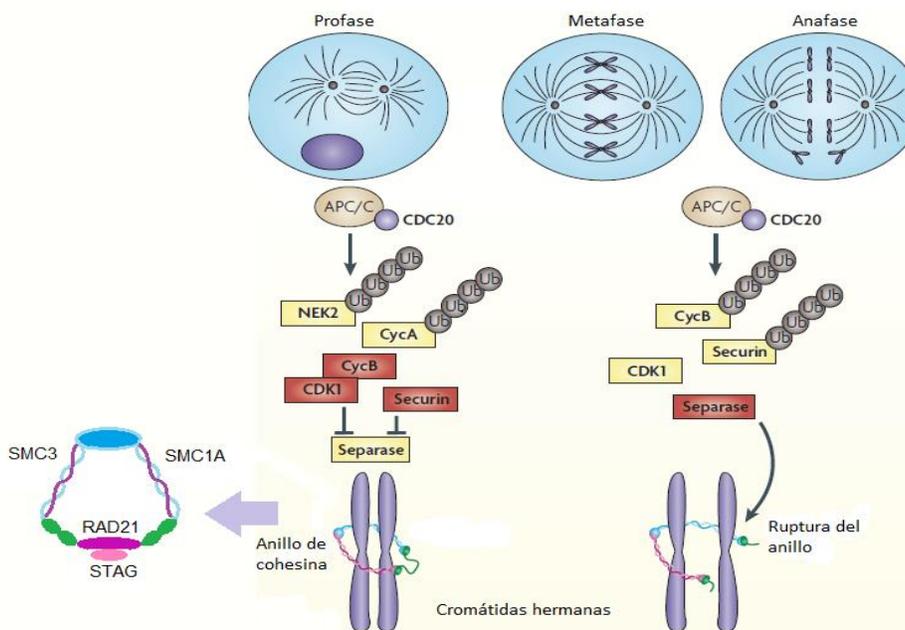


Figura 8. Anillo de cohesina El anillo de cohesina mantiene a las cromátidas hermanas juntas durante la profase hasta su ruptura durante las fases posteriores de la mitosis. El anillo está conformado por diferentes unidades proteicas. *Modificada de Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, Malumbres & Barbacid, (2009).*



Estudios en levadura, indican que la ligadura con el anillo de cohesina de las cromátidas hermanas es establecido por la horquilla de replicación, y requiere de la actividad de la acetiltransferasa Establecedora de cohesina 1 (Eco1), esencial para la viabilidad de la célula. Genomas de mamíferos codifican 2 ortólogos de Eco1, ESCO1 y ESCO2 que consisten en un N-terminal divergente, seguido por un dedo de zinc C2H2 y un dominio altamente conservado de acetiltransferasa ECO1/CTF7 [46]. ESCO2 está involucrada en el establecimiento de las uniones entre las cromátidas hermanas durante el ciclo celular [47], y en la acetilación de SMC3, necesaria para la progresión de la horquilla de replicación [45]. El proceso de acetilación, también depende en parte de ESCO1, lo que indica funciones redundantes, sin embargo, aunque la deficiencia de ESCO2 no causa pérdida de viabilidad, provoca el Síndrome de Roberts (RBS) (cohesinopatía) pues muchas de las mutaciones en la proteína ESCO2 introducen codones de paro prematuros, que resultan en una proteína ESCO2 truncada, acompañada de la pérdida de actividad enzimática [46].

Sumado a lo anterior se ha observado que líneas celulares de RBS muestran inestabilidad genómica, provocando aneuploidía y formación de micronúcleos, a lo que se le suma poco crecimiento y baja densidad para cultivos confluentes. Células de pacientes con RBS, manifiestan características anormales en su heterocromatina constitutiva, que se muestra como la separación precoz de las cromátidas hermanas, e hinchazón de regiones peri y para centroméricas de los cromosomas 1, 9 y 16 [45].

Respecto a la relación de la desregulación de ESCO2 con cáncer, en cohesinopatías como RBS, se ha observado que algunos pacientes tienden a desarrollar angiomas cavernosos del nervio oculomotor, melanoma maligno y rhabdomyosarcoma [48], también se encontró que ESCO2 está desregulado en los melanomas más agresivos [49].



Está claro que el papel de la cohesina y de sus reguladores como ESCO2, no está limitado a mantener a las cromátidas hermanas juntas y a asegurar la correcta segregación cromosómica. Actualmente, se sabe que la cohesina y sus reguladores positivos y negativos son esenciales para la regulación de la expresión génica, control del ciclo celular, respuesta a daño celular y mantenimiento de la estabilidad del genoma. Mutaciones o desregulación de la cohesina y de los genes reguladores está asociada con cohesinopatías y cáncer [45].



JUSTIFICACIÓN.

El cáncer infantil representa la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo antecedido sólo por los accidentes, en consecuencia constituye un problema de salud pública. Entre los tipos de cáncer con mayor incidencia en la infancia en México se encuentra la LLA ocupando el primer lugar. De todos los casos que se diagnostican de LLA cada año, entre el 80 y el 85% corresponde a LLA-B. Los métodos de diagnóstico actuales, permiten clasificar a los infantes en diferentes grupos de riesgo permitiendo asignar un esquema de tratamiento, a pesar de que la mayoría de los pacientes pediátricos con LLA B presentan remisión completa con los protocolos actuales de tratamiento, pacientes de LLA-B muestran una supervivencia media de solo 5 años.

Puesto que la recurrencia de la enfermedad es elevada (40 %) y existe pobre respuesta al tratamiento por parte de algunos pacientes, ya sea como consecuencia del desarrollo de resistencia a fármacos o debido a las características a nivel molecular y celular de la enfermedad que aún no están bien descritas, cobra importancia la identificación de nuevas moléculas cuyo uso ayude a establecer un diagnóstico y tratamiento más efectivo.

Defectos en el ciclo celular están asociados con la proliferación descontrolada durante el cáncer, identificar y estudiar moléculas que participan durante dicho proceso en LLA permiten establecer si están relacionadas con parámetros asociados a la respuesta al tratamiento. Además, dichas moléculas podrían funcionar como marcadores de tal manera que, sea posible aplicar mejores esquemas de tratamiento, lo que dará como resultado un manejo personalizado del paciente.

Una característica esencial del cáncer es la proliferación descontrolada, dicho proceso está relacionado con la desregulación del ciclo celular. Los genes



CDK1, CCNB1, CDKN3 y ESCO2 son genes del ciclo celular cuya desregulación ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer. De manera adicional, durante los años 2010 y 2011 en el laboratorio se realizó un ensayo de microarreglos en muestras de cáncer cervicouterino. Se encontró un aumento significativo en los niveles de expresión de los genes CCNB1, CDK1, CDKN3 y ESCO2. Bajo esta premisa se decidió evaluarlos en muestras de LLA para valorar si su expresión está relacionada con el buen o el mal pronóstico de pacientes pediátricos.



HIPÓTESIS.

El nivel de expresión de los genes *CDKN3*, *ESCO2*, *CCNB1*, *CDK1* estará relacionado con el pronóstico negativo de los pacientes pediátricos con LLA.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de los genes *CDK1*, *CCNB1*, *CDKN3* y *ESCO2* y su relación con el pronóstico negativo de los pacientes con LLA.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Conformar una base de datos con las características clínicas y parámetros asociados al tratamiento de los pacientes con LLA
- Evaluar el nivel de expresión de mRNA de los genes *CDK1*, *CCNB1*, *CDKN3* y *ESCO2*.
- Determinar la relación pronóstico de los genes *CDK1*, *CCNB1*, *CDKN3* y *ESCO2* en pacientes con LLA.



MATERIALES Y MÉTODOS.

En el presente estudio se utilizaron 31 muestras de RNA total extraído de médula ósea disponibles en el banco de tejidos neoplásicos del laboratorio de oncología experimental del INP, de pacientes de entre 1 y 15 años con diagnóstico de LLA de células B atendidos en el servicio de hemato-oncología del hospital y cuyo diagnóstico fue confirmado por el servicio de patología entre los años 2007 y 2009.

Criterios de inclusión.

1. RNA total integro y relación 260/280 con valores entre 1.8 y 2.
2. Expediente clínico completo.

Construcción de la base de datos (Anexo A).

De los expedientes clínicos de los infantes incluidos en el estudio, se recopilaron los siguientes datos y se agruparon en dos: parámetros clínicos y parámetros asociados al tratamiento.

•Parámetros clínicos:

Vial: Número de vial asignado por el banco de tejidos al que corresponde la muestra de médula ósea extraída del paciente.

Expediente: Número de expediente asignado a cada paciente dentro del INP.

Género: Masculino (M) o femenino (F).

Edad de diagnóstico: Edad de diagnóstico por leucemia.

Diagnóstico (Dx): Leucemia linfocítica aguda de células pre B (LLA pre B), Leucemia linfocítica aguda de células B de alto riesgo (LLA pre B AR), Leucemia linfocítica aguda en estadio L1 (LLA L1), Leucemia linfocítica aguda en estadio L1 de alto riesgo con hipodiploidia (LLA L1 AR/ Hipodiploidia) y



Leucemia linfocítica aguda de células pre B de alto riesgo con carga tumoral (LLA pre B AR con carga tumoral).

•**Parámetros asociados al tratamiento.**

Estatus: Vivo con enfermedad (VcE), Vivo sin enfermedad (VsE), Muerto con enfermedad (McE) y Muerto sin enfermedad (MsE).

Edad de defunción (Edad def) y fecha de defunción (Fecha def).

Respuesta a la ventana de esteroides (Resp. Ventana de Est): Si hubo o no respuesta a la prednisona como parte del tratamiento dentro del INP.

Porcentaje de blastos en sangre periférica (% Blastos): Porcentaje de blastocitos en sangre periférica determinado dentro del INP al momento del diagnóstico para cada paciente.

Inducción a la remisión (Ind. Remisión): Si hubo o no inducción a la remisión como parte del tratamiento contra LLA.

Reinducción: Si hay o no reinducción durante el tratamiento del paciente.

Número de reinducciones (# reinducciones): Se interpreta como el número de recaídas registradas en el expediente de cada paciente detectadas dentro del INP. También se registraron las fechas (día/mes/año) y se calcularon los días desde la ventana de esteroides hasta la primera, segunda, tercera o cuarta reinducción según fue el caso (**días a la 1 reinducción, días a la 2ª reinducción, etc.**)

Fecha de última consulta: Consiste en la última fecha registrada de atención al paciente dentro del INP (día/ mes/ año), también se calcularon los días desde el diagnóstico hasta la última consulta (**días hasta la última consulta**).

Evaluación de CDK1, CCNB1, CDKN3 y ESCO2: para el análisis de cada transcrito se consideró la presencia o ausencia de expresión del gen. Es



decir, para cada gen se consideró la expresión como variable dicotómica (0 – ausencia-, 1 –presencia-) y como variable continua. Se semicuantificó el nivel de expresión de los mismos con el programa IMAGE J y se normalizó el valor respecto al nivel de expresión del gen *RPL4* correspondiente a la muestra en estudio.

Diseño de oligonucleótidos (*primers*).

Se consultó la secuencia de los cuatro genes de interés en el NCBI (National Center Biotechnology Information). Posteriormente se procesaron las secuencias en el IDT tools. Este software arrojó los posibles *primers* con sus respectivos amplicones. Se seleccionaron amplicones de tamaño cercano a 500 pb. La especificidad de los *primers* se probó en la herramienta bioinformática primer BLAST. La secuencia de los *primers* seleccionados (forward (F)/ reverse(R)) se muestran en la tabla. El gen de la proteína ribosomal L4 (RPL4) fue utilizado como gen constitutivo.

Gen	Secuencia	Tamaño del Amplicón
RPL4	F: 5´CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA 3´ R: 5´ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC 3´	243 pb
CDK1	F: 5´ TTGAAACTGCTCGCACTTGGCTTC 3´ R: 5´ TCCCGA ATTGCAGTACTAGGAACC 3´	282 pb
CCNB1	F: 5´ TTGATACTGCCTCTC CAA GCCCAA 3´ R: 5´ TTGGTCTGACTG CTTGCTCTTCCT 3´	204 pb
CDKN3	F: 5´ GCCTATTGA AGATGA ACAGACTCCA 3´ R: 5´ ATTTCACAGCAGCTGGCTATG TCAGG 3´	312 pb
ESCO2	F: 5´GGTGAGAATAAGACAATTTCTCCTAAGTCC 3´ R: 5´TTTGATTCTTCCAGAAACCTGTGG 3´	318 pb

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos usadas.



Síntesis de cDNA.

La conversión a DNA complementario (cDNA) se realizó de acuerdo a las especificaciones del kit *High capacity cDNA reverse transcription* (Tabla 3).

Reactivos		Condiciones en el termociclador
RNA	2µg	37°C / 30 min
Buffer DNAsa 10x	1µL	
DNAsa 50 U/µL	1µL	
<i>H₂O</i>	c.b.p 10µL	65°C / 10 min
EDTA	1µL	
Buffer RT 10 x	2µL	25°C /10 min
dNTPs Mix 25x (100mM)	0.8µL	
Random Primers RT 10x	2µL	37°C / 120 min
Transcriptasa 50 U/µL	1µL	85°C / 5 min
Inhibidor de RNasa	1µL	4°C / ∞
<i>H₂O</i>	3,2µL	
Total	20µL	

Tabla 3. Reacción de retrotranscripción.

PCR de punto final.

El término PCR se refiere a Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés. La técnica consiste en la amplificación in vitro de una secuencia de DNA determinada. La amplificación se logra en tres pasos básicos 1) Desnaturalización del DNA molde, 2) Hibridación de los *primers* al DNA molde y 3) Copia de las cadenas delimitadas por los primers. Estos tres **pasos se repiten "n" veces, duplicándose en cada ciclo el número de cadenas** delimitadas por los oligonucleótidos. Se trata, pues, de una amplificación



exponencial o logarítmica, en que las cadenas previamente sinterizadas pueden servir de molde a futuras amplificaciones. A continuación las condiciones óptimas para la amplificación del cDNA por PCR de los 5 genes.

Gen: RPL4 (Tabla 4).

Reactivos		Condiciones	
Buffer Taq pol 10x	3 μ L		} 40 ciclos
<i>MgCl</i>₂ 25 mM	2,5 μ L	94°C / 5 min	
dNTPs 10 mM	1 μ L		
Primer 25 pM (F/R)	0,5 μ L	94°C / 1 min	
Taq pol 5 U/μL	0,15 μ L	60°C / 1 min	
H₂O c.b.p 24 μL	16,85 μ L	72°C / 1,15 min	
cDNA	1 μ L		
Total	25 μ L	72°C / 10 min	

Tabla 4. Condiciones para amplificación de cDNA por PCR para RPL4.

Genes problema (Tabla 5).

GEN	CDK1	CCNB1	CDKN3	ESCO2
Reactivos	μ L	μ L	μ L	μ L
Buffer Taq pol 10x	3	3	3	3
<i>MgCl</i>₂ 25 mM	4	3	3	3
dNTPs 10 Mm	1	1	1	1
Primer 25 pM (F/R)	0,5	0.5	0,5	0.5
Taq pol5 U/μL	0,15	0.15	0,15	0.15
H₂O c.b.p 24 μL	15,35	16.35	16,35	16.35
cDNA	1	1	1	1
Total	25	25	25	25



	CDK1	CCNB1	CDKN3	ESCO2	
Condiciones al termociclador					
94°C	5 min	5 min	5 min	5 min	
94°C	45 s	1 min	45 s	35 s	
Tm	60,2 °C/ 45s	60°C/1 min	58.8 °C/ 45 s	57 °C/ 45 s	} 40 ciclos
72°C	1,15 min	1,15 min	1,15 min	1 min	
72°C	10 min	10 min	10 min	10 min	

Tabla 5. Condiciones para amplificación de cDNA por PCR de genes problema.

Electroforesis y análisis de la imagen.

Los productos de PCR punto final se visualizaron en geles al 2% m/v de agarosa en buffer Tris, borato y EDTA(TBE) 0.5x, el agente intercalante utilizado fue Bromuro de Etidio (BrEt) se agregaron de 1 a 2 µL dependiendo del volumen total. Se reveló el gel exponiéndolo a luz UV, con el fotodocumentador (UVP), finalmente se capturó la imagen con la que se llevó a cabo el análisis densitométrico con el programa IMAGE J (Figura 9).



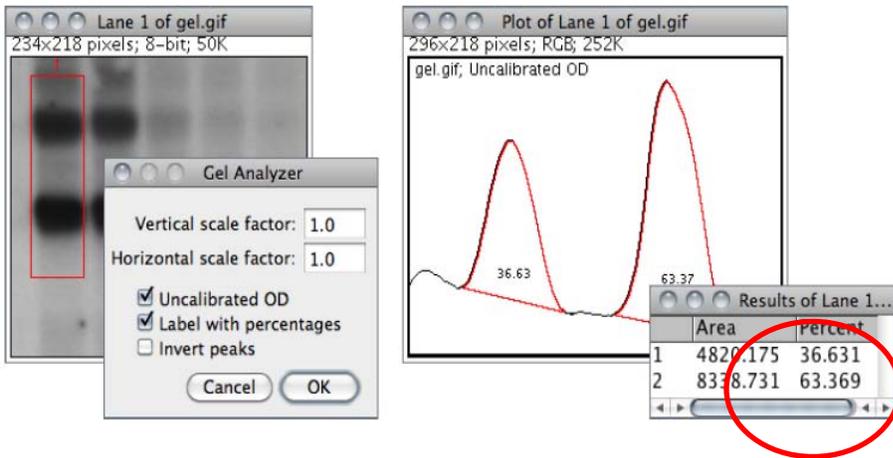


Figura 9
Análisis de la imagen. Curvas arrojadas por el programa IMAGE J para el análisis de geles en 1D. El círculo en rojo señala los valores numéricos correspondientes al área bajo las curvas obtenidas.

Se normalizó respecto al valor numérico correspondiente a la intensidad de banda del gen constitutivo RPL4 de acuerdo con cada muestra, de la siguiente manera:

$$\frac{\text{valor numérico asociado a la intensidad de banda del gen (CDK1, CCNB1, CDKN3 o ESCO2) para la muestra } x}{\text{valor numérico asociado a la intensidad de banda del gen RPL4 para la muestra } x}$$

=

valor numérico asociado a la semicuantificación de la expresión del gen (CDK1, CCNB1, CDKN3 o ESCO2) para la muestra x

muestra x: en donde x puede ser cualquiera de las 31 muestras.

valor numérico asociado a la semicuantificación de la expresión del gen x 100

= %expresión relativa



Análisis estadístico.

Para corroborar si la distribución de la enfermedad de acuerdo al género se comporta de la misma manera que lo reportado en la literatura, ver la distribución de niveles de expresión de cada uno de los genes, y en la búsqueda de patrones de expresión, se construyeron diferentes gráficos con el programa Microsoft Excel 2010.

Para determinar la relación pronóstico entre la expresión de los genes ***CDK1***, ***CCNB1***, ***CDKN3*** y ***ESCO2*** y parámetros asociados al tratamiento, se utilizaron dos tipos de análisis bivalente (boxplot y regresión lineal), junto con un análisis de regresión logística utilizando el programa JMP versión 11.

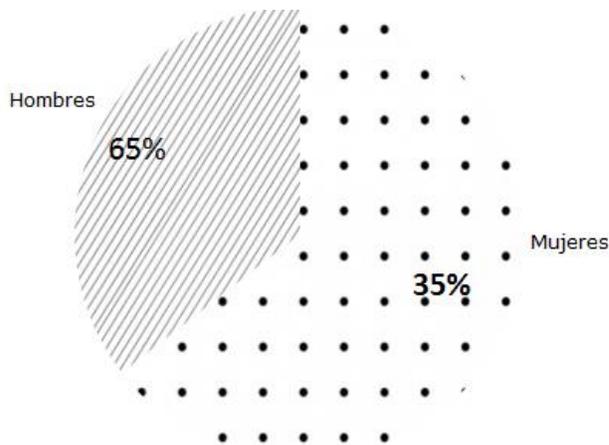


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

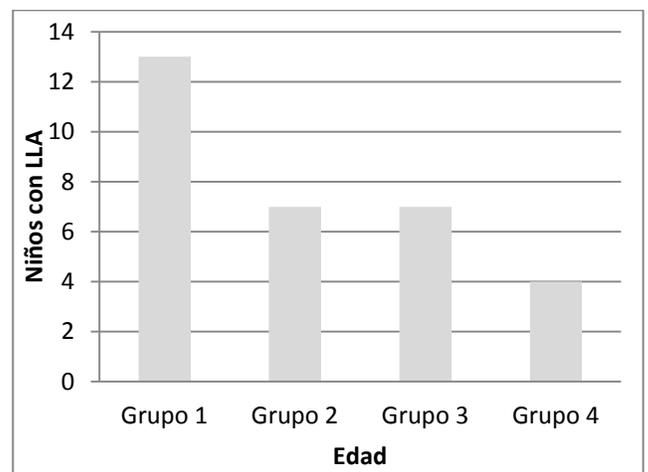
Se sometieron a revisión 70 expedientes con sus respectivas muestras, de las cuales, fueron descartadas 39 por no cumplir con los dos criterios de inclusión (1.RNA total íntegro y relación 260/280 con valores cercanos a 1.8, 2.Expediente clínico completo), resultando una población muestral final de 31.

Agrupación de la población muestral con base en género y edad.

Posteriormente, se realizó la agrupación de esta población con base en el género (Anexo A) (gráfica 1). Predominando los infantes del género masculino, en una relación aproximada de 2:1, respecto a los infantes del género femenino, esta tendencia es congruente con lo que ya está reportado.



Gráfica 1. Agrupación de los niños con LLA con base en el género. F: sexo femenino 65% (11 niñas), M: sexo masculino 35%. (20 niños)



Gráfica 2. Agrupación de los niños con LLA con base en la edad. Se formaron 4 subgrupos: Gpo1: 1-4 años, Gpo 2: 5-8 años, Gpo 3: 9-12 años y Gpo4: mayores de 12 años.



También se agrupó con base en la edad (gráfica 2), resultaron 4 grupos: grupo 1, abarca a niños entre 1 y 4 años; grupo 2, está conformado por niños entre 5 y 8 años; grupo 3 incluye a niños entre los 9 y 12 años; finalmente el grupo 4 engloba a los niños mayores de 12 años. De acuerdo a esto, nuestra población se comporta conforme a lo previamente ya reportado [4], pues la mayoría de los infantes que padecen LLA pertenecen al grupo entre el primer y cuarto año de edad.

Electroforesis.

Posteriormente, se evaluó la expresión del gen constitutivo RPL4 (figura 10), en esta se observan diferencias en la intensidad de banda entre las 31 muestras, esto se puede deber a variaciones en la cantidad inicial de muestra, diferencias en la integridad del mRNA y/o variación de la muestra de cDNA cargado. Debido a estas variaciones fue que se normalizaron los valores de expresión relativa de cada gen respecto al RPL4 por muestra, y no contra el promedio del valor de expresión relativa de los RPL4 de todas las muestras.

Una vez que se corroboró la expresión del gen constitutivo, se evaluaron los genes *CDK1*, *CCNB1*, *CDKN3* y *ESCO2* (figura 10) y se obtuvieron los valores de expresión relativa (Tabla 6).





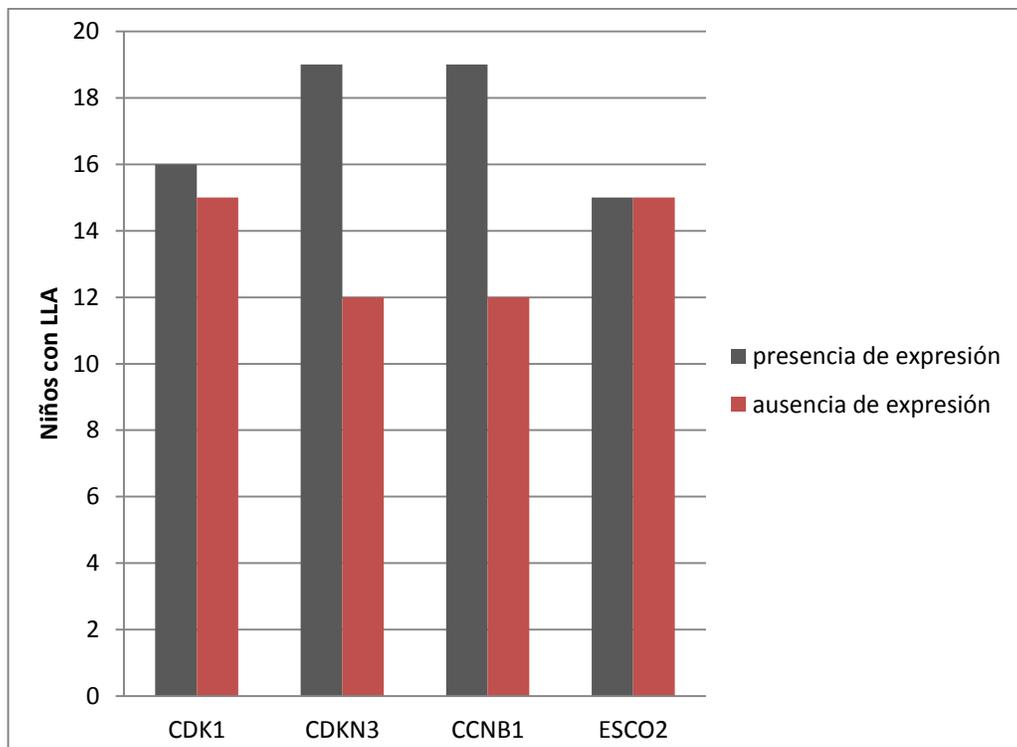
Tabla 6.
Valores de
expresión
relativa para
cada gen
calculados
respecto al
valor
obtenido
para el gen
constitutivo
RPL4.

Muestra	CCNB1	CDK1	CDKN3	ESCO2
126	93.90	-	8.94	-
128	5.10	11.43	-	-
130	68.40	13.73	5.66	-
132	130.91	4.45	2.09	1.69
139	7.37	-	-	-
141	13.11	2.01	13.21	13.00
142	-	-	2.34	-
144	59.77	6.70	-	2.03
157	46.03	4.65	7.47	93.00
164	-	-	-	-
173	31.91	28.95	-	-
175	46.02	-	13.39	28.00
183	48.16	-	31.78	49.13
202	112.19	74.82	110.66	73.69
212	114.36	64.13	119.33	25.48
218	112.00	105.26	101.65	-
248	119.23	-	96.69	94.43
250	13.85	112.03	103.18	109.73
260	88.02	140.28	132.57	109.01
280	-	-	-	-
316	-	4.09	82.43	76.62
342	-	-	-	-
350	91.70	23.98	56.13	78.81
371	-	-	23.22	-
379	-	-	-	-
397	-	-	-	-
417	13.69	73.34	40.46	18.59
468	-	78.74	69.28	29.02
712	-	-	-	-
748	-	-	-	-
776	-	-	-	-



Análisis cualitativo de la expresión de los genes en estudio en la población muestral

Con base en la presencia o ausencia de expresión de cada gen, en las muestras de niños con LLA, se construyó el gráfico 3. La gráfica evidencia como se distribuyen las muestras dependiendo de si se expresa o no *CDK1*, *CDKN3*, *CCNB1* y *ESCO2*. Dicha gráfica no es excluyente, es decir, el hecho de que una muestra presente expresión para uno de los genes no la excluye de presentar expresión de los 3 genes restantes. Por lo menos 50% de los niños presenta expresión de alguno de los genes. A *ESCO2* le corresponde n= 14, a *CDK1* n=16, a *CCNB1* n=19, de la misma manera que a *CDKN3* n=19.



Gráfica 3. Presencia y ausencia de expresión vs el número de niños con LLA. La mayoría de las muestras presentan expresión de alguno de los genes.



Descripción gráfica de patrones de expresión entre los genes de estudio en la población muestral.

Los resultados encontrados en el gráfico 3, sugieren analizar si existe o no relación entre la expresión de los 4 genes con la finalidad de encontrar patrones de expresión, ya sea entre los 4 genes (CDK1, CCNB1, CDKN3 y ESCO2) o combinatorias por pares, identificamos 3 grupos principales: el primer grupo engloba las muestras que expresan los 4 genes; el segundo grupo contiene a todas las muestras que por lo menos expresan 3 genes (hasta 4 combinaciones diferentes); y el último grupo abarca a las muestras que expresan al menos dos genes (6 combinaciones posibles). De la misma forma que el gráfico anterior, evidencia que la expresión de CCNB1 y CDKN3 predomina por lo menos en el 50% de nuestra población (n=15) a la combinación de estos genes le siguen los genes CDK1/CCNB1 y CDKN3/ESCO2 con n=14 ambos subgrupos.



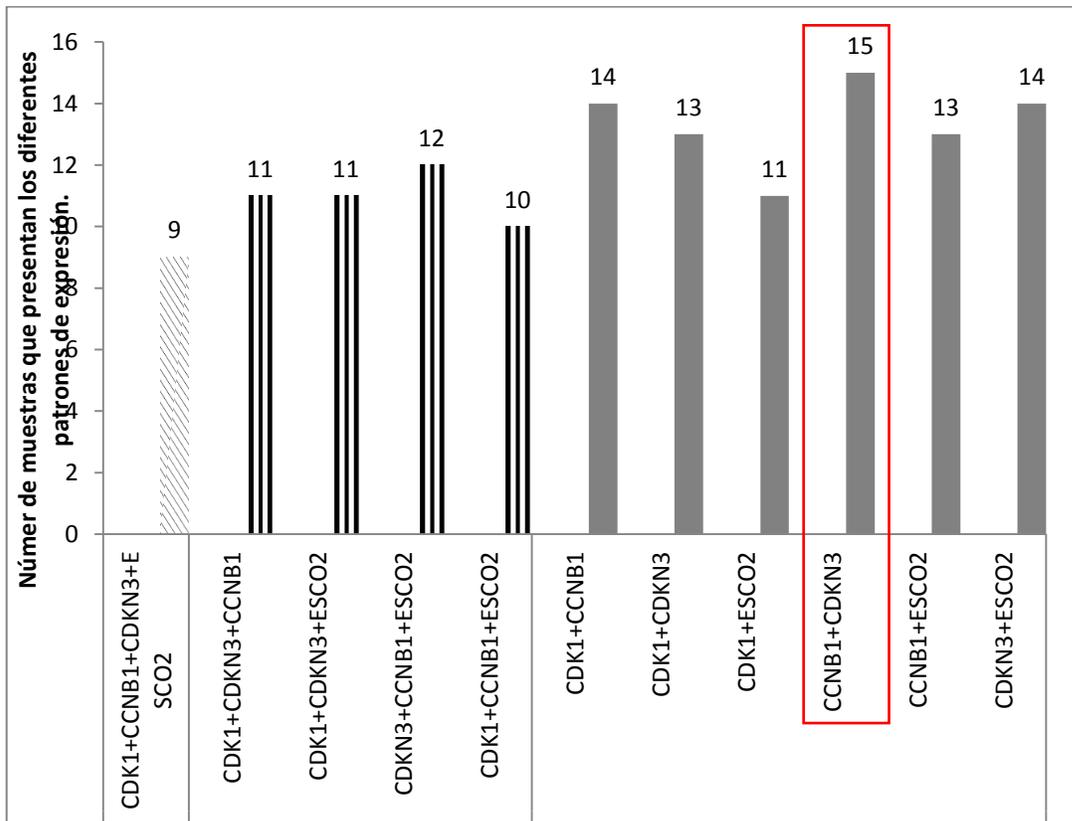


Gráfico 4. Número de muestras con diferentes patrones de expresión.

Gpo 1: CDK1, CCNB1, CDK1 y ESCO2,

Gpo 2: CDK1/CCNB1/CDKN3, CDKN3/ESCO2/CDK1, CCNB1/CDKN3/ESCO2, CDK1/CCNB1/ESCO2.

Gpo 3: CDK1/CCNB1, CDK1/CDKN3, CDK1/ESCO2, CCNB1/CDKN3, CCNB1/ESCO2, CDKN3/ESCO2.

Descripción gráfica del porcentaje de expresión relativa de los genes en estudio en la población muestral.

Posteriormente, el gráfico 5 expone el nivel de expresión relativa (0 a 140) de los 4 genes en estudio para cada una de las 31 muestras, mostrando que la expresión de CDKN3 y CCNB1 se encuentra en mayor número de pacientes, no obstante, hasta este punto no se sabe si los niveles de expresión relativa de estos dos genes están relacionados.



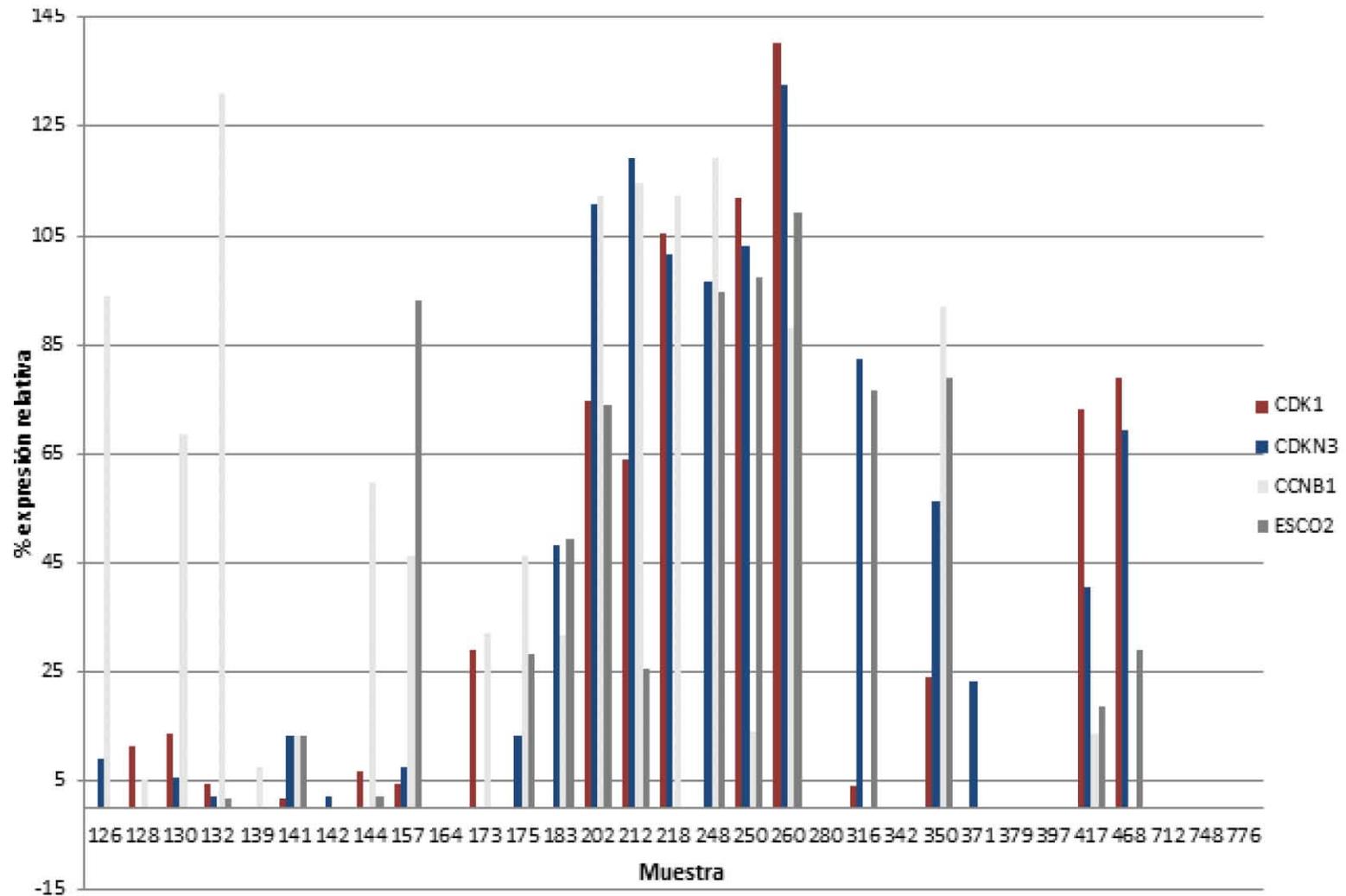
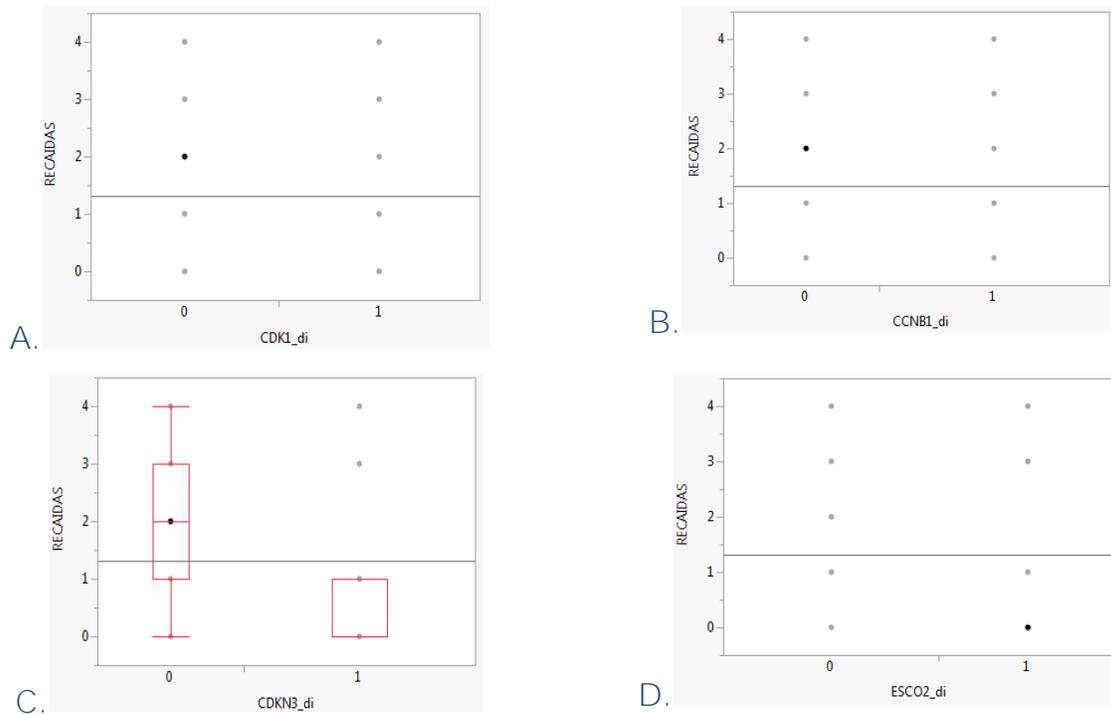


Gráfico 5. Nivel de expresión relativa de los genes CDK1 (Rojo), CDKN3 (Azul), CCNB1 (gris) y ESCO2 (gris O2 oscuro) en cada una de las 31 muestras de infantes con LLA.

Análisis del número de recaídas en función de la presencia o ausencia de expresión de los genes de estudio en la población muestral.

El paso siguiente fue establecer si existe relación ya sea entre la presencia de expresión o ausencia de la misma, o el nivel de expresión relativa de los 4 genes, con factores asociados al tratamiento de los pacientes con LLA.

Pruebas de Wilcoxon y Kruskal Wallis. El gráfico correspondiente a estas pruebas, se construyó para los cuatro genes, colocando el número de recaídas (1 a 4) en "y" contra la presencia (1) o ausencia (0) del gen en "x".



Prueba de un factor , aproximación de ji cuadrado

Gen	Ji cuadrado	gdos de libertad	prob>ji cuadrado
CDK1	0.5208	1	0.4705
CCNB1	0.5482	1	0.4590
CDKN3	4.2982	1	0.0382
ESCO2	1.3445	1	0.2462

Gráfica 6. Pruebas de Wilcoxon y Kruskal Wallis. Número de recaídas vs la presencia o ausencia de cada gen (variable dicotómica). 6A

Recaídas vs CDK1, 6 B Recaídas vs CCNB1, 6 C Recaídas vs CDKN3 y 6 D Recaídas vs ESCO2.



Los resultados de estas pruebas para los genes *CDK1*, *CCNB1* y *ESCO2* no arrojan ningún resultado con significado estadístico, por lo tanto, no hay evidencia hasta el momento, que indique que existe diferencia contundente en el número de recaídas, entre el grupo que presenta expresión de los genes *CDK1*, *CCNB1* y *ESCO2* contra el que no (gráfica 6).

En contraste, el análisis para el gen *CDKN3* (gráfica 6 C) arroja un valor de P de 0.0382, lo que indica que la prueba tiene significado estadístico. Este valor de P da indicios de una posible diferencia entre el grupo que expresa *CDKN3* y el que no. Lo que la gráfica sugiere es que la presencia (1) de expresión del gen está asociada con menor número de recaídas (0 a 1) en la mayoría de los casos, es decir, la expresión de *CDKN3* podría funcionar como factor protector hacia la recaída.

Análisis del número de recaídas en función del nivel de expresión de los genes de estudio en la población muestral.

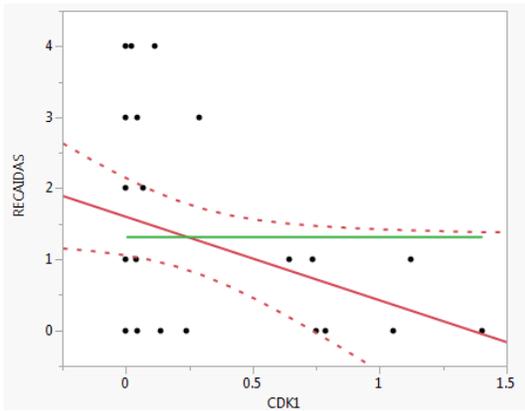
Ajuste bivalente.

El ajuste bivalente aplicado posteriormente da como resultado la gráfica 7, en esta se confronta, el nivel de expresión de cada uno de los genes (eje x) *contra* el número de recaídas (eje y) para los 31 casos. En general, las cuatro rectas correspondientes a cada uno de los genes muestran pendiente *negativa*, lo que sugiere que conforme el número de recaídas disminuye, la expresión aumenta.

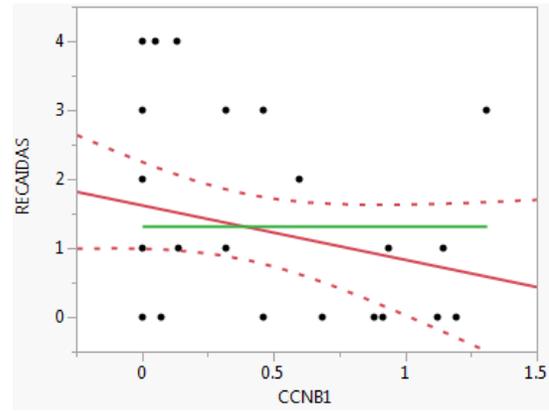
El valor de P es significativo (<0.05) solo para los transcritos de los genes *CDK1*, *CDKN3* y *ESCO2* ($p=0.0492$ *CDK1*, $p=0.0211$ *ESCO2*, $p=0.0067$ para *CDKN3* con R^2 de 0.12691 para *CDK1*, $R^2=0.170279$ *ESCO2* y $R^2=0.22691$ *CDKN3*), en el caso de *CCNB1* el valor de P es mayor a 0.05. (0.1366) con $R=0.12691$.



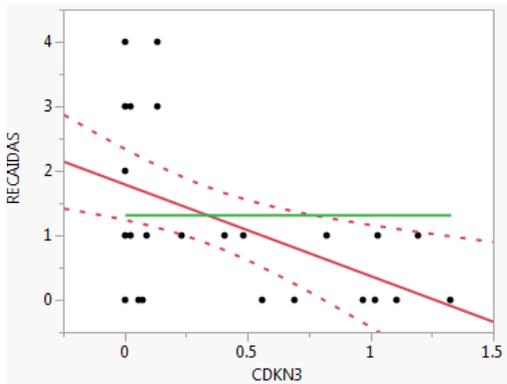
A.



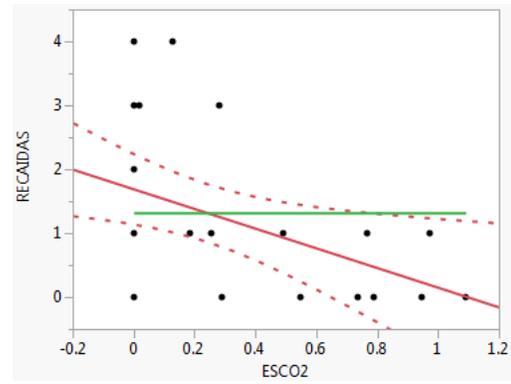
B.



C.



D.



Regresión lineal.

Gen	Ecuación	R ²	P
CDK1	Recaídas=1.60675041-1.1768245*CDK1	0.096803	0.0492
CCNB1	Recaídas=1.6280981-0.78968*CCNB1	0.12691	0.1366
CDKN3	Recaídas=1.7971655-0.78968*CDKN3	0.200261	0.0067
ESCO2	Recaídas=1.6951177-1.5402482*ESCO2	0.170279	0.0211

Gráfica 7. Ajuste bivalente. Regresión lineal de recaídas en función de la expresión de cada uno de los cuatro genes en estudio.

7 A Regresión lineal de recaídas en función del nivel de expresión de CDK1,

7 B Regresión lineal de recaídas en función del nivel de expresión de CCNB1,

7 C Regresión lineal de recaídas en función del nivel de expresión de CDKN3,

7 D Regresión lineal de recaídas en función del nivel de expresión de ESCO2.



Para este análisis mientras mayor sea el valor de R^2 y menor el valor de P, el modelo permitirá una mejor predicción, sin embargo, el valor de R^2 para estos los cuatro genes está muy alejado de 1, lo que se traduce en que la ecuación de la recta asociada a la regresión lineal para cada gen, no predice con exactitud la dependencia entre el número de recaídas y el nivel de expresión de cada gen (*CDK1*, *CCNB1*, *CDKN3* y *ESCO2*).

Con base en el análisis previamente realizado, el gen que permite medianamente indicar dependencia entre las variables, es el que corresponde al gen *CDKN3*, este análisis sugiere que niveles elevados de expresión del gen *CDKN3*, podrían estar asociados con menor número de recaídas. Este resultado es congruente con lo obtenido en el análisis para el mismo gen, con las pruebas de Wilcoxon y Kruskal Wallis (gráfica 6 C).

Conforme a lo que se describió previamente, existen reportes que indican que la pérdida de *CDKN3* provoca la desregulación en la mitosis, lo que ocasiona un ciclo celular anómalo. Estos mismos estudios sugieren además, una posible conexión entre *CDKN3* y el proceso de carcinogénesis por su papel en el mantenimiento de los centrosomas como previsor de aneuploidia [28]. De forma complementaria, un estudio reciente reveló que *CDKN3* actúa como gen supresor de tumor, en la leucemia caracterizada por la fusión Bcr-Abl [53].

En congruencia con lo reportado, estos resultados sugieren que la pérdida de *CDKN3* lleva a la desregulación del ciclo celular y el incremento de la expresión podría tener un efecto benéfico, que se refleja en menor número de recaídas durante el tratamiento, por lo menos en el caso de la LLA-B en infantes.

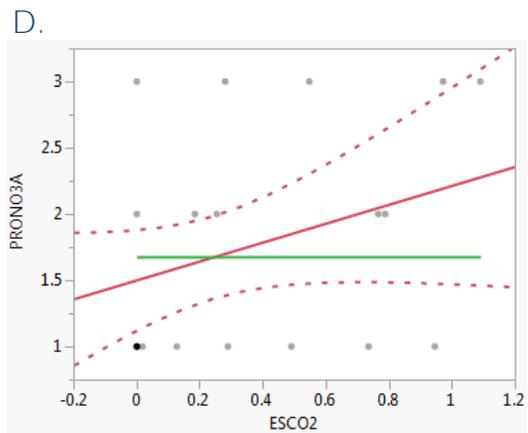
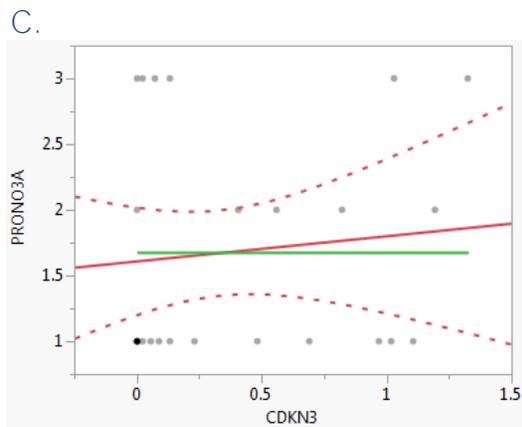
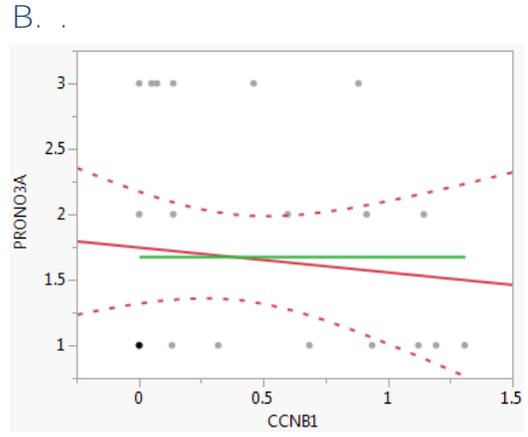
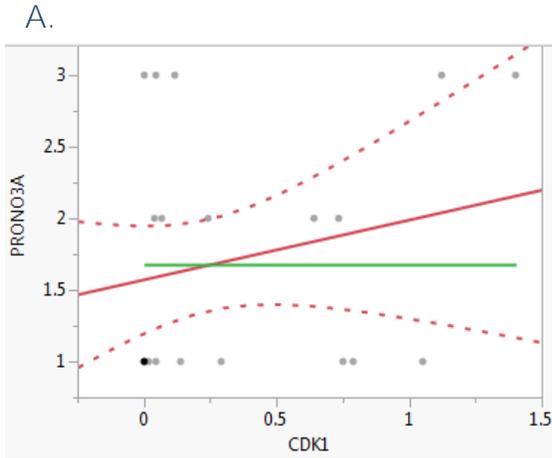


Análisis del pronóstico a 3 años del paciente pediátrico en función de la expresión de los genes en estudio en la población muestral.

De manera similar a como se realizó el análisis anterior, también se confrontó el pronóstico a 3 años contra el nivel de expresión de cada uno de los genes en estudio (gráfico 8). Para elaborar el análisis, se asoció al estatus como valor numérico; es importante mencionar que el estatus de los niños reportado en la base de datos tiene por lo menos 3 años, a partir del diagnóstico en el INP.

Tomando en cuenta lo anterior, se asignó el valor de 3 a los niños con el estatus McE y MsE, el valor de 2 a los niños VcE y el valor de 1 a los niños VsE y se realizó la regresión con valores numéricos en cada uno de los ejes. Ninguno de los valores de P correspondientes a cada uno de los análisis se encuentra por debajo de 0.05 (*CDK1* $p=0.2998$; *CCNB1* $p=0.5922$, *CDKN3* $p=0.6006$ y *ESCO2* $p=0.1123$). Los datos se muestran dispersos con valores muy lejanos a 1 para R^2 (*CDK1* $R^2=0.037013$, *CCNB1* $R^2=0.010016$, *CDKN3* $R^2=0.009569$ y *ESCO2* $R^2=0.084648$). Por lo tanto, estos resultados no permiten realizar una predicción ni asociación de los niveles de expresión con el pronóstico de los pacientes con LLA





Regresión lineal.

Gen	Ecuación	R cuadrada	P
CDK1	Pronóstico=1.5766056+0.4174972*CDK1	0.037013	0.2998
CCNB1	Pronóstico=1.7508729-0.1898577*CCNB1	0.010016	0.5922
CDKN3	Pronóstico=1.613397+0.1914122*CDKN3	0.009569	0.6006
ESCO2	Pronóstico=1.5048726+0.7133918*ESCO2	0.009569	0.1123

Gráfica 8. Ajuste bivalente. Regresión lineal de pronóstico a 3 años en función de la expresión del gen.

8 A Regresión lineal de pronóstico a 3 años en función de nivel de expresión de CDK1,

8 B Regresión lineal de pronóstico a 3 años en función de expresión de CCNB1,

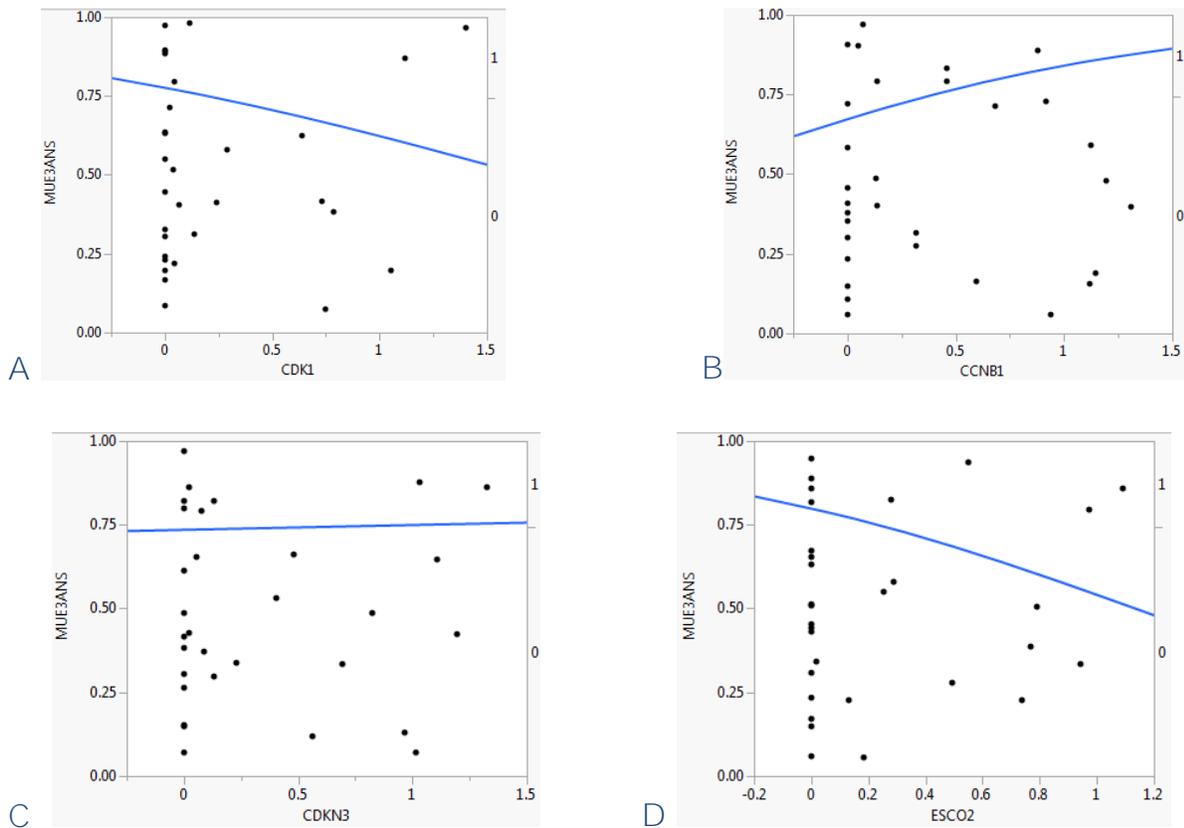
8 C Regresión lineal de pronóstico a 3 años en función de expresión de CDKN3,

8 D Regresión lineal de pronóstico a 3 años en función de expresión de ESCO2.



Análisis entre el estatus de fallecido a 3 años del paciente pediátrico contra el nivel de expresión de los genes en estudio en la población muestral.

Análisis de regresión logística.



Análisis de regresión logística

Gen	Error estándar	ji cuadrado	Prob>ji cuadrado
CDK1	0.9702026	0.59	0.4416
CCNB1	1.0353264	0.84	0.3583
CDKN3	0.9449064	0.01	0.9356
ESCO2	1.111049	1.21	0.2713

Gráfica 9. Análisis de regresión logística de muerte a 3 años en función de la expresión de cada uno de los genes.

9 A Ajuste logístico de Muerte a 3 años en función de la expresión de CDK1, 9 B Ajuste logístico de Muerte a 3 años en función de la expresión de CCNB1, 9 C Ajuste logístico de Muerte a 3 años en función de la expresión de CDKN3, 9 D Ajuste logístico de Muerte a 3 años en función de la expresión de ESCO2.



Finalmente, se aplicó el análisis de regresión logística, para dicho análisis, la variable dicotómica fue la muerte a 3 años (muerto=1 y no muerto=0) contra el nivel de expresión de cada uno de los genes. La prueba utilizada para determinar el valor de P fue chi cuadrada, ninguno de los valores de P arrojados por el análisis se encuentran por debajo de 0.05, de forma contraria a lo que se esperaba (*CDK1* p=0.4416, *CCNB1* p=0.3583, *CDKN3* p=0.9356 y *ESCO2* p=0.2713). Este análisis, contribuye a considerar, que no hay relación entre la muerte de los niños y el nivel de expresión de cada uno de los genes.

Contrario a lo que se esperaba, no se consiguieron resultados contundentes para el gen *CDK1*, que pese a que su actividad y/o expresión está poco documentada para la LLA, existen reportes para LMA donde se observa el incremento de la expresión, principalmente en células que tienen delección del 5q. También para este tipo de leucemia, la localización subcelular cobra importancia, pues pacientes con altos niveles de CDK1 nuclear tienden a un pobre pronóstico respecto a los que tienen niveles más bajos [31]. Sin embargo, para el presente estudio, los niveles de CDK1 no resultaron relevantes, al confrontarse con parámetros asociados al pronóstico pobre, como mayor número de recaídas o menor tiempo de vida a partir del diagnóstico.

Respecto a la Ciclina B1 y a ESCO2, tampoco se ha profundizado mucho sobre su papel en neoplasias hematológicas. Nuestros resultados no muestran un significado estadístico entre los niveles de expresión y las características clínicas asociados al mal pronóstico.



CONCLUSIONES.

Ningún resultado es contundente, pues la expresión de mRNA de los genes *CDKN3*, *ESCO2*, *CDK1*, *CCNB1* en los pacientes estudiados fue heterogénea.

No hay asociación de la expresión de mRNA de los genes con el pronóstico de los pacientes con LAL.

El incremento de la expresión de CDKN3 podría estar asociado a un mayor número de recaídas, sin embargo se requiere de un estudio más profundo.

PERSPECTIVAS.

1. Ampliar la *n* muestral, para estudios de niveles de expresión de CDKN3 por PCR.
2. Análisis estadístico de las muestras de pacientes que muestran la translocación Bcr-Abl vs el nivel de expresión de CDKN3 con la finalidad de ver si existe alguna relación.
3. Estudios de localización subcelular para CDK1 en muestras de pacientes. Análisis estadístico de localización vs nivel de expresión.
4. Incluir al gen CDK2, para análisis de niveles de expresión por PCR de punto final en las muestras ya disponibles.



ANEXO A. Base de datos.

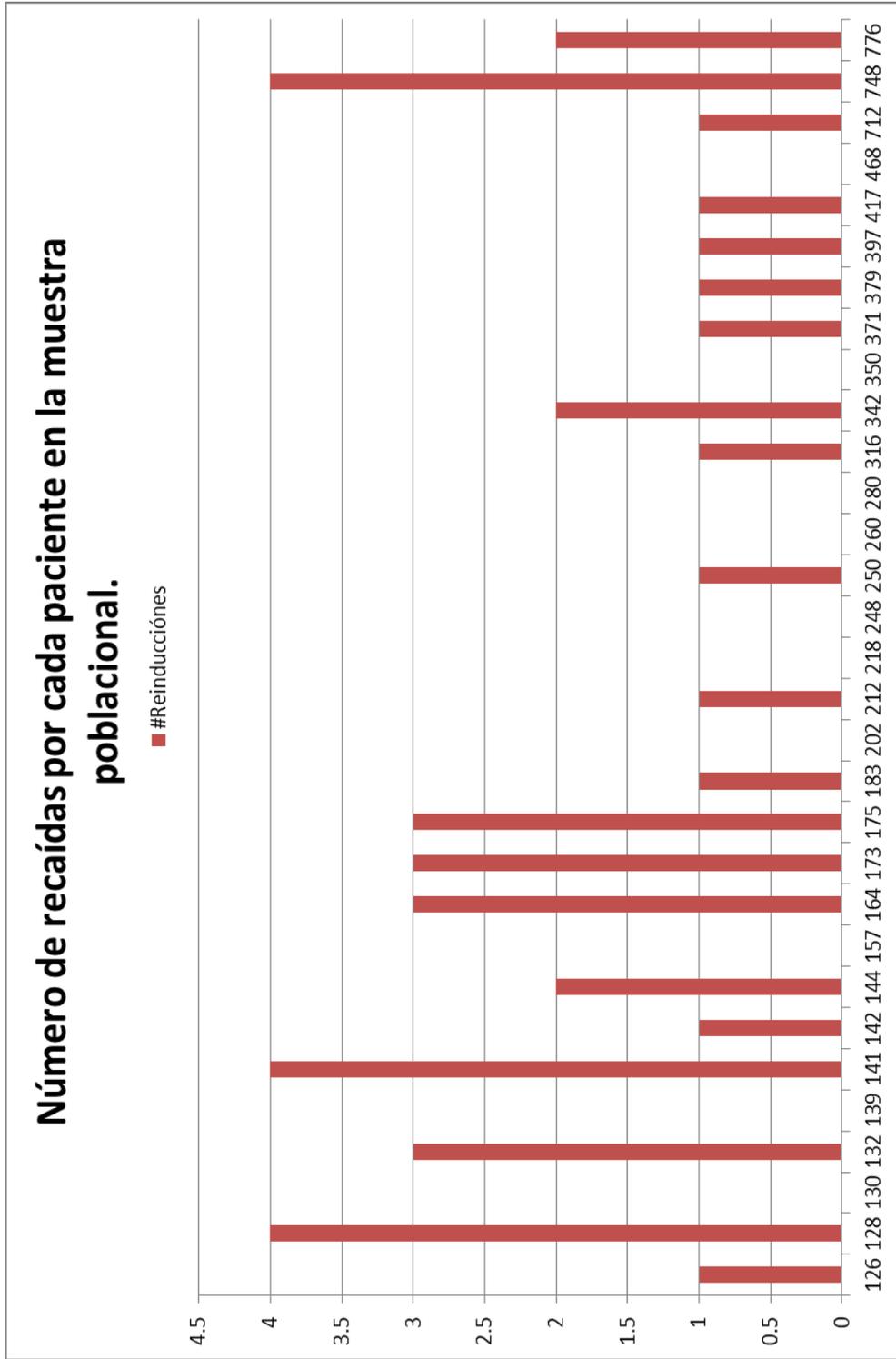
Vial	Expediente	Género	Edad Diag	Fecha Dz	Dz	Estatus	Edad Def	Fecha Def	Resp. Ventana Est.	Blastos (%)	Ind. Remisión	Reinducción	#Reinducciones
126	452288	M	11	jul-07	LLA-LI preB	V&E	-	-	No	90	Si	Si	1
128	452254	M	9	ago-07	LAL	McE	12	dic-10	Si	70	Si	Si	4
130	453531	M	19	sep-07	LAL Preb	V&E	-	-	No	80	Si	No	0
132	453796	F	5	oct-07	LAL LI preB	V&E	-	-	Si	98	Si	Si	4
139	456734	M	4	abr-08	LAL	McE	6	jul-10	Si	36	No	No	1
141	457723	F	3	jul-08	LAL	V&E	-	-	si	51	Si	Si	4
142	457936	M	13	jun-06	LLA	McE	15	oct-10	Si	99	No	Si	1
144	457341	F	6	may-08	LAL-LI preB	V&E	-	-	No	95	No	Si	1
157	454271	M	8	oct-07	LAL	McE	8	nov-07	No	96	No	No	0
164	457206	F	2	may-08	LLA-LI ARHIPOIDIPLOIDIA	V&E	-	-	No	88	Si	Si	3
173	458373	M	8	jul-08	LAL	V&E	-	-	Si	81	Si	Si	3
175	458826	M	12	ago-08	LAL	McE	13	sep-09	Si	80	No	Si	3
183	457792	F	9	jun-08	LAL preB	V&E	-	-	Si	87	Si	Si	1
202	458161	M	3	jul-08	LLA-LI AR carga tumoral	V&E	-	-	Si	91	No	No	0
212	458335	M	3	jul-08	LAL preB	V&E	-	-	No	80	Si	Si	3
218	458359	M	5	jul-08	LAL	V&E	-	-	Si	90	Si	No	0
248	459679	M	15	oct-08	LLA-LI	V&E	-	-	Si	90	No	No	0
250	459846	M	3	oct-08	LAL pre B	McE	6	ene-12	Si	90	si	Si	2
260	456051	F	9	mar-08	LAL LI	M&E (RCC)	11	ago-09	Si	28	Si	No	0
280	460428	F	11	dic-08	LAL LI DE AR	V&E	-	-	No	100	Si	No	0
316	460947	F	2	ene-09	LLA LI	V&E	-	-	Si	99	Si	Si	1
342	461351	M	9	may-07	LLA-LI DE ALTO RIESGO	V&E	-	-	Si	72	Si	Si	2
350	457757	M	14	jun-08	LAL	V&E	-	-	Si	88	Si	No	0
371	461771	F	4	mar-09	LAL LI	V&E	-	-	Si	70	si	Si	1
379	461887	M	8	mar-09	LAL preB AR carga tumoral	McE	10	ago-11	Si	100	Si	Si	1
397	462189	F	4	abr-09	LAL preB AR	V&E	-	-	Si	91	Si	Si	1
417	462524	M	4	ene-09	LAL LI	V&E	-	-	Si	100	Si	Si	1
468	462647	F	4	may-09	LAL LI	V&E	-	-	Si	79	Si	No	0
712	464129	M	8	ago-09	LAL PreB	V&E	-	-	Si	57	Si	Si	1
748	464885	M	1	ago-09	LAL LI	V&E	-	-	No	ND	Si	Si	3
776	465227	M	4	sep-09	LAL LI	V&E	-	-	No	57	Si	Si	0

Base de datos de pacientes pediátricos con LLA de células B diagnosticados y tratados dentro del INP.

Vial	Inicio de Ventana	Fecha 1ra reintroducción	Días a la 1ra reintroducción	Fecha 2da recaída	Días a la 2a reintroducción	Fecha 3ra recaída	Días a la 3a reintroducción	Fecha 4ta recaída	Días a la 4a reintroducción	Fecha última consulta	Días hasta la última consulta	Fecha def	Días a la defunción
126	11/07/07	27/03/08	260							18/09/13	2261		
128	24/08/07	15/10/08	418	23/02/09	131	23/11/09	273	17/02/10	55			04/12/10	1188
130	07/09/07									26/09/07	19		
132	03/10/07	20/10/08	383	01/12/08	42	22/04/09	142	19/02/10	58	20/08/13	2148		
139	09/04/08	02/07/08	84									21/07/10	833
141	04/07/08	22/04/09	292	03/02/10	287	16/06/10	193	02/11/10	109	03/05/13	1763		
142	24/06/08	20/03/09	273									14/10/10	842
144	20/05/08	14/12/09	573							23/07/13	1890		
167	29/10/07											05/11/07	7
164	13/05/08	27/01/09	259	02/02/10	371	20/02/10	18			11/04/13	1794		
173	29/07/08	08/11/10	528	16/08/10	220	20/12/10	125			07/08/13	1835		
175	19/08/08	13/05/09	267	27/08/09	106							06/09/09	394
183	26/06/08	25/04/09	303							14/10/13	1936		
202	10/07/08									17/10/08	99		
212	22/07/08	26/03/09	247	31/08/11	888	26/04/12	239			22/10/13	1918		
218	23/07/08									18/09/13	1893		
248	09/10/08									04/03/09	146		
250	27/10/08	01/08/10	612	03/03/11	214							22/12/12	1517
260	25/02/08											16/08/09	538
280	03/12/08	16/02/11	805							09/09/13	1741		
316													
342	15/05/07	03/12/08	568	09/07/09	218					26/09/12	1961		
350	25/06/08									23/08/13	1895		
371	12/03/09	01/10/09	203							01/10/13	1664		
379	16/03/09	16/02/11	702									08/08/11	875
397	03/04/09	30/10/09	241							28/07/10	481		
417	29/04/09	15/07/11	807							04/10/13	1619		
468	01/07/09									04/11/13	1587		
712	10/08/09									23/11/12	1201		
748	30/09/09	19/05/10	231	28/12/10	223	13/06/11	167			09/10/13	1470		
776	20/10/09									31/05/13	1319		

Parte 2. Base de datos de pacientes pediátricos con LLA de células B diagnosticados y tratados dentro del INP.

ANEXO B. Gráfica



Gráfica 10. Número de recaídas por paciente



REFERENCIAS.

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
2. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. (2011).
3. Teitell, M. a & Pandolfi, P. P. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu. Rev. Pathol.***4**, 175–98 (2009).
4. Pérez-Saldivar, M. L. *et al.* Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer***11**, 355 (2011).
5. Poole, C., Greenland, S., Luetters, C., Kelsey, L. J. & Mezei, G. Socioeconomic status and childhood leukaemia: a review. *Int. J. Epidemiol.***35**, 370–384 (2006).
6. Mejía-Aranguré, J. M. *et al.* Incidence of leukemias in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer***5**, 33 (2005).
7. Pui, C., Boyett, J. & Relling, M. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.***17**, 818–824 (1999).
8. Margolin, J., Steuber, P. & Poplack, D. *Principles and practice of pediatric oncology.* (2006).
9. Mejia-arangure, J. M. *et al.* Magnetic Fields and Acute Leukemia in Children With Down Syndrome. *Lippicott Williams & Wilkins***18**, 1–4 (2007).
10. Haferlach, T. *et al.* Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood***106**, 1189–98 (2005).
11. Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature***446**, 758–64 (2007).
12. Yeoh, E. *et al.* Classification , subtype discovery , and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell***1**, 133–143 (2002).



13. Dördelmann, M. *et al.* Prednisone Response Is the Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood***94**, 1209–1217 (1999).
14. Bruce, Alberts; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, K. W. P. *Biología Molecular de la célula*. (2004).
15. Kastan, M. B. & Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature***432**, 316–23 (2004).
16. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer***9**, 153–66 (2009).
17. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclindependent kinases. *Trends Biochem* 630–641 (2005).
18. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer***1**, 222–231 (2001).
19. Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. & Dean, D. C. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell***98**, 859–869 (1999).
20. Kops, G. J., Foltz, D. R. & Cleveland, D. W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***101**, 8699–8704 (2004).
21. Kops, G. J. P. L., Weaver, B. a a & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer***5**, 773–85 (2005).
22. Peters, J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell. Biol.***9**, 931–943 (2002).
23. Cleveland, D. W., Mao, Y. & Sullivan, K. F. Centromeres and kinetochores. From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell***112**, 407–421 (2003).
24. Sakurikar, N., Eichhorn, J. M. & Chambers, T. C. Cyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)/cyclin B1 dictates cell fate after mitotic arrest via phosphoregulation of antiapoptotic Bcl-2 proteins. *J. Biol. Chem.***287**, 39193–204 (2012).



25. Chu, R., Terrano, D. T. & Chambers, T. C. Cdk1/cyclin B plays a key role in mitotic arrest-induced apoptosis by phosphorylation of Mcl-1, promoting its degradation and freeing Bak from sequestration. *Biochem. pharmacobiology*.**83**, 199–206 (2012).
26. Friedman, J. R. *et al.* KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev***10**, 2067–2078 (1996).
27. Hannon, G. J., Casso, D. & Beach, D. KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***91**, 1731–5 (1994).
28. Nalepa, G. *et al.* The tumor suppressor CDKN3 controls mitosis. *J. Cell Biol.***201**, 997–1012 (2013).
29. Cecchini, M. J. & Dick, F. A. The biochemical basis of CDK phosphorylation-independent regulation of E2F1 by the retinoblastoma protein. *Biochem. J.***434**, 297–308 (2011).
30. Okamoto, K., Kitabayashi, I. & Taya, Y. KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun***351**, 216–222 (2006).
31. Hedblom, A. *et al.* CDK1 interacts with RAR γ and plays an important role in treatment response of acute myeloid leukemia. *Cell Cycle***12**, 1251–66 (2013).
32. Radomska, H. S. *et al.* Targeting CDK1 promotes FLT3-activated acute myeloid leukemia differentiation through C / EBP α . **122**, (2012).
33. Qian, Z., Fernald, A., Godley, L., Larson, R. & Le Beau, M. Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA***23**, 14925–14930 (2002).
34. Kim, D. H. Prognostic implications of cyclin B1, p34cdc2, p27(Kip1) and p53 expression in gastric cancer. *Yonsei Med. J.***48**, 694–700 (2007).
35. Begnami, M. D., Fregnani, J. H. T. G., Nonogaki, S. & Soares, F. A. Evaluation of cell cycle protein expression in gastric cancer: cyclin B1 expression and its prognostic implication. *Hum. Pathol.***41**, 1120–1127 (2010).



36. Murakami, H., Furihata, M., Ohtsuki, Y. & Ogoshi, S. Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch***434**, 153–158 (1999).
37. Soria, J., Jang, S. & Khuri, F. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res***60**, 4000–4004 (2000).
38. Ito, Y. *et al.* Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology***59**, 68–74 (2000).
39. Yunwei Ou, Liying Ma, Zhen Huang, Wei Zhou, Chunling Zhao, Bailin Zhang, Yongmei Song, Chunjiang Yu, Q. Z. Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells. *Landes Biosci.***14**, 45–55 (2013).
40. Yasuda, M. *et al.* Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J Cancer Res Clin Oncol***128**, 412–416 (2002).
41. Lee, S. W., Reimer, C. L., Fang, L., Iruela-Arispe, M. L. & Aaronson, S. a. Overexpression of kinase-associated phosphatase (KAP) in breast and prostate cancer and inhibition of the transformed phenotype by antisense KAP expression. *Mol. Cell. Biol.***20**, 1723–32 (2000).
42. Xing, C. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.***420**, 29–35 (2012).
43. Lee, J. *et al.* Metastasis of Neuroendocrine Tumors Are Characterized by Increased Cell Proliferation and Reduced Expression of the ATM Gene. *PLoS One***7**, 9–11 (2012).
44. Niculescu, M. D., Yamamuro, Y. & Zeisel, S. H. Choline availability modulates human neuroblastoma cell proliferation and alters the methylation of the promoter region of the cyclin-dependent kinase inhibitor 3 gene. *J. Neurochem.* 1252–1259 (2004). doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02414.x
45. Mannini, L., Menga, S. & Musio, A. The Expanding Universe of Cohesin Functions: A New Genome Stability Caretaker Involved in Human Disease and Cancer. *Hum. Mutat.***31**, 623–630 (2010).



46. Whelan, G. *et al.* Cohesin acetyltransferase Esco2 is a cell viability factor and is required for cohesion in pericentric. *EMBO J.***31**, 71–82 (2012).
47. Ivanov, D. & Nasmyth, K. A physical assay for sister chromatid cohesion in vitro. *Mol. Cell. Biol.***27**, 300–310 (2007).
48. Ogilvy, C., Pakzaban, P. & Lee, J. Oculomotor nerve cavernous angioma in a patient with Roberts syndrome. *Surg Neurol***40**, 39–42 (1993).
49. Ryu, B., Kim, D., Deluca, A. & Alani, R. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS One***2**, 594 (2007).
50. Woxowiec D., Deviller P., Simonin D. CDK1 is a marker of proliferation in human lymphoid cells. *International Journal of Cancer***61**, 381–388 (1995).
51. Phase I study of the novel Cdc2/CDK1 and AKT inhibitor terameprocic in patients with advanced leukemias. *Investigational new drugs*, (2014).
52. Yu Y, Jiang X, Schoch BS et al. Aberrant splicing of cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase KAP increases proliferation and migration in glioblastoma. *Cancer Res***67**, 130–138 (2007)
53. Chen Q, Chen K., Guo G., et al. A critical role of CDKN3 in Bcr-Abl-mediated tumorigenesis. *PLoS One* **9** e111611 (2014).
54. Druker B. J., Sawyers C. L., et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine Kinase in the blast crisis of the chronic myeloid leukemia and lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *The N Engl J of Med* **14**, 1038–1042 (2001).
55. Rabbitts T. H. Translocations, Master Genes, and Differences between the Origins of Acute and Chronic Leukemias. *Cell* **67**, 641–644 (1991).
56. Geoffrey M. Cooper. The cell: A molecular approach, Sinauer Associates Inc, 2nd edition (July 15, 2000). Chapter 13: Etiology of cancer: cancer genetics.
57. Busslinger Meinrad, Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. 22:55–79
58. Aurora Medina, Rogelio Paredes, Roberto Rivera, Protocolos técnicos: Leucemia aguda linfoblástica, 2010, pp 10–59.

