



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP)

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE SPLICING
ALTERNATIVO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA
PROTEÍNA ZNF 695

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

RICARDO DE LA ROSA VÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. SERGIO JUÁREZ
MÉNDEZ

ASESOR INTERNO:
DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Ciudad de México, 2018



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El término de esta tesis no hubiera sido posible sin el respaldo de catedráticos de la Universidad Nacional Autónoma de México y el apoyo del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Sergio Juárez Méndez, investigador del INP, por dirigir este trabajo. Durante el tiempo que realice la tesis, conté con su cooperación, dedicación y esfuerzo que fue de enorme valor. Gracias por alentarme a ser mejor en todos los aspectos de mi vida y por guiar mi desarrollo académico. Su constancia en el laboratorio me ayudó a adquirir mejores conocimientos teóricos y de las técnicas empleadas en esta investigación. Agradezco su amistad y apoyo en todo momento.

Especialmente agradezco a mi asesor interno, el Dr. Hugo López Muñoz, por la colaboración en este trabajo, con sus conocimientos observaciones y comentarios los cuales fueron muy importantes para la última versión del escrito.

Agradezco a todos los académicos del Laboratorio de Oncología Experimental del INP, por la calidez y disponibilidad que me brindaron en todo momento. De la misma manera les agradezco por sus comentarios, sugerencias y críticas constructivas que en algún momento tuvieron para mí, las cuales fueron de gran valor para mi desarrollo profesional.

Agradezco al M. en C. Carlos Bautista Reyes, Dr. Luis Sánchez Sánchez y a la M. en C. Reynalda Roldan Pérez por su disponibilidad para formar parte del jurado, para la revisión de este escrito; sus sugerencias y observaciones fueron valiosas para la mejora de este trabajo.

La tesis fue realizada con el apoyo del proyecto SEP-CONACyT243233

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, Magdalena Vázquez Vázquez y Rubén De La Rosa Zamora, por su inagotable amor y paciencia, por siempre estar ahí cuando los necesito he impulsarme a ser siempre mejor, por levantar mi ánimo en esos momentos difíciles, por su esfuerzo el cual me ayudo a llegar tan lejos.

A mis familiares y amigos, por su constante apoyo, por su alegría y calidez, por inspirarme a salir siempre adelante, porque son una parte vital en mi vida y finalmente por hacer de mi tiempo en la Facultad una experiencia única.

A Maritza Álvarez por su paciencia y amor a lo largo de los años, por sus consejos y observaciones, por su apoyo incondicional, gracias por estar siempre conmigo.

A mis tías María y Martha, por apoyarme todo momento, por brindarme su cariño y amistad.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Oncología Experimental, siempre estarán presentes en mis recuerdos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 ENSAMBLAJE DEL <i>SPLICEOSOMA</i>	4
2.2 SPLICING ALTERNATIVO	7
2.3 CÁNCER.....	11
2.3.1 <i>Leucemia</i>	12
2.3.1.1 Leucemia aguda linfoblástica	12
2.3.1.2 Manifestaciones Clínicas	13
2.3.1.3 Tratamiento Médico	14
2.4 BIOLOGÍA MOLECULAR EN LEUCEMIA	16
2.5 PROTEÍNAS DEDOS DE ZINC	18
2.6 MECANISMOS MOLECULARES DE KRAB-ZNF	22
2.7 DEDOS DE ZINC 695 (ZNF 695)	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	27
7. MATERIALES Y MÉTODO	28
7.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	30
7.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA	30
7.3 RPL4 EN PCR PUNTO FINAL.....	31
7.4 AMPLIFICACIÓN DE ZNF695 EN PCR PUNTO FINAL.....	31
7.5 RACE 3'	33
7.6 PURIFICACIÓN DE BANDAS DE PRODUCTO DE PCR.....	33
7.7 SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	34
8. RESULTADOS	35
8.1 IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS PARA ZNF695.....	35
8.2 RACE 3'	40
8.3 MODELO SA DEL GEN ZNF695	44
8.4 EVALUACIÓN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA (GRUPO CONTROL).....	45
8.5 EVALUACIÓN MUESTRAS DE PACIENTES CON LLA	47
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	61
11. PERSPECTIVAS	62
12. BIBLIOGRAFÍA	63

Abreviaturas

7mG	7 metilguanosina
CTD	Domino carboxilo terminal de la polimerasa II
ESE	Potenciadores de splicing exónico
ESS	Silenciadores de splicing exónico
FTs	Factores de transcripción
hnRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HP1	Proteína heterocromatina 1
ISE	Potenciadores de splicing intrónico
ISS	Silenciadores de splicing intrónico
KAP-1	Proteína asociada a KRAB 1
KRAB	Krüppel associated box
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloblástica crónica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crónica
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PHD	Tandem Plant homeodomain
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RBCC	Ring finger/B box/Coiled-Coil
SA	Splicing alternativo
SF1	Factor de splicing 1
snRNP	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
SR	Serian/ Arginina
ss	sitio de splicing
ZF	zinc finger

1. Resumen

La maduración del RNA mensajero (mRNA) es un complejo proceso que involucra la adición de un capuchón de 7 metilguanósina (7mG) en 5', poliadenilación en el 3' y escisión de intrones (splicing). La maduración de los mRNA involucra la interacción del RNA, mediada por secuencias conservadas (GU-AG) y el spliceosoma; conformado por cinco ribonucleoproteínas pequeñas (snRNP: U1, U2, U4, U5 y U6) y más de 200 factores asociados. Por otra parte, el splicing alternativo (SA) permite la generación de una diversidad de mensajeros a partir de precursores (pre-mRNA), este mecanismo permite generar distintas proteínas, en consecuencia, función diferencial.

El control transcripcional en células eucariotas es un proceso complejo que, involucra un gran número de factores transcripcionales (FTs) la característica esencial de los FT, es la presencia de dominios que permite la unión específica al DNA, facilitando la activación/represión transcripcional. Los FTs más abundantes en eucariotas son las proteínas dedos de zinc (C_2H_2), éstos son coordinados por cuatro residuos altamente conservados, dos cisteínas y dos histidinas, que junto con ion de zinc proporcionan estabilidad a la proteína. Otro dominio conservado es el KRAB (caja asociada a Kruppel) que promueve la represión transcripcional. La proteína ZNF695 pertenece a la familia dedos de zinc C_2H_2 y contiene el dominio KRAB, hasta el momento se han reportado tres variantes en NCBI, siendo una de ellas no codificante. Nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad, ha revelado el incremento de la expresión de ZNF695 en tejido neoplásico

de ovario y líneas celulares derivadas de cáncer de ovario; además, se han observado cambios en la expresión exónica de ZNF695 sugiriendo la presencia de variantes de mRNA de ZNF695. Se ha evidenciado que los FTs específicamente de los dedos de zinc tipo C₂H₂, cumplen funciones de suma importancia en el desarrollo normal del linaje linfoide, es el caso de la proteína ikaros (Ik1, Ik2, Ik3), investigaciones recientes han encontrado una variante de ikaros (IK6) generada por splicing alternativo, la cual se encuentra sobre expresada en LLA, bloquea las variantes Ik1, Ik2, Ik3 de ikaros perdiendo así su función y promoviendo la supervivencia y auto-renovación del linaje linfoide. Por lo anterior este estudio se centró en la caracterización y expresión de variantes de ZNF659 en líneas celulares por PCR Punto final y secuenciación Sanger; se identificaron cuatro variantes adicionales no reportadas de ZNF695, generadas por splicing alternativo, ZNF695-V4 (con sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2), ZNF695-V5 (con sitio donador de *splicing* 5' en el exón 1 y 2) similares en secuencia a la variante uno, ZNF695-V6 (con sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2), ZNF695-V7 (con sitio donador de *splicing* 5' en el exón 1 y 2) similares en secuencia a la variante tres, además se evaluó la expresión de dichas variantes en muestras de sangre periférica de individuos sanos (grupo control) que no tubo excreción de ZNF695-V1 y ZNF695-V3, en muestras de pacientes con LLA, las muestras L-3,L-23; se observó la expresión de las seis variantes, es importante destacar que estas muestras de pacientes con LLA mostraron co-expresión de las variantes de ZNF659.

2. Introducción

En la década de 1970, se descubrió que el *splicing*, es un mecanismo de procesamiento del mRNA en donde se retiran los intrones y unen los exones. El cual, está regulado para asegurar el correcto procesamiento del RNA, y de esta manera sea traducido a proteínas, las cuales deben estar presentes en la célula en un momento determinado. Debido a la diversidad en secuencia y estructura, el RNA tiene un papel crucial en la biología celular. Es importante destacar que, el RNA es regulado por numerosas proteínas que modulan su contenido y su expresión espacio-temporal (Licatalosi & Darnell 2010). El proceso de maduración del mRNA incluye: la adición de un capuchón de 7 metilguanosina (7mG) en el extremo 5', poliadenilación del extremo 3' y *splicing* o corte y empalme; que consiste en la eliminación de intrones (secuencias no codificantes) y el empalme de los exones (secuencias codificantes) (Armendariz Borunda & Socorro Juan 2011; Clancy 2008). El mecanismo bioquímico por el cual se produce el *splicing*, está bien caracterizado. Los intrones se eliminan de los transcritos primarios por medio de una escisión en secuencias conservadas llamadas sitios de *splicing*. Estos sitios se encuentran en los extremos 5' y 3' de los intrones. Comúnmente, la secuencia de RNA que se elimina comienza con el dinucleótido Guanina-Uracilo (GU) en su extremo 5', y termina con Adenina-Guanina (AG) en su extremo 3'. Estas secuencias consenso son de suma importancia ya que el cambio de uno de los nucleótidos resulta en la inhibición del *splicing*. Otra secuencia importante es el punto de ramificación, se encuentra entre los nucleótidos 18 a 40 río arriba del extremo 3' del intrón. El punto de ramificación siempre contiene una adenina. La secuencia típica

es YNYYRAY, donde Y indica una pirimidina, N representa cualquier nucleótido, R representa cualquier purina, y A representa adenina (Clancy 2008).

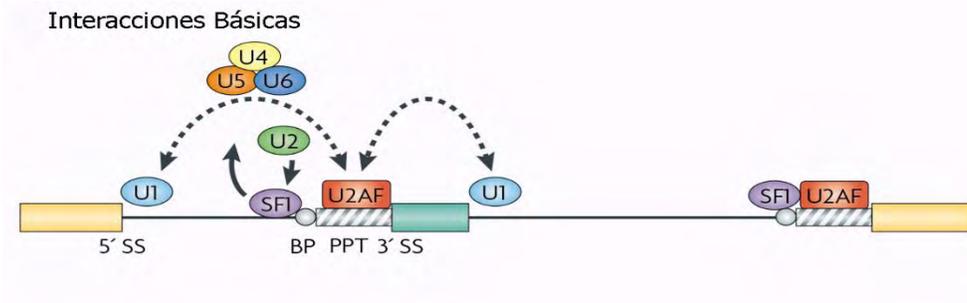


Figura 1 splicing. Elementos necesarios para splicing, pre-mRNA incluyen los sitios de splicing 5 'y 3' (ss), una secuencia del punto de ramificación (BP) río arriba del 3 'ss, tramo de polipirimidina (PPT).

2.1 Ensamblaje del *Spliceosoma*

Para que se lleve a cabo el *splicing* el pre-mRNA contiene una serie de secuencias conservadas que contribuyen a la delimitación del intrón, dichas secuencias son, sitio de splicing 5 '(ss), sitio de splicing 3' (ss), punto de ramificación (BS) y en eucariotas superiores es seguido por un tramo de polipirimidina (PPT) figura1 (Will & Lührmann 2006). El splicing es catalizado por el spliceosoma, un complejo compuesto de cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP: U1, U2, U4, U5 y U6). El spliceosoma es ayudado por más de 200 factores que actúan en trans y reconocen secuencias reguladoras en *cis* dentro del pre-mRNA y esto guía al spliceosoma para incluir o excluir exones específicos de un gen (Chen & Weiss 2014). Para el ensamblaje del spliceosoma en primer lugar, U1 snRNP reconoce el sitio de splicing 5'ss, formando en principio el complejo E (Figura 2). Además del reconocimiento de 5'ss puede ser reconocido por U1C, una subunidad de U1

snRNP. Este proceso es facilitado por el dominio carboxilo terminal de la polimerasa II (CTD), que interactúa directamente con snRNP U1, aunque el papel funcional de esta interacción todavía se encuentra bajo debate. La interacción entre la snRNP U1 y 5'ss en el complejo E es independiente de ATP, es bastante débil esta unión, por ello, se estabiliza con otros factores, como las proteínas SR. El sitio de splicing 3'ss del pre-mRNA es reconocido por el U2 snRNP y factores asociados, entre ellos el factor de splicing 1 (SF1) y U2 factores auxiliares (U2AFs), que son también componentes del complejo E (Matera & Wang 2014).

El proceso siguiente es dependiente de ATP, catalizado por helicasas DExD / H pre-mRNA de procesamiento 5 (Prp5) y Sub2, U2 snRNA reconoce la secuencia del punto de ramificación donde se encuentra una adenosina conservada e interactúa con U1 snRNP formando el pre-spliceosome (complejo A), este proceso se conoce como definición de exón. El complejo snRNP U1-U2 que se forma a través de los exones se conoce como el complejo de definición de exón. Después del montaje del complejo A, el U4-U6 y U5 snRNPs son reclutados como trisnRNP pre-ensamblados para formar el complejo B, en una reacción catalizada por la helicasa DExD / H Prp28. El complejo B resultante sufre una serie de reordenamientos conformacionales mediante múltiples RNA helicasas (Brr2, 114 kDa, U5 ribonucleoproteína pequeños nucleares (Snu114 y Prp2) para formar un complejo B catalítico activo (Complejo B *). También conducen a la formación de la estructura U2-U6 snRNA que cataliza reacción de splicing. La activación del complejo B también da la liberación de U4 y U1 y la exposición del extremo 5' de U6 snRNA (Matera & Wang 2014).

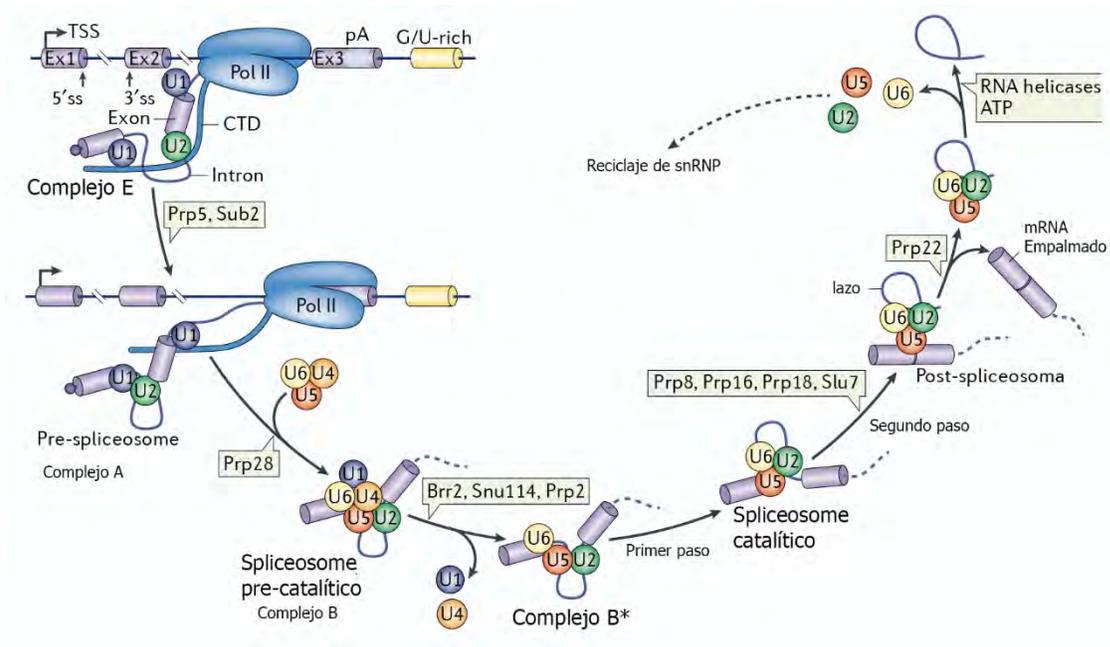


Figura 2.- Maquinaria de splicing, las secuencias conservadas permiten el ensamblaje del spliceosoma, representación del ensamblaje de la maquinaria de splicing y formación de los diferentes complejos que permiten el corte de los intrones. (Matera & Wang 2014)

Complejo B * completa la primera etapa catalítica de splicing, la generación de complejo C, que contiene el exón 1 libre y el intrón-exón 2 intermedio de lazo (Figura 2). Complejo C se somete a reordenamientos adicionales dependientes de ATP antes de llevar a cabo la segunda etapa catalítica de splicing, que dependen de Prp8, Prp16 y sintético letal 7 (Slu7) con snRNA U5 esto da lugar a un complejo post-spliceosoma que contiene el intrón lazo y exones ensamblados. Por último, la U2, U5 y U6 snRNPs se liberan y son reciclados para rondas adicionales de splicing. Al igual que otros pasos de reordenamientos del spliceosoma, la liberación del producto cortado y ensamblado es catalizada por helicasa DExD / H Prp22. El desmontaje del spliceosoma post-catalítico es también promovido por varias helicinas RNA (por ejemplo, Brr2, Snu114, Prp22 y Prp43) dependientes de ATP.(Matera & Wang 2014)

2.2 Splicing alternativo

Splicing alternativo (SA) ofrece una visión crítica y flexible de la regulación, ésta interviene en muchos procesos biológicos, tales como la diversidad de proteínas. El SA tiene un impacto importante en el fenotipo celular, a partir de una sola molécula pre-mRNA se realiza SA de diferentes maneras y da lugar a diferentes transcritos de mRNA maduro (variantes), que se traducen en proteínas distintas y varían en función. Aparentemente, más del 90% de los genes humanos tienen dos o más variantes de splicing, incrementando en gran medida la complejidad del transcriptoma y el proteoma. Por lo tanto, este mecanismo desempeña un papel importante en la regulación génica en la salud y se ve alterado en muchas enfermedades (Juárez-Méndez et al. 2013).

El SA está estrechamente regulado por elementos en cis, así como elementos que actúan en trans que se unen a los elementos cis. Los elementos que actúan en trans, son principalmente proteínas de unión a RNA, modulan la actividad del spliceosoma, los elementos en cis son potenciadores de splicing exónico (ESE), silenciadores de splicing exónico (ESS), potenciadores de splicing intrónico (ISE), y silenciadores de splicing intrónico (ISS). Por otra parte, los elementos que actúan en trans, son proteínas de unión a RNA que no forman parte del spliceosoma y desempeñan un papel en la selección y la actividad del sitio de splicing, estas proteínas se pueden dividir en tres clases: las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), proteínas ricas en serina y arginina (SR) y las proteínas de unión a RNA tejido específicos (por ejemplo: nova, neuronal PTB / hnRNPI,

familia Rbfo y la familia muscleblind / CELF) (figura 3b) (Chen et al. 2012; Lee et al. 2015).

El mecanismo canónico de SA sugiere que las proteínas ricas en serina/arginina se unen típicamente a ESE, mientras que ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) tienden a unirse a ESS o ISS (figura 3a). Dadas las funciones cruciales de estos reguladores en la maquinaria de splicing, se sabe que las mutaciones en cis realizan cambios, que interrumpen el código de splicing, para causar enfermedad. Los factores tejido específico, son proteínas de unión a RNA que auxilian al mecanismo de splicing, como nova o Rbfox, pueden actuar ya sea como activadores o represores. Un estudio reciente mostró que, las proteínas SR pueden cooperar y competir en la regulación de splicing. Estas proteínas también pueden reconocer motivos de secuencia de RNA cortas, que pueden funcionar como potenciadores de splicing, cuando se unen a exones, pero pueden reprimir el splicing cuando se unen a los intrones. Proteínas hnRNP también poseen actividad de unión a secuencias específicas de RNA, estos motivos a menudo pueden funcionar como silenciadores de splicing, sin embargo, en algunos casos pueden actuar como activadores. Por lo tanto, la actividad de elementos depende de la posición en la que se unen al pre-mRNA y pueden actuar como activadores o represores. (Chen et al. 2012; Lee et al. 2015)

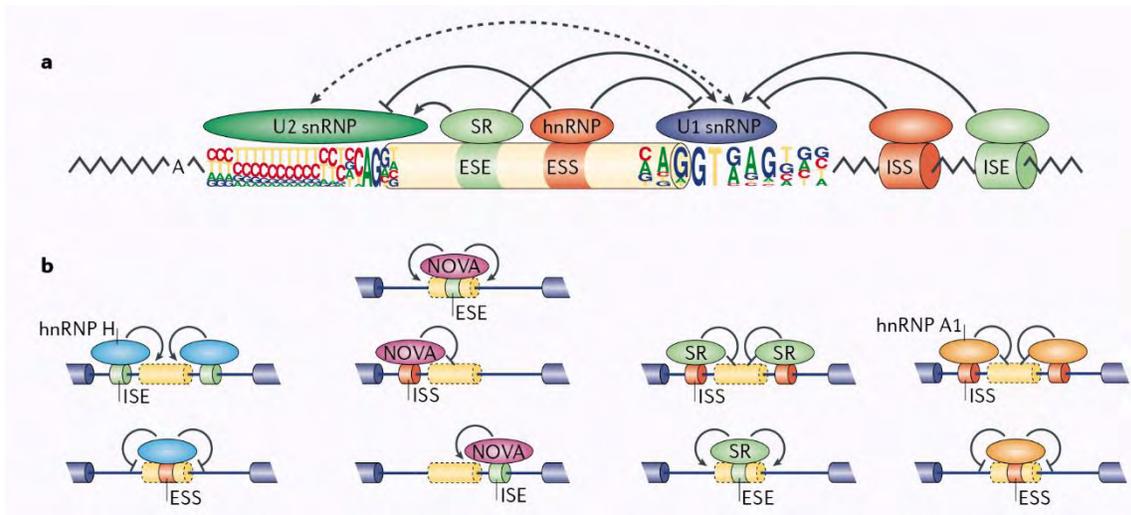


Figura 3 | Regulación del empalme alternativo. a | La elección del sitio de splicing se regula a través de secuencias en cis, actúan reclutando elementos en trans. Dependiendo de su localización se clasifican como potenciadores o silenciadores de splicing. Entre los elementos en trans se incluyen las proteínas SR, las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP). Los motivos de consenso de los sitios de empalme se muestran en el pictograma coloreado, la altura de cada letra representa la frecuencia de nucleótidos en cada posición. La flecha representa la formación del complejo de definición del exón. b | La actividad de la secuencia de splicing cis depende de la posición de estos. Se muestran cuatro ejemplos bien caracterizados. Los trectos Oligo-G, reconocidos por hnRNP H, funcionan como ISE para promover el splicing cuando están situados dentro de un intrón (superior), y como ESS cuando están situados dentro de los exones (inferior). Los motivos YCAAY, reconocidos por el antígeno ventral (NOVA), actúan como ESE cuando se encuentran dentro de un exón (superior), como ISS cuando se encuentra en el intrón antes un de un exón alternativo. Sitios de unión para las proteínas SR y hnRNP A1 también tienen actividades distintas cuando se encuentran en diferentes regiones en el pre-mRNA. (Matera & Wang 2014)

Dependiendo la interacción de los elementos en cis y trans se determina la ubicación de los segmentos de corte exón-intrón, así los eventos de SA pueden ser clasificados en cuatro patrones básicos (figura 4). Estos cuatro patrones principales de splicing son: (1) omisión de exón, (2) retención intrón, (3) sitio de splicing alternativo 5' (5' ss), y (4) el sitio de splicing alternativo 3' (3' ss). Además, los exones mutuamente excluyentes, iniciación alternativa y poliadenilación alternativa proporcionan otros dos mecanismos para la generación de diferentes isoformas de transcripción. Por otra parte, los diferentes tipos de SA puede ocurrir al mismo tiempo y un exón puede estar sujeto a más de un modo de SA (Chen et al. 2012).



Figura 4 | Diferentes tipos de splicing alternativo. Las cajas azules representan los exones en rojo son sitios de splicing alternativo. Los intrones se representan por líneas rectas entre cajas. Cuatro tipos de eventos de splicing comunes (1) omisión de exón (2) retención intrón (3) El sitio de splicing alternativo 5' (5' ss) (4) El sitio de splicing alternativa 3' (3' ss).

El cáncer es una enfermedad donde hay un crecimiento y diseminación incontrolados de células, puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo y se le denomina tumor. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede producir metástasis en puntos distantes del organismo (OMS 2017), en esta enfermedad se han observado alteraciones en el DNA, RNA y proteínas. El transcrito es fundamental en la biología de la célula neoplásica y se ha observado que su maduración puede generar productos distintos, denominados variantes de *splicing*, por ejemplo, Bcl2l1 posee un sitio de *splicing* alternativo 5' después del exón 2, produce una isoformas larga (BCL-xL) y otra corta (BCL-xS), ambas codificantes (Figura 5a). Mientras que BCL-xS promueve la apoptosis, Bcl-XL tiene efectos anti-apoptóticos. Algunos tipos de cáncer muestran expresión predominante de la isoforma BCL-xL. Del mismo modo, el receptor de (TNR6) es un receptor de superficie celular que puede iniciar la muerte celular cuando el ligando FAS se une a TNFS6. TNR6 está sujeto a SA (Figura 5b); en particular, una variante de splicing que carece de los dominios de transmembrana esto es resultado de la omisión del

exón 6. Este producto más corto es soluble e inhibe la muerte celular mediada por FAS. FAS soluble es detectable en el suero, con una mayor concentración encontrada en los pacientes de cáncer, en comparación con individuos sanos (Chen & Weiss 2014).

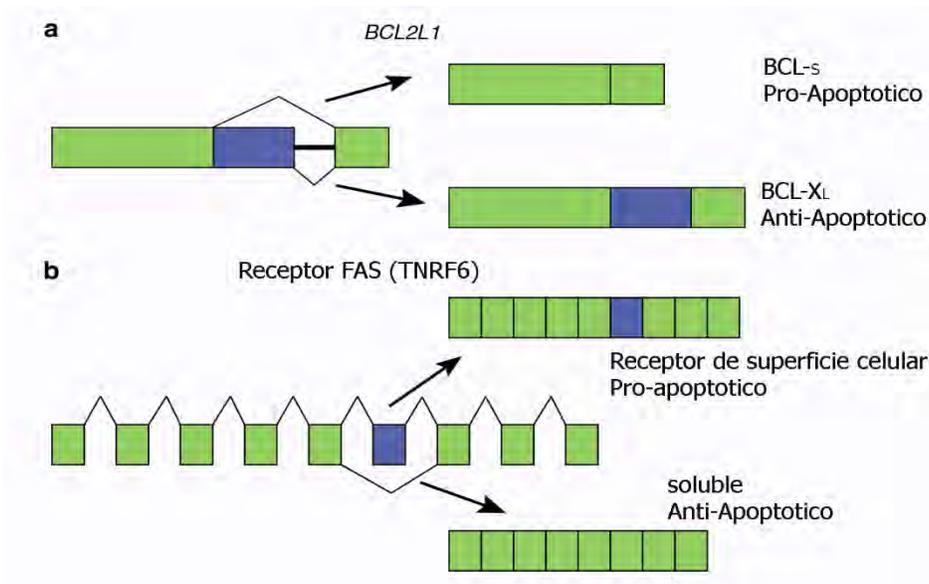


Figura 5.- SA que conduce a variantes antagonistas. a) Bcl2l1 se empalma en dos variantes basadas en un sitio splicing alternativo (azul). La expresión de los exones canónicos (verde) da como resultado una isoforma corta pro-apoptótica Bcl-XS, isoforma larga, BCL-XL, anti-apoptótica. Tamaño de exones está en relación con la longitud real b) El exón 6 de TNRF6 (azul). La inclusión del exón 6 en el mRNA conduce a la expresión del receptor de FAS. La omisión del exón 6 da como resultado una isoforma soluble del receptor, que tiene efectos anti-apoptóticos. (Chen & Weiss 2014)

2.3 Cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y solo es antecedida por enfermedades cardiovasculares. Es importante destacar que tan solo en 2015 se atribuyeron 8,8 millones de defunciones por alguna neoplasia. Los tipos de cáncer con mayor incidencia en varones es el cáncer pulmón, próstata, hepático, colorrectal, y gástrico (OMS 2013). En la población femenina la principal neoplasia es el cáncer de mama, seguido del cérvico-uterino, colorrectal, pulmón y gástrico

(OMS 2013). Mientras que en la población pediátrica (de 0 a 14 años de edad) las neoplasias más frecuentes son: leucemias (26,3%), tumores del sistema nervioso central (SNC) (20,7%) y linfomas (13,3%). En nuestro país la leucemia es la principal causa de morbilidad en la población de 0 a 14 años (62% en mujeres y 58.7% en hombres) y 2.57 por cada 100 mil personas se diagnostican anualmente con este tipo de cáncer (OMS 2017; OMS 2013; Frías et al. 2016).

2.3.1 Leucemia

La leucemia es una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolado de formas celulares inmaduras, de los componentes sanguíneos llamados blastos, se distinguen por invasión de la médula ósea, sangre periférica y otros tejidos. Es una enfermedad que se puede clasificar según la estirpe celular afectada, ya sea de la línea mieloide o la linfoide y a su severidad en, crónica que evolucionan con lentitud y aguda que evoluciona rápidamente. Por tal motivo, la leucemia se clasifica en cuatro tipos: leucemia mieloblástica crónica (LMC), leucemia linfoblástica crónica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Sánchez et al. 2016; Aranguré et al. 2005), de estos cuatro subtipos de leucemia, la LLA es la más frecuente con cerca del 80% de los casos diagnosticados por esta enfermedad.

2.3.1.1 Leucemia aguda linfoblástica

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una neoplasia maligna caracterizada por, ocasionar la proliferación de células precursoras de la serie linfoide y, que infiltra

más de 25% de la médula ósea. Es la neoplasia maligna más frecuente en los niños y representa 25% de todos los tipos de cáncer infantiles. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa 12% de todas las leucemias diagnosticadas en Estados Unidos, y 60% de todos los casos ocurre en personas menores de 20 años. En México, la LLA ocupa el séptimo lugar en cuanto a mortalidad en niños de uno a cuatro años de edad, con una tasa de 3.2/100 000 habitantes, y en los niños de 5 a 14 años es la segunda causa de muerte (Castillo-Martínez et al. 2009; Sánchez et al. 2016).

La incidencia de leucemia linfoblástica aguda es de 1/100,000 habitantes al año, es más frecuente en varones que en mujeres, así como en personas de raza caucásica que en personas de raza negra. Respecto de las zonas geográficas, hay prueba de mayor incidencia de LLA en la población del norte y occidente de Europa, norte de África y Oceanía. En México, en el año 2000 se informaron 1,926 casos nuevos, con tasa de 2/100,000 habitantes. De éstos 53% fueron hombres, con dos picos de manifestación, el primero en edad escolar y el segundo por arriba de 65 años de edad. En el mismo año se informaron 3,301 muertes por leucemia, con tasa de 3/100,000 habitantes y cociente hombre-mujer de 4/3 (Sánchez et al. 2016).

2.3.1.2 Manifestaciones Clínicas

Toda leucemia se diagnostica con base en su aparición clínica y el resultado del aspirado de médula ósea. La aparición de leucemia linfoblástica aguda varía según sus manifestaciones clínicas, que reflejan el grado de insuficiencia de la medula

ósea, infiltración extramedular y de agudeza. Casi la mitad de los pacientes presenta fiebre y la tercera parte la presenta por un foco infeccioso. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son astenia y adinamia debidas a anemia. Del 33 al 43% tiene sangrado por trombocitopenia y 25% refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación (Sánchez et al. 2016).

Los síntomas menos comunes son cefalea, vómito, alteraciones de las funciones mentales, oliguria y anuria. Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis, los sitios extramedulares mayormente afectados son el (hígado, el bazo y los ganglios linfáticos) y el grado de organomegalia es más importante en niños que en adultos: en 17% se encuentra hepatomegalia; en 44%, esplenomegalia, y en 15%, linfadenopatía (Sánchez et al. 2016).

2.3.1.3 Tratamiento Médico

El manejo óptimo de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda requiere la minuciosa atención de puntos importantes en el cuidado de soporte, incluidos el tratamiento inmediato o la prevención de complicaciones metabólicas o infecciosas, así como administración de derivados de productos sanguíneos. Para el tratamiento estándar quimioterapéutico de la leucemia linfoblástica aguda consiste en tres fases:

- A. Inducción de la Remisión. En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de DNA, como

vincristina, prednisona y L-asparginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina o mitoxantrona para adultos, éstos no producen daño a la médula ósea normal y actúan pronto; sin embargo, no son útiles para el tratamiento a largo plazo. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90%. Los programas de inducción cada vez son más agresivos, lo que aumenta la frecuencia de las remisiones y mejora la supervivencia de los pacientes (Sánchez et al. 2016).

- B. Tratamiento de consolidación. En esta fase el objetivo es destruir las células residuales que han superado la etapa previa; se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de DNA y que pueden destruir las células en reposo o fuera del ciclo G0 del ciclo celular. Aquí se administran altas dosis de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, L-asparginasa y citarabina, o bien combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, doxorubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida (Sánchez et al. 2016).
- C. Tratamiento de mantenimiento. Tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas. Por razones aún no entendidas debe darse tratamiento a largo plazo; quizá por la necesidad de eliminar las células leucémicas o la enfermedad mínima residuales, o detener su crecimiento hasta que suceda su apoptosis celular. Con la administración de medicamentos que intervienen en la síntesis de DNA, como mercaptopurina y metotrexato. Estos fármacos son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años (Sánchez et al. 2016).

La recaída de la médula ósea, con o sin afección extramedular, se interpreta como mal pronóstico para los pacientes, otros factores que indican mal pronóstico son recaída al tratamiento, remisión inicial parcial, inmunofenotipo de células T, cromosoma Filadelfia, aparición de células blásticas circulantes y recaída con leucocitosis. El paciente con recaída puede optar por tratamiento de trasplante alogénico de célula madre hematopoyéticas, éste puede permitir cinco años de supervivencia libre de enfermedad hasta en 50% de los casos, con recaída del 40 a 60% de los mismos. Los enfermos con riesgo alto, sobre todo quienes presentan cromosoma Filadelfia positivo en la primera remisión, se consideran sujetos susceptibles inmediatos a trasplante alogénico (Sánchez et al. 2016).

2.4 Biología molecular en leucemia

Ikaros, un miembro de la familia de proteínas Kruppel-Box dedos de zinc (C_2H_2) que se une a DNA, juega un papel crítico en la ontogenia y diferenciación de células linfoides, el splicing alternativo del gen Ikaros da como resultado la generación de ocho isoformas que difieren en su unión al DNA, estas proteínas se caracterizan por la presencia de 2 dominios de dedo de Zinc de tipo Kruppel-Box, el N-terminal está involucrado con la unión a DNA mientras que el C-terminal es necesario para homo- o heterodimerización con los miembros de esta familia y se compone de 2 dedos de Zinc, en las proteínas Ikaros funcionales, cuatro dominios dedos de Zinc están en el extremo N-terminal y al menos tres de ellos son necesarios para la unión específica a DNA que contenga la secuencia A / GGGAA y son indispensables para

la diferenciación de linfocitos. (Yoshida & Georgopoulos 2014; Dijon et al. 2017). Ik1, Ik2, Ik3 e IKX se consideran isoformas funcionales, Ik4 sólo puede unirse a secuencias de DNA palindrómico, Ik5, Ik6, Ik7 e Ik8 se consideran dominantes negativos (DN) debido a su capacidad para unirse a otras isoformas y su ineficiencia para unir DNA.(Dijon et al. 2017).

Ikaros recluta al complejo Nucleosome Remodeling Deacetylase (NuRD) a los genes de linaje linfoides, aumentando así la accesibilidad a la cromatina y permitiendo la transcripción. Después de la especificación del linaje linfoides, la expresión de Ikaros se eleva a niveles característicos de células B intermedias y precursores de células T, que es necesario para soportar la maduración y prevenir la leucemogénesis. La pérdida de Ikaros en los precursores de células B bloquea la diferenciación y perpetúa la adhesión al estroma mejorando la señalización de la integrina. La combinación de la integrina y la señalización de citoquinas en las células pre-B que carecen de Ikaros promueven su supervivencia y auto-renovación (Yoshida & Georgopoulos 2014).

En 2014 Zhou y colaboradores demostraron que la isoforma IK6 dominante negativa se encuentra sobre expresada en pacientes pediátricos con LLA, esta isoforma es el represor transcripcional más común y más fuerte en la familia Ikaros pudiendo así inhibir la función de las isoformas que poseen actividad funcional, como Ik1, Ik2 e Ik3 considerados supresoras de tumores, también demostraron que la expresión de Ik6 se encuentra disminuida cuando los pacientes completaron la quimioterapia de inducción y alcanzaron la remisión completa. La expresión de Ik6 aumentó significativamente cuando los pacientes sufrieron una recaída. Una amplia evidencia

indica que la sobreexpresión de Ik6 se asocia con un mal pronóstico de los pacientes con LLA (Zhou et al. 2014).

2.5 Proteínas dedos de zinc

El control transcripcional en células eucariotas es un proceso complejo que implica un gran número de factores de transcripción (FTs) y cofactores que regulan el ensamblaje de la transcripción y la velocidad a la que es iniciada. Además, una variedad de enzimas modulan la estructura de la cromatina a través de cambios en la metilación del DNA, modificaciones de histonas y posicionamiento de nucleosomas. Una característica esencial en el funcionamiento de los FT es la presencia de motivos específicos de unión al DNA que, facilitan la unión de FTs a los promotores de genes diana. Las interacciones entre FTs y sus sitios de unión a DNA son parte de redes reguladoras de genes que controlan el desarrollo, los procesos celulares y respuesta al ambiente. Uno de los más abundantes motivos vinculante a DNA en eucariotas son dedos de zinc (ZF), los cuales fueron descritos por primera vez en *Xenopus Laevis*. Diferentes clases de dedos de zinc y sus dominios se han identificado y caracterizado, depende de la naturaleza estructural de sus residuos de zinc (Krishna et al. 2003).

Hay por lo menos quince clases diferentes de motivos dedos de zinc de los cuales algunos de los más importantes serán descritos a continuación:

Gag knuckle (C2HC): La estructura de este grupo se compone de dos hebras β conectadas por un giro (nudillo de zinc) seguido por una hélice corta o un bucle, éstos pueden contener 20 aminoácidos. La estructura de este motivo se ha informado que se encuentra en la nucleocápside retroviral (NC) de VIH y otros virus. El Gag knuckle se une a RNA y participa en el reconocimiento de secuencias específicas necesarias para el empaquetado viral (Krishna et al. 2003; García 2006).

C4 (lazo o cinta): Las proteínas que contienen este motivo son en su mayoría enzimas involucradas en la replicación y transcripción del DNA, como las primasas de los fagos T4 y T7 que, presentan motivos C4 reconociendo específicamente tres pares de nucleótidos (5' GTC 3') de una hebra de DNA, estos motivos están conformados estructuralmente por un grupo de pliegues. El núcleo de la estructura está compuesta de dos hebras β que forman dos estructuras similares denominados sitios vinculantes de zinc. (Krishna et al. 2003; García 2006)

C4 (familia GATA): La familia GATA incluye factores de transcripción que regulan la expresión de genes en diversos tejidos durante el desarrollo celular. El factor GATA-1 está involucrado en la regulación del desarrollo de los glóbulos rojos y presenta dos dedos de zinc tipo C4. Esta familia se caracteriza principalmente por no contener estructura secundaria adicional en N- o C-terminal. (Krishna et al. 2003; García 2006)

C6: La familia Zn₂ / Cys₆ consiste en una hélice y dos bucles, este grupo contiene dos sitios de unión de iones de zinc que están coordinados por seis residuos de cisteína, la proteína más estudiada que presenta este motivo es GAL4 en levaduras; esta proteína activa la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de galactosa y melibiosa (Krishna et al. 2003; García 2006).

Ring finger (C3HC4 - C3H2C3): Son un grupo de proteínas que contienen de 40-60 residuos conservados ricos en cisteína que pueden unirse a dos iones de zinc, en particular reúnen dos subtipos denominados C3HC4 (RING-HC) y C3H2C3 (RING-H2). En este grupo se encuentran proteínas de diversos orígenes como Rad5, involucrada en la reparación del DNA en levaduras; la proteína humana RAG1, esencial para el rearreglo en las inmunoglobulinas; el péptido del gen 63 del virus herpes equino tipo 1; la proteína Z de los arenavirus; la proteína humana de la leucemia promielocítica PML (Krishna et al. 2003; García 2006).

Dominio LIM: Son proteínas compuestas de dominios estructurales dos motivos dedos de zinc contiguos, unidos por una región de unión hidrofóbica compuesta de dos aminoácidos. La denominación LIM proviene de las iniciales de las primeras proteínas en las que se hallaron este tipo de dominios: Lin11, Isl-1 y Mec-3, éstas proteínas juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto, organogénesis y oncogénesis (Krishna et al. 2003; García 2006).

TAZ2: Las proteínas de este grupo se caracterizan por los ligandos de zinc que se encuentran en los extremos de las α hélices. Tres familias son Incluidos en este grupo, pueden contener los dominios TAZ1 y TAZ2, CBP y P300 son histonas acetiltransferasas, éstas cuentan con dos dominios TAZ una en el N- terminal y otro en C-terminal, para regular la transcripción a través de remodelación de la cromatina (Krishna et al. 2003; García 2006).

Metalotioneínas: Son bucles ricos en cisteína de aproximadamente 60- 70 residuos que se unen a una variedad de metales. No cuentan con elementos estructurales secundarios. Las metalotioneínas tienen estructura similar a las cadenas de proteínas que envuelven a un metal con múltiples cisteínas. Aunque la función biológica de las metalotioneínas no está clara, son empleadas para secuestrar el exceso de iones metálicos de la célula, protegiéndola contra la toxicidad de los metales. (Krishna et al. 2003; García 2006)

C₂H₂: El clásico motivo dedos de zinc comprenden probablemente la mayor familia de proteínas regulatorias en los mamíferos, comprende de 28 a 30 residuos de aminoácidos, contienen de 1 a más de 30 dedos de zinc, su estructura es estabilizada por un ion de zinc coordinado por cuatro residuos altamente conservados, dos cisteínas y dos histidinas, la estructura plegada de forma estable consiste de dos a tres hebras β y una α hélice esta última media interacciones no

covalentes entre tres residuos de aminoácido y tres bases dentro del surco mayor de DNA (Lupo et al. 2013).

2.6 Mecanismos moleculares de KRAB-ZNF

La represión transcripcional mediada por KRAB-ZFP requiere interacción con los factores de remodelado de la cromatina. En efecto, KRAB-ZFP se unen a la secuencia de DNA correspondiente a través de su dominio dedos de zinc, mientras que el dominio KRAB interactúa con proteínas co-represora como KAP-1 (proteína asociada a KRAB1). El N-terminal de KAP-1 contiene un RBCC (Ring finger/Box/Coiled-Coil) dominio que se une a KRAB. La región central de KAP-1 incluye un pentapéptido hidrófobo que interactúa con el dominio cromosómico de la proteína heterocromatina 1 (HP1). El extremo C-terminal tandem Plant homeodomain (PHD) y el bromodominio de KAP-1 actúan como dominios de andamio que reclutan histonas desacetilasas (como NuRD), histona lisina-metil transferasa (como SETDB1) que activan el remodelado de la cromatina (Lupo et al. 2013).

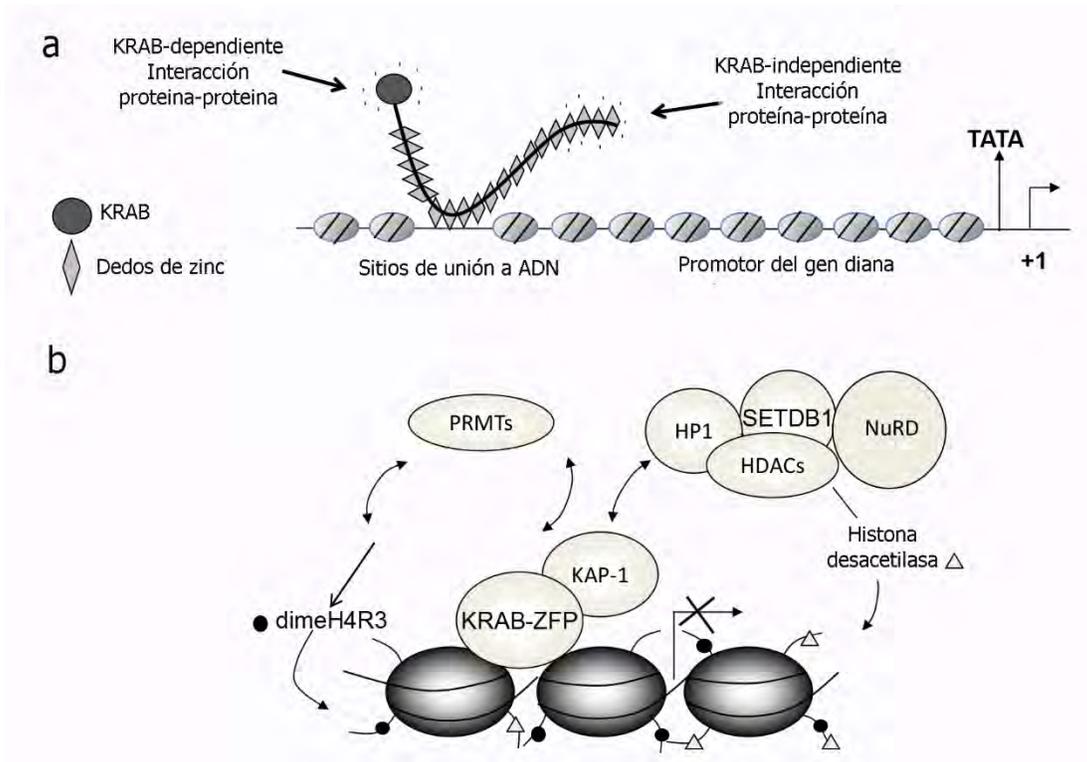


Figura 6 | a | Unión mediada por dedo de zinc (KRAB-ZNF) típico al promotor del gen diana. b | Reclutamiento a la cromatina mediante co-represores y actividades dependientes de ATP que modifican la cromatina mediada por el complejo KRAB / KAP-1 (PRMTs, HDACs, SETDB1, NuRD)(Lupo et al. 2013) .

2.7 Dedos de Zinc 695 (ZNF 695)

La proteína ZNF 695 pertenece a la familia de dedos de Zinc (C_2H_2), el gen se encuentra en el cromosoma 1, en el brazo largo posición 44 (1:q44), tiene una extensión de 62,547 pb está constituida por 6 exones, mediante SA se han reportado 3 variantes por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), la variante uno tiene 4 exones (3,392 pb) siendo el exón 4 el más grande con 2,948 pb esté codifica los dedos de zinc, la variante dos tiene 6 exones (954 pb) y la

variante tres tiene 6 exones (958 pb) de estas tres las primeras dos codifican para proteínas y la última es un RNA no codificante (Gene Cards, 2017).

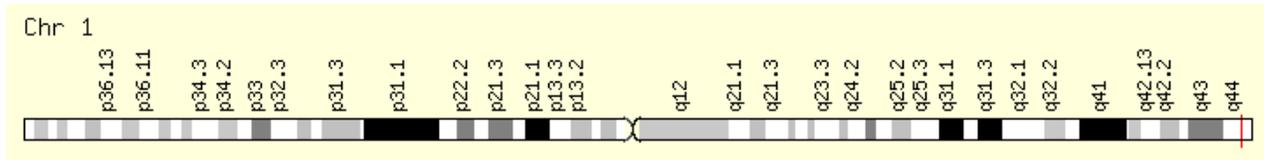


Figura 7 | posición cromosómica del gen ZNF695 (Gene Cards, 2017)

Adicionalmente, se ha reportado que cuenta con un dominio Krüppel associated box (KRAB), este dominio tiene una función de represor transcripcional y constituyen la familia más grande de represores en el genoma de los mamíferos, con más de 350 miembros identificados en seres humanos. El dominio KRAB se divide normalmente en KRAB-A y KRAB-B, abarcan aproximadamente 75 aminoácidos, la función de este dominio es de suma importancia ya que media la interacción proteína-proteína y permite la interacción con co-represores para reprimir la transcripción. (Oliver et al. 2013)

La variante uno como ya se ha mencionado tiene cuatro exones, la proteína codificada contiene 515 aminoácidos y cuenta con un dominio KRAB que se encuentra el extremo amino y trece dedos de Zinc tipo C_2H_2 que se encuentran en el carboxilo terminal, la variante dos cuenta con seis exones teniendo el extremo carboxilo terminal más corto, debido a un *splicing* en el exón cuatro que lleva a la pérdida de los dedos de Zinc, la proteína cuenta con 172 aminoácidos y contiene un dominio KRAB (Gene Cards, 2017).

Estudios recientes realizados por (Juárez-Méndez et al. 2013) han reportado una posible pérdida de secuencia en el gen ZNF695, la cual se puede apreciar en el mapa de calor, debido a un decremento de la expresión de uno de los exones, para demostrarlo, los ampliaciones encontrados en este estudio fueron purificados a partir de gel de agarosa, clonados y por medio de secuenciación se confirmó que hay una pérdida de secuencia generando un transcrito de 360 pb (denominado ZNF695 variante 4) y un transcrito adicional (denominado ZNF695 variante 5) estos dos transcritos contienen una secuencia parcialmente idéntica a la variante uno y dos reportadas en el NCBI.

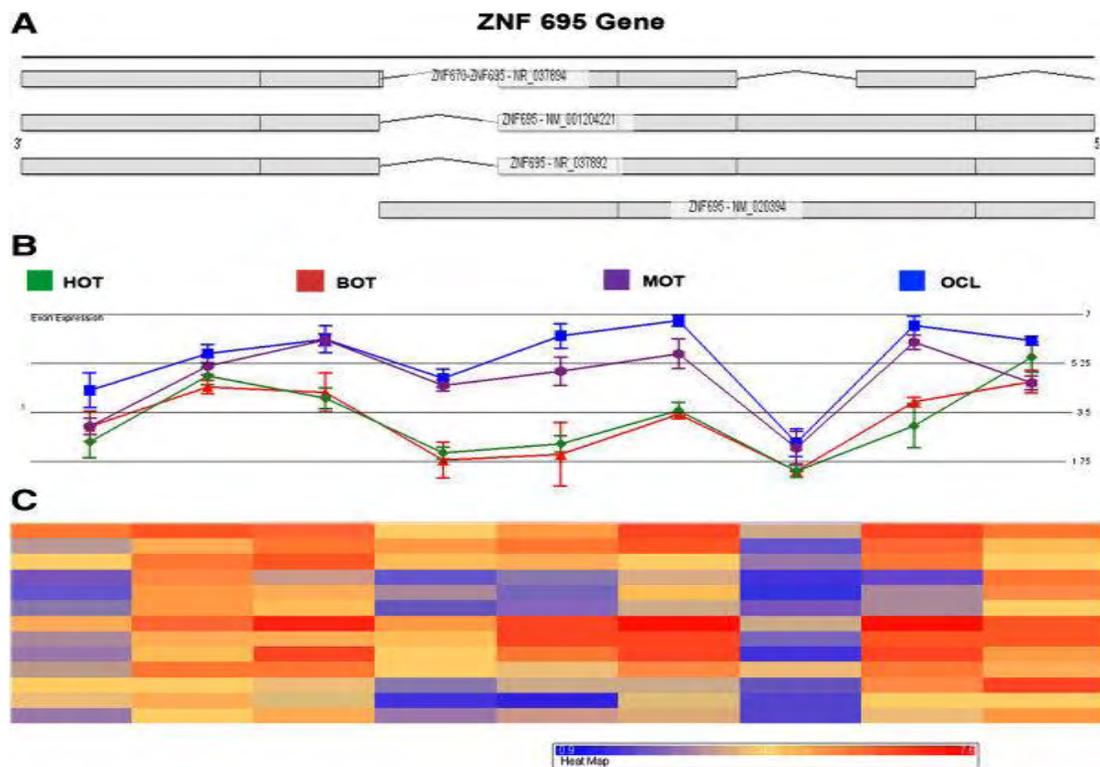


Figura 8 | a | variantes de splicing de la proteína dedos de zinc ZNF695 b | grafico de los niveles de expresión exonico en tejidos de ovario sano (HOT, verde), tumores de ovario benigno (BOT, rojo), tumores ovario malignos (MOT, morado), líneas celulares de ovario (OCL, azul) c | mapa de calor que muestra la expresión de los exones. (Juárez-Méndez et al. 2013)

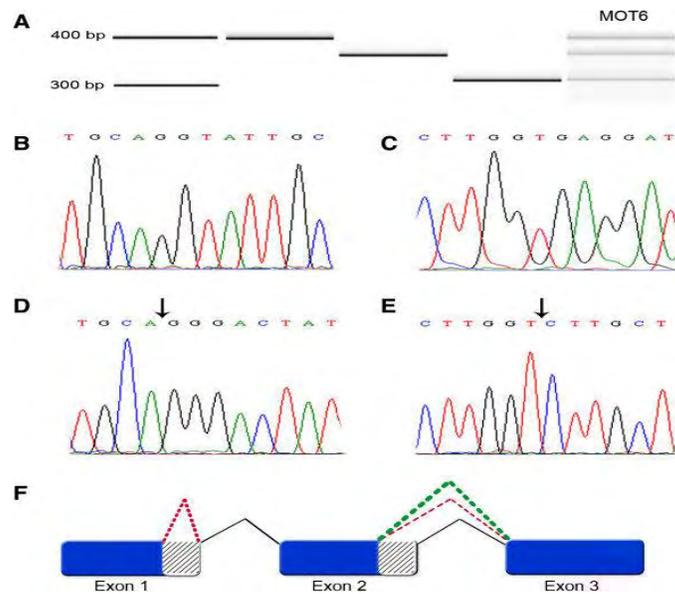


Figura 9 | Clonación y secuenciación de nuevos transcritos de ZNF695 asociados al cáncer de ovario. a |Producto de PCR de ZNF695 que muestra los tres tamaños diferentes de transcritos de RNA de ZNF695 expresados en la muestra de tejido ovárico maligno 6 (MOT6, derecha) y los amplicones individuales empleados para la clonación, con el tamaño mostrado a la izquierda. (Carril 1) MPM, (carril 2, 400 pb) variantes de splicing ZNF695 1 ò 2, (carril 3, 360 pb), variante 4 de splicing ZNF695, (carril 4, 310 pb) variante 5 de splicing ZNF695, (carril 5) amplicones ZNF695 en MOT6. B) Electroferograma de la variante 1 ò 2 de ZNF695 en el límite de los exones 1 y 2. C) Electroferograma de la variante 1 ò 2 de ZNF695 en el límite de los exones 2 y 3. D) Electroferograma variante 5 de ZNF695, esta transcripción tiene splicing alternativo en el exón 1-2. E) Electroferograma variante 4 de ZNF695, esta secuencia tiene un splicing alternativo en el exón 2-3, este SA está contenido también en la variante 5 de ZNF695. F) modelo SA del gen ZNF695. Las líneas negras representan el empalme primario de los exones 1-2-3 del gen ZNF695 que contiene la secuencia codificante completa que corresponde al amplicón más grande. La línea punteada verde muestra SA de los exones 2-3, que corresponde al amplicón intermedio. La línea punteada roja muestra SA en el exón 1 junto con SA de los exones 2-3, que están contenidos en el amplicón más pequeño. Flecha negra indica SA (Juárez-Méndez et al. 2013)

3. Planteamiento del problema

Investigación reciente sobre splicing alternativo (SA) han permitido evidenciar la diversidad de variantes generadas por este mecanismo, en algunos casos ha sido bien estudios que el splicing alternativo (SA) puede causar modificaciones en genes que favorecen la progresión tumoral, sin embargo no todas la variantes generadas por este mecanismo han sido caracterizadas completamente como es el caso de

las variantes del gen ZNF695, por lo cual sería de gran valor conocer la secuencia completa.

4. Justificación

El splicing alternativo es importante para generar la variedad de transcritos y en consecuencia, esto puede llevarnos a tener varias proteínas diferentes. El gen ZNF695 previamente se ha descrito que tiene 5 isoformas de transcritos, de las cuales dos no se han caracterizado completamente. Por lo que sería de gran importancia conocer la secuencia completa de las dos variantes identificadas previamente, ya que generaría información importante sobre la variedad de transcritos expresados y sus posibles proteínas resultantes.

5. Hipótesis

Se sabe que más del 90% mRNA presentan splicing alternativo (SA) generando RNA maduros diferentes que influyen en la diversidad de proteínas, incrementando la complejidad del transcriptoma y el proteoma, por lo que se espera que el gen ZNF695 este sujeto a splicing alternativo (SA) generando diversos transcritos maduros

6. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la secuencia completa de las variantes del gen ZNF695.

Objetivos particulares

Determinar la expresión de las variantes del gen ZNF695 en líneas celulares.

Caracterización de la secuencia de las variantes del gen ZNF695 en líneas celulares.

Evaluación de la expresión las variantes del gen ZNF695 en pacientes con LLA.

7. Materiales y Método

En la presente investigación se seleccionaron pacientes diagnosticados con LLA-B en el INP, de los cuales se obtuvo muestra de medula ósea con los siguientes criterios de inclusión:

- A. pacientes pediátricos con el diagnóstico de LLA-B.
- B. Sin tratamiento previo.
- C. De cualquier sexo.
- D. Edad de 1 a 15 años.

Se obtuvieron 9 muestras de sangre periférica de individuos sanos (grupo control), teniendo como criterio no presentar ningún tipo de neoplasia y ser de cualquier sexo

Se seleccionaron diferentes líneas celulares derivadas de distintos tipos de cáncer las cuales se conservaron en las condiciones mencionadas a continuación, hasta su procesamiento, cabe mencionar que las primeras dos líneas celulares son células adherentes, mientras que las dos últimas son células no adherentes.

1.- MCF-7: línea celular derivada de células epiteliales de adenocarcinoma de mama, se incubaron con medio MEM Eagle's suplementado con un 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 37°C con 5% de CO₂ y 95% O₂ hasta tener una confluencia del 90%.

2.- HELA: línea celular derivada de cáncer cervical, se incubaron con medio MEM-Eagle, suplementado con un 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 37°C con 5% CO₂ y 95% O₂ hasta tener una confluencia del 90%.

3.- RS4: línea de células derivada de leucemia aguda linfoblástica, se incubaron con medio RPMI-1640 suplementado con un 10% FBS 1% penicilina/estreptomicina, 37°C con 5% CO₂ y 95% O₂.

4.- SUP-B15: línea celular derivada de leucemia aguda linfoblástica B, se incubaron con medio Iscove's Dulbecco's modificado con 4 mM L-glutamina ajustado con 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y suplementado con 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 20% FBS 37°C con 5% CO₂ y 95% O₂.

Las líneas celulares (MCF-7, HELA, RS4 y SUP-B15) así como las muestras de pacientes con LLA y las muestras de sangre periférica (grupo control), empleadas en este estudio fueron donadas por el Laboratorio de Oncología Experimental del INP.

7.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se obtuvo el botón celular de líneas celulares de cáncer, las muestras se lavaron dos veces con 1ml de PBS, posteriormente se le colocó 1 ml de TRIzol frío, se puso en tissulyser para homogeneizar y se incubaron 5 min a temperatura ambiente, enseguida a cada tubo se le colocó 200 µl de cloroformo, se agitó el tubo en el vórtex por 1 min, posteriormente se incubó 10 min a temperatura ambiente; las muestras se centrifugaron a 10 000x g por 20 min a 4°C. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo, inmediatamente se adicionó 500 µl de isopropanol y se mezclaron, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10 000x g por 20 min a 4°C, se desechó el sobrenadante. El botón de RNA se resuspendió en 1 ml de etanol frío 75%, se agitó en el vortex y centrifugaron 10 000x g por 5 min a 4°C, el etanol se retiró y se dejó secar el botón 10 min, finalmente se resuspendió en 100 µl de agua libre de RNasas.

7.2 Transcripción Reversa

Para la obtención del cDNA se emplearon para cada una de las muestras 5000 ng de RNA total en tubos eppendorf de 200 µl, 1 µl de buffer para DNasa (1X), 1 µl de DNasa y la cantidad necesaria para cada muestra de agua libre de nucleasas para tener un volumen final de reacción de 10 µl. Las muestras se incubaron en un termociclador (ProFlex™ PCR System, Thermo Scientific, USA) a 37°C por 30 min. Posteriormente a cada tubo se le agregó 1 µl de EDTA (5mM) y se continuó con la incubación a 65°C por 10 min. A continuación, a cada tubo se le adicionaron 9 µl de

master mix con los siguientes reactivos: 4 µl de buffer para RT (5X), 2 µl de Random Primers (0.2 µg/ µl), 2 µl de dNTP (10mM), 0.5 µl de RNasa Out (20 U), 0.5 µl enzima Transcriptor Reverse Transcriptase (10 U), se terminó la incubación con las siguientes condiciones: 25°C 10 min, 55°C 30 min, 85°C 5 min. Volumen final de 20 µl.

7.3 RPL4 en PCR punto final

Como control de expresión se empleó el gen RPL4 y se evaluó la expresión en los cDNA. Para realizar PCR se empleó Kit KAPA2G fast PCR (KAPA BIOSYSTEMS). En cada muestra se emplearon tubos eppendorf de 200 µl, adicionando 7 µl de KAPAG2 Mix, DNA Polimerasa Fast HotStart (0.14 U), dNTP mix (0.2mM), MgCl₂ (1.5mM), 0.5 µl de oligonucleótido forward (10 µM), 0.5 µl de oligonucleótido reverse (10 µM), 5.5 µl de agua libre de nucleasas, por muestra. La reacción se incubo a 95°C 3 minutos, 35 ciclos 95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 10 s y una extensión final de 72°C 7 min. Volumen final de reaccion15 µl. Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1.5% (g/v) con sybergold (1:10 000) a 80 volts 45 minutos en solución de TBE al 0.5%.

7.4 Amplificación de ZNF695 en PCR punto final

Para evaluar la expresión de las variantes de ZNF695 se empleó el Kit KAPA2G fast PCR (KAPA BIOSYSTEMS). Para cada muestra se emplearon tubos eppendorf de 200 µl se adicionaron 7 µl de KAPAG2 Mix, 0.5 µl de oligonucleótido forward (10 µM), 0.5 µl de oligonucleótido reverse (10 µM), 5.5 µl de agua libre de nucleasas, por muestra. 13Volumen final de reacción 15 µl.

Dependiendo de la secuencia que se amplificó, la reacción se incubó con distinto programa:

ZNF695-V1: Desnaturalización inicial 95°C 3 minutos, 35 ciclos 95°C 15 segundos, 57.2°C 15 segundo, 72°C 10 segundos y una extensión final de 72°C 7 minutos.

ZNF695-V2: Desnaturalización inicial 95°C 3 minutos, 35 ciclos 95°C 15 segundos, 55.2°C 15 segundo, 72°C 10 segundos y una extensión final de 72°C 7 minutos.

ZNF695-V4, ZNF695-V6: Desnaturalización inicial 95°C 1 minutos, 35 ciclos 95°C 15 segundos, 54.5°C 15 segundo, 72°C 15 segundos y una extensión final de 72°C 7 minutos.

ZNF695-V5, ZNF695-V7: Desnaturalización inicial 95°C 3 minutos, 40 ciclos 95°C 15 segundos, 56.5°C 15 segundo, 72°C 15 segundos y una extensión final de 72°C 7 minutos. Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1% (g/v) para la variante 1 y 2 y al 1.2% (g/v) para variante 4, 5, 6 y 7 con sybergold (1:10 000) a 85 volts 45 minutos en solución de TBE al 0.5%.

Gen	Secuencia de primers	TM	Tamaño amplicon
RPL4	Forward:5' GTGGGACGTTTCTGCATTTG 3' Reverse:5' TGTGCATGGGAAGATTGTAGT 3'	60°C	112pb
ZNF695-V1	Forward:5' CTGGAGAGGCTCTTTGTA CTTG 3' Reverse:5' GATAGTTAACGTTGGTGGTAGG 3'	57.2°C	279pb
ZNF695-V2	Forward:5' CCTTTGCCTTCTGCCATGAT 3` Reverse:5' TTAATTCAGAACTCGGGCTGAC 3`	55.2°C	212pb
ZNF695-V4	Forward:5' CTCCTTGGTCTTGCTATGT 3` Reverse:5' TGCAAGAGACATTGCCACATTC 3`	54.5°C	427pb
ZNF695-V5	Forward:5' GTGGCCTGCAGGGACTATTG 3` Reverse:5' TGCAAGAGACATTGCCACATTC 3`	56.5°C	559pb
ZNF695-V6	Forward:5' CTCCTTGGTCTTGCTATGT 3` Reverse: 5`TTAATTCAGAACTCGGGCTGAC 3`	54.5°C	470pb
ZNF695-V7	Forward:5' GTGGCCTGCAGGGACTATTG 3` Reverse: 5`TTAATTCAGAACTCGGGCTGAC 3`	56.5°C	602pb

7.5 RACE 3´

Para la reacción se empleó el Kit 3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Thermo Scientific, USA) utilizando para cada una de las muestras 5000 ng de RNA total, se colocaron en tubos eppendorf de 200µl, añadiendo la cantidad necesaria de agua libre de nucleasas para tener un volumen de 11 µl, se adiciona 1 µl de AP (10 µM) se mezcla la muestra y se incuba en un termociclador (ProFlex™ PCR System, Thermo Scientific, USA) 70°C por 10 min. Terminado este tiempo se dejaron las muestras enfriar en hielo 1 min. Posteriormente a cada tubo se le agregó 2 µl buffer PCR (10X), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP mix (10mM), 2 µl de DTT (1M) se incubó 42°C por 5 min, se adicionó 1 µl de SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200U) se incubó 42°C por 50 min, 70°C por 15 min se enfriaron las muestras 1 min en hielo. Se finalizó la reacción agregando 1 µl de RNasa H (2 U), se incubaron 37°C por 20 min.

7.6 Purificación de bandas de producto de PCR

Para la extracción y purificación de las bandas de interés se empleó Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH, USA) se añadió 3 volúmenes de buffer ADB por cada volumen de gel. Se incubó a 55°C durante 10 min. La solución de agarosa obtenida se transfirió a la columna Zymo-Spin™ y se colocó en la parte inferior de la columna tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 10 000x g durante 30s. El sobrenadante se desechó del tubo colector en el momento que sea necesario. Se adicionaron 200 µl de Buffer de lavado a la columna y se centrifugó a 10 000x g 30s (se realizan dos lavados). Se transfirió a la columna Zymo-Spin a un tubo

ependorff de 1.5 ml se adicionó 15 µl de agua directamente a la matriz de la columna y centrifugó 10 000x g 30s para eluir el DNA.

7.7 Secuenciación de productos de PCR

Para la secuenciación del producto de PCR, se realizó mediante BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), con las siguientes condiciones: 3.5 µl de buffer de secuenciación BigDye (5X), 0.5 µl oligonucleótido forward y reverse (5 µM), 20 ng de DNA, 0.5 µl de enzima BigDye Terminator y la cantidad de agua libre de nucleasas para tener un volumen de reacción final de 10 µl. Las reacciones se dejaron correr en el termociclador con el siguiente programa: 25 ciclos a 95°C 30s, 50°C 15 s y 60°C 4 min). Los productos de BigDye fueron purificados con el kit CENTRI-SEP Spin Columns (Princeton Separations, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron introducidas en el secuenciador Applied Biosystems Abi Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el software unipor UGENE v1.23.1 versión 64 bits para Microsoft Windows 10, también se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) con Clustal Omega del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) para identidad entre las secuencias obtenidas y las cuatro variantes de mRNA de ZNF695 (NM_020394.4 para ZNF695 variante1 y NM_001204221.1 para ZNF695 variante 2) reportadas en la base de datos del NCBI. Con ello, se identificaron nuevas variantes de ZNF695.

8. Resultados

Se evaluaron cuatro líneas celulares derivadas de diversos tipos de cáncer, MCF-7 (mama), Hela (CaCu), RS4 (LLA) y SupB15 (LLA), posteriormente se realizó una transcripción reversa y una PCR en punto final, empleando el gen RPL4 como control de expresión, el cual tiene un fragmento de amplificación de 112 pb (Fig. 10).

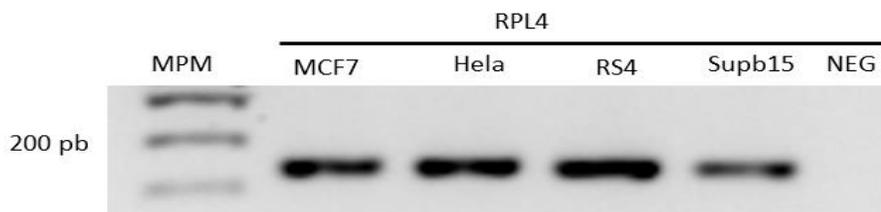


Figura 10 | Expresión de RPL4. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1.2%.MPM, marcador de peso molecular

8.1 Identificación de isoformas para ZNF695

Se emplearon oligonucleótidos para la identificación de ZNF695, referido en el artículo (Juárez-Méndez et al. 2013), para determinar la expresión de este gen en las cuatro líneas celulares mencionadas, cabe mencionar, que todas las líneas tuvieron expresión del gen. En el gel de agarosa se muestran los amplicones esperados de 400 pb que corresponde a la secuencia consenso de las variantes (ZNF695V1 y ZNF695V2), MCF-7 presentan dos bandas adicionales de menor peso que corresponden a variantes no descritas en la literatura, mientras que Hela y SupB15 solo tiene una de estas bandas adicionales (Fig 11).

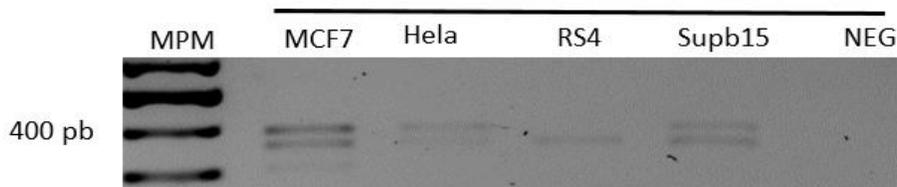


Figura 11 | Expresión de ZNF695 Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1.2%.MPM, marcador de peso molecular

Se emplearon oligonucleótidos específicos para evaluar mediante PCR la expresión de ZNF695V1 y ZNF695V2 para conocer cuál de estas dos se encontraba expresada en estas líneas celulares. Todas las líneas celulares tuvieron expresión tanto de la variante uno como de la variante dos de este gen. En los gels de agarosa se muestran los amplicones de tamaño esperado de 279 pb que corresponde a la variante uno de ZNF695 y de 212 pb que corresponde a la variante dos de ZNF695 (Fig. 12).

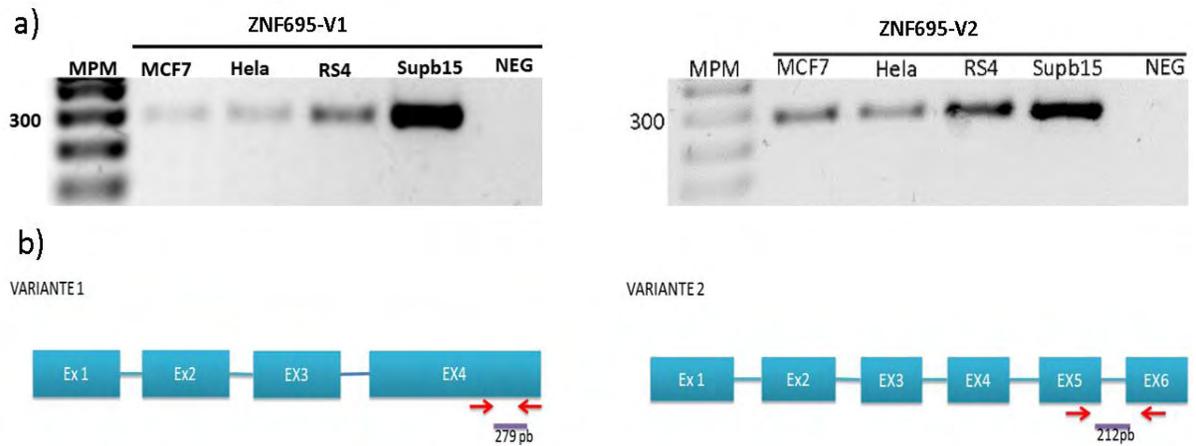


Figura 12 | Expresión de ZNF695 a) gels de agarosa al 1.2%, en que se observa la expresión de ZNF695 empleando oligonucleótidos específicos para diferenciar la variante 1 y 2. Todas las muestras mostraron expresión de las dos variantes. b) Diseño de oligonucleótidos específicos, flechas rojas representan oligonucleótidos específicos para cada variante ZNF695-V1 y ZNF695-V2. MPM, marcador de peso molecular.

Posteriormente se utilizaron oligonucleótidos para SA que se observan en la figura 9 y en la región de interés con un decremento de la expresión exónica indicado en el microarreglo, según (Juárez-Méndez et al. 2013), con estos oligonucleótidos se evaluaron SA en lo exones 1-2 (SA1) y 2-3 (SA2) para determinar la existencia de nuevo transcritos que fueran similares en secuencia con las variante 1 ò 2 y tuvieran estos SA. Todas las líneas celulares mostraron expresión. La variante cuatro

denominada así por nuestro grupo de trabajo contiene un sitio de SA 5' en el exón 2 con un amplicon esperado de 427 pb, la variante cinco contiene dos sitios de SA 5' en el exón 1 y exón 2 con un amplicon esperado de 559 pb las cuales comparte secuencia con la variante uno, esta dos poseen el domino dedos de zinc completo (Fig 13).

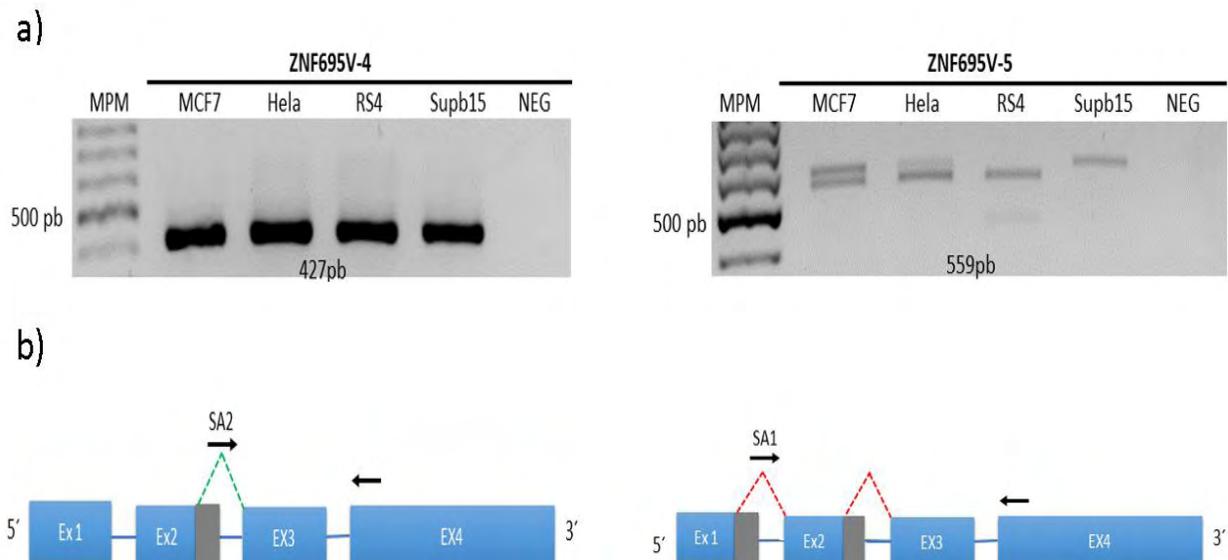


Figura 13 | Expresión de ZNF695 a) gels de agarosa al 1.2%, en el que se observa la expresión de ZNF695 empleando oligonucleótidos específicos para diferenciar los sitio de SA. Todas las muestras mostraron expresión de las dos variantes. b) Diseño de oligonucleótidos específicos, flechas negras representan oligonucleótidos específicos para cada SA y cada variante, los rectángulos en gris representan pérdida de secuencia, línea punteada ver SA 5' exón 2-3, línea punteada roja SA 5' exón 1-2 y 2-3 MPM, marcador de peso molecular.

A continuación se evaluó mediante los oligonucleótidos específicos para los sitios de SA1 SA2 la variante dos de ZNF695, solo dos de las líneas celulares presentaron expresión de estas variantes (MCF-7 y HeLa) y fueron denominadas como: variante seis, contiene un sitio de SA 5' en el exón 2 con un amplicon esperado de 471 pb y, variante siete contiene dos sitios de SA 5' en el exón 1 y exón 2 con un amplicon esperado de 602 pb (Fig 14)

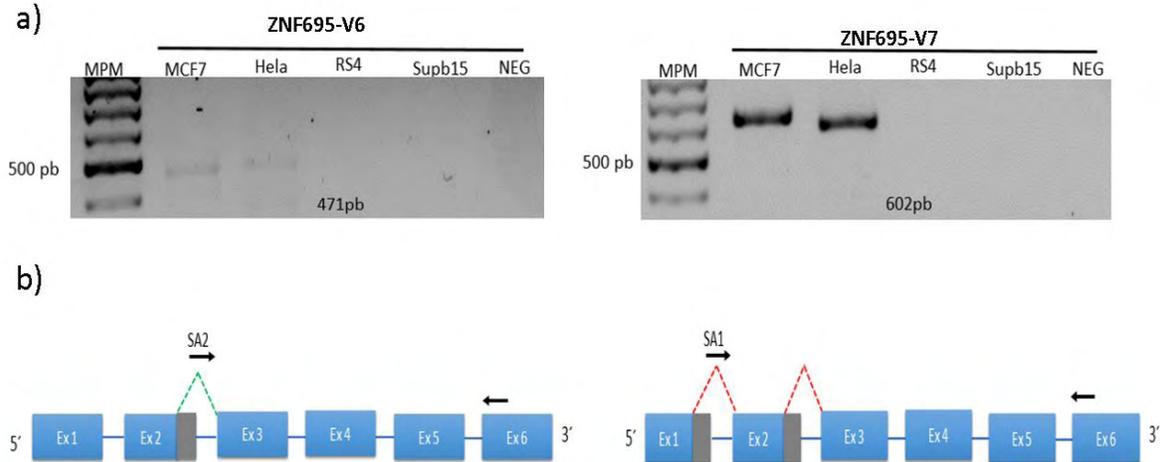


Figura 14 | Expresión de ZNF695 a) geles de agarosa al 1.2%, en el que se observa la expresión de ZNF695 empleando oligonucleótidos específicos para diferenciar los sitio de SA. Solo dos de las muestras mostraron expresión de las dos variantes. b) Diseño de oligonucleótidos específicos, flechas negras representan oligonucleótidos específicos para cada SA y cada variante, los rectángulos en gris representan pérdida de secuencia, línea punteada verde SA 5' exón 2-3, línea punteada roja SA 5' exón 1-2 y 2-3 MPM, marcador peso molecular.

Sabiendo que la línea celular MCF-7 tiene expresión de las cuatro nuevas variantes del gen ZNF695 se seleccionó para obtener la secuencia de las nuevas variantes, se realizaron PCR con los oligonucleótidos específicos para cada una de las variantes y se purificaron las bandas obtenidas de estas reacciones, para obtener las secuencias nucleotídicas de cada una de ellas. Una vez obtenidas las secuencias se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) con Clustal Omega comparando las secuencias reportadas en el NCBI vs las secuencias de las nuevas variantes figura 15b, en la cual se observa que dos de las variantes nuevas (cuatro y cinco) tienen similitud en secuencia con la variante uno, adicionalmente tienen una pérdida de secuencia en los primeros exones SA 5' exón 2-3, SA 5' exón 1-2 y 2-3 respectivamente, que codifican para la caja KRAB y pensamos que conserva intacta la secuencia que codifica para los dedos de zinc, esto aún no está claro debido a que la secuencia obtenida está solo hasta el inicio del exón 4 . En el

caso de la variante seis y siete se evidenció que tienen una similitud en secuencia con la variante tres ya que estas dos variantes contienen los nucleótidos GTGG que solo tiene la variante tres, y adicionalmente contienen una pérdida de secuencia en los primeros exones SA 5' exón 2-3, SA 5' exón 1-2 y 2-3 respectivamente, con esto podemos concluir que adicionalmente a las 3 variantes ya reportadas en NCBI se encontraron cuatro nuevas variantes del gen ZNF695 dos de ellas variantes cuatro y cinco podrían contener la secuencia para codificar una proteína que contenga dominós dedos de zinc y las otras dos variantes seis y siete corresponde a un no codificante.

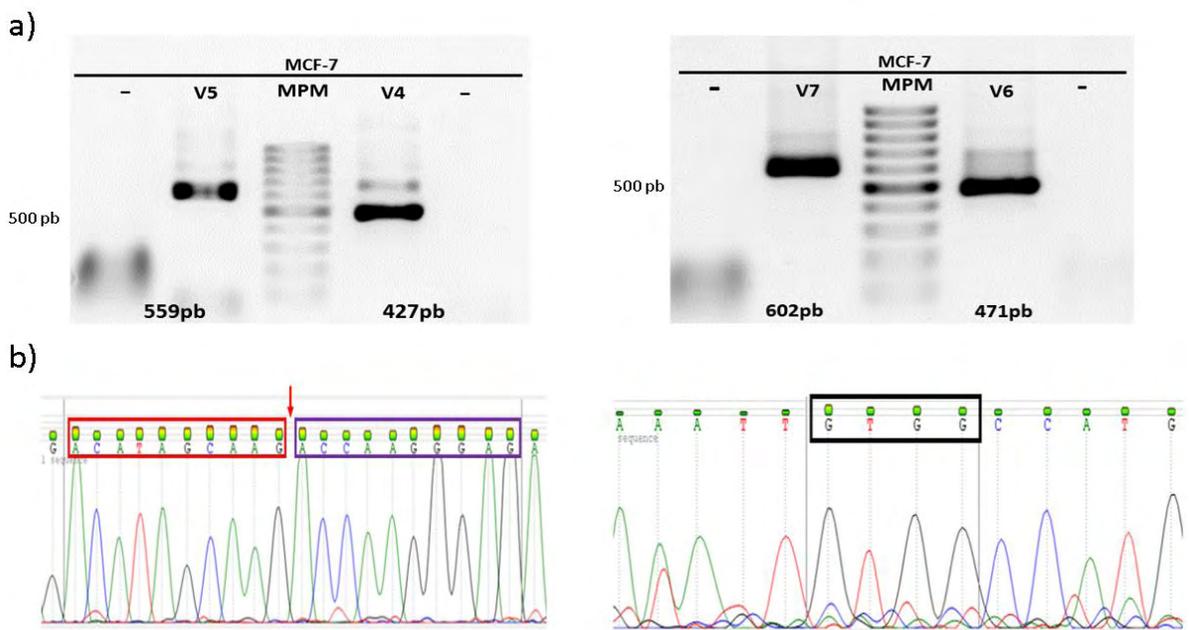


Figura 15 | PCR variantes del gen ZNF695 a) geles de agarosa al 1.2%, en el que se observa la expresión de las 4 nuevas variantes del gen ZNF695 en la línea celular MCF-7, muestra expresión de las cuatro variantes. b) Electroferograma de los SA de ZNF695.

8.2 RACE 3´

Para obtener la secuencia completa de estas nuevas variantes se empleó la técnica 3´RACE en las cuatro líneas celulares, se evaluó la integridad del RNA mediante la expresión del gen RPL4. Posteriormente, se realizó una PCR multiplex para ZNF695 empleando los oligonucleótidos FW1 que, flanquea el exón uno. También se emplearon los oligonucleótidos SA1, SA2 y el oligonucleótido universal UAP, de tal manera que los productos esperados para esta reacción fueron los siguientes: FW1-UAP (3,357 pb), SA1-UAP (3,215 pb) variante cinco, SA2-UAP (3,050 pb) variante cuatro. En la figura 16a se observan los esquemas de las variantes uno y tres del ZNF695 y los sitios donde hibridan los oligonucleótidos.

Nosotros pudimos observar en el gel de agarosa la expresión del gen constitutivo (RPL4) Figura 16b. Con esto se pudo demostrar la integridad del cDNA para su uso en las reacciones siguientes. Posteriormente, se emplearon la combinatoria de oligonucleotidos para amplificar ZNF695 como se muestra en la figura 16a. Con este diseño, nosotros observamos la presencia de distintas bandas: la de mayor peso se encuentra en ~ 1500 pb, seguida de 1400, 900, 800 y 600 pb Figura 16c. Estos resultados fueron sorprendentes, ya que nosotros esperábamos fragmentos más grandes (~ 3,000 pb) para la variante cuatro y cinco. Como se esperaba, las bandas que se encuentran en un rango de 900 y 600 pb corresponden a la variante seis y siete (Fig16c). Cabe destacar que, todas las líneas celulares expresaron las diferentes bandas como se puede observar en la Fig 16c. Con estos resultados podemos observar que, la banda con mayor peso se encuentra en ~ 1500 y no en

~ 3,000 pb como esperábamos, lo cual, nos podría indicar que la variante cuatro y cinco de ZNF695 presentan un sitio alternativo en el 3´.

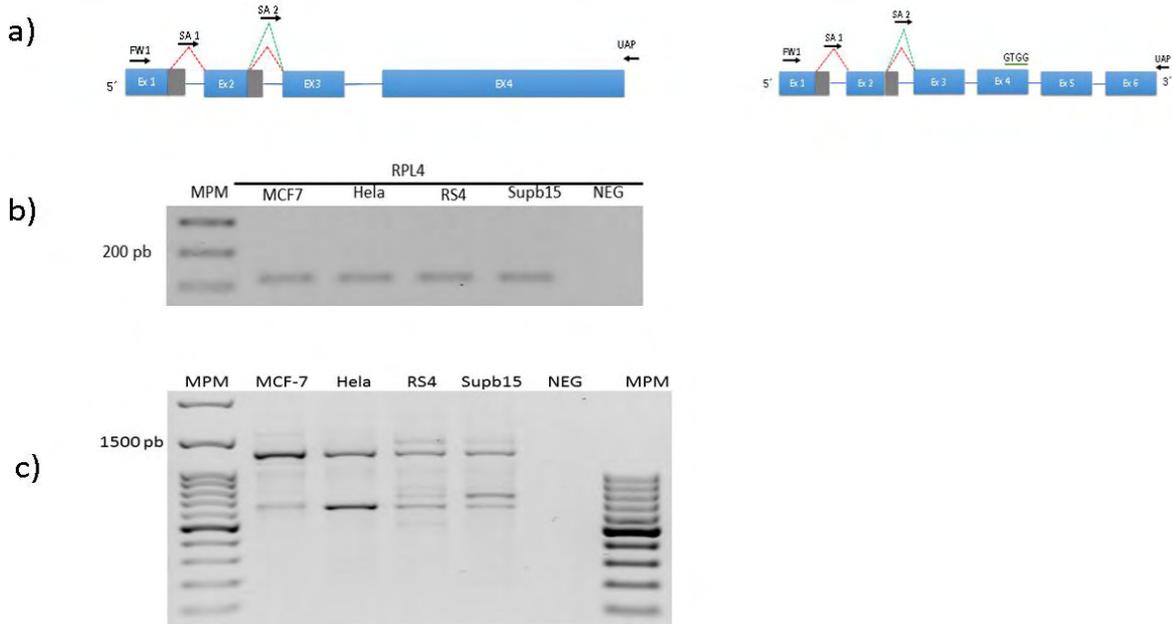


Figura 16 | RACE) a) Diseño de oligonucleótidos específicos en la variante uno y tres, flechas negras representan oligonucleótidos específicos para ZNF695, oligonucleótido universal (UAP), los rectángulos en gris representan pérdida de secuencia b) gels de agarosa al 1.2%, en el que se observa la expresión de RPL4 con un peso esperado de 112 pb. c) Gel de agarosa 1.2% se muestra la expresión de productos de PCR empleado oligonucleótido específicos para SA1 y SA2 gen ZNF695 y oligonucleótido universal UAP, línea punteada verde SA 5´ exón 2-3, línea punteada roja SA 5´ exón 1-2 y 2-3 MPM, marcador peso molecular.

Debido que las bandas obtenidas en la Fig16c fueron inferiores al peso esperado, se recurrió a realizar PCR individuales como se muestra a continuación: FW1-UPA, SA1-UPA (variante cinco), SA2-UAP (variante cuatro) empleando todas las líneas celulares, de igual manera los pesos esperado eran de 3,357 pb, 3,215 pb, 3,050 pb respectivamente. La reacción FW1-UAP no obtuvo expresión en ninguna banda (Fig 17a), en la reacción SA1-UAP solo RS4 y Supb15 mostraron expresión de una banda ~ 1,500 pb, (Fig 17b), en la reacción SA2-UAP todas las líneas celulares mostraron expresión de una banda que se encuentra aproximadamente en 1,400

pb. En la parte inferior de cada uno de los gels se esquematiza la reacción de PCR y los oligonucleótidos empleados, el resultado de estos gels sugiere que la variante cinco y la variante cuatro podrían presentar un sitio alternativo 3'. Debido a la poca expresión de estas bandas ha resultado difícil obtener las secuencias de estos productos de PCR, por lo que, nuestro grupo de trabajo se encuentra trabajando para poder aislarlas y obtener la secuencia completa.

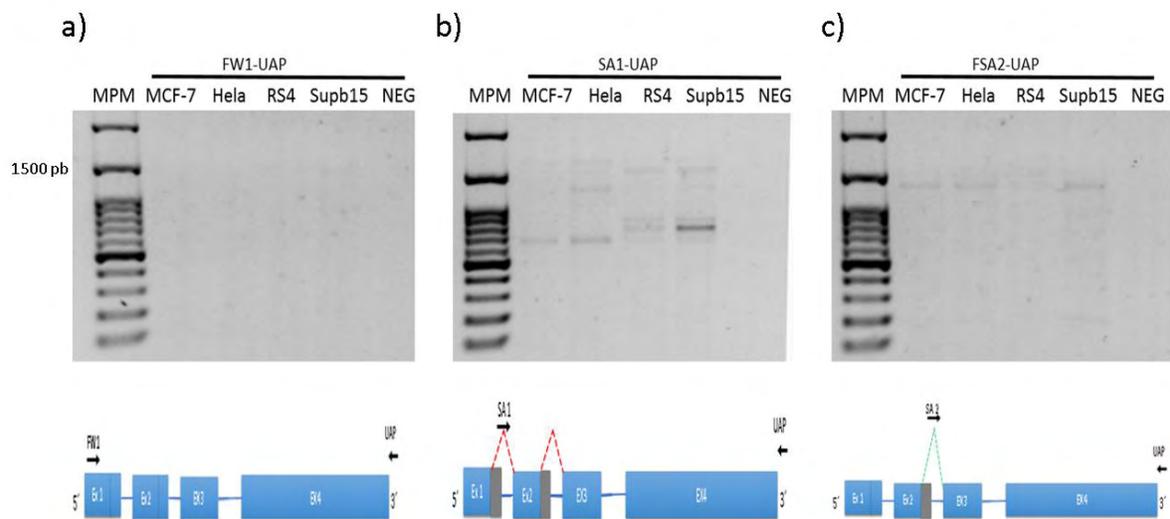


Figura 17 | RACE a) PCR FW1-UAP de ZNF695 peso esperado de 3,357 pb. b) PCR SA1-UAP peso esperado de 3,215 pb, c) PCR SA2- UAP peso esperado de 3,050 pb, parte inferior de cada gel se muestra el diseño específico de los oligonucleótidos, flechas negras representan oligonucleótidos para las variantes de ZNF695, rectángulos en gris representan pérdida de secuencia, línea punteada verde SA 5' exón 2-3, línea punteada roja SA 5' exón 1-2 y 2-3 MPM, marcador peso molecular.

Se realizó una PCR empleando combinaciones de oligonucleótidos para reforzar la evidencia de la pérdida de secuencia en el exón cuatro del gen ZNF695, para este experimento se emplearon como templado producto de PCR de la reacción FW1-UAP (Fig 17a) de la línea celular Supb15 y cDNA de Supb15 (25ng/μl), se emplearon dos oligonucleótido reverse, uno que hibrida al principio del exón cuatro, denominado (RV1.2) y otro que hibrida al final del exón cuatro, denominado (RV1),

también se emplearon los oligonucleótidos para SA1 y SA2, se procedió a realizar las combinaciones como se muestra en la (Fig 18a,b). La figura 18a muestra los productos de PCR empleando las combinaciones de los oligonucleótidos para SA1 y SA2, oligonucleótido reverse RV1.2, los pesos esperados fueron de 559 pb (SA1-RV1.2) y 427 pb (SA2-RV1.2). Con esto, nosotros pudimos determinar que ambos templados presentaron expresión. En el gel de agarosa se observa la amplificación de las dos bandas esperadas; carril 1, 4 (producto de PCR, figura 17a), carril 2, 5 (cDNA 25ng/μl). En la figura 18b se muestran la PCR, empleando las combinaciones de oligonucleótidos para SA1 y SA2, en este caso se empleó el oligonucleótido reverse RV1, el cual, hibrida el final del exón cuatro del gen ZNF695. Los pesos esperados eran de 2,947 pb (SA1-RV1) y 2816 pb (SA2-RV1), ninguno de los dos templados presento expresión, como se muestra en el gel de agarosa carril 7,10 (producto de PCR, figura 17b), 8, 11 (cDNA 25ng/μl), este resultado es muy interesante, debido que, cuando se emplea el oligonucleótido que hibrida al final del exón cuatro, no se observa expresión del producto esperado. Mientras que al emplear el oligonucleótido que hibrida a principio del exón 4 si se observa la amplificación. Estos muestran evidencias donde la variante cinco y la variante cuatro presentan una pérdida adicional en el exón cuatro, sugiriendo que este exón podría

estar sujeto a procesos adicionales de *splicing* alternativo, generado productos más cortos.

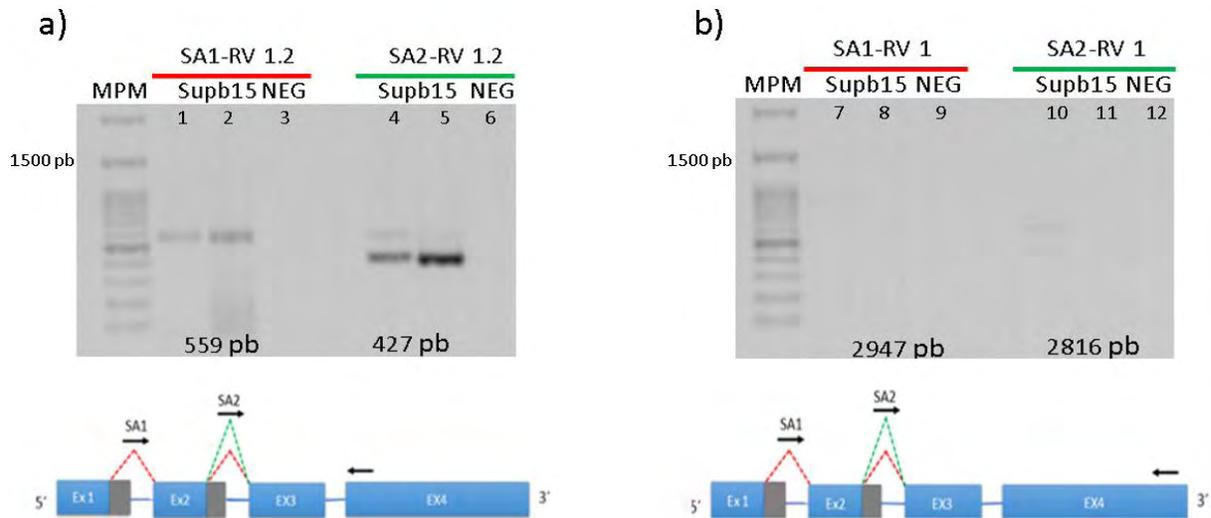


Figura 18 | RACE a) PCR en la línea celular Supb15 combinaciones SA1-RV1.2 (izquierda); SA2-RV1.2 (derecha) pesos esperados 559 pb, 427 pb respectivamente. b) PCR en la línea celular Supb15 combinaciones SA1-RV1 (izquierda); SA2-RV1 (derecha) pesos esperados 2,947pb, 2,816 pb. Parte inferior de cada gel se muestra el diseño específico de los oligonucleótidos rectángulos en gris representan pérdida de secuencia, línea punteada verde SA 5' exón 2-3, línea punteada roja SA 5' exón 1-2 y 2-3 MPM, marcador peso molecular.

8.3 Modelo SA del gen ZNF695

Con los resultados obtenidos, se diseñó en la figura 19 un modelo de las variantes de *splicing* alternativo del transcrito ZNF695, donde representamos con rectángulos de color azul las variantes reportadas: variante uno que contiene cuatro exones (3,392 pb) siendo el exón cuatro de mayor tamaño con 2,930 pb. La variante dos contiene seis exones con un tamaño de 954 pb y variante tres de 958 pb. En la parte inferior se muestran las variantes que hemos identificado en el trabajo, las cuales presentan secuencias similares como se muestra a continuación: la variante cuatro y cinco son más similares a la variante uno, mientras que la variante seis y siete son más similares a la variante tres. En la línea punteada verde representa los sitios

alternativos de *splicing* 5' del exón 2-3. La línea punteada roja representa los sitios alternativos de *splicing* 5' exón 1-2 y 2-3. Los rectángulos de color gris representan pérdida de secuencia.



Figura 19 | modelo SA del gen ZNF695. Variante uno de ZNF695 contiene cuatro exones (3,392 pb) siendo el cuatro el más grande con 2,930 pb, variante cuatro ZNF695 SA 5' exón 2-3, variante 5 de ZNF695 SA 5' exón 1-2 y 2-3. Variante dos de ZNF695 tiene seis exones (954 pb), variante tres de ZNF695 tiene (958 pb), variante seis de ZNF695 tiene un SA 5' exón 2-3 similar en secuencia con la variante tres hasta el exón seis, variante siete de ZNF695 tiene un SA 5' exón 1-2 y 2-3 similar en secuencia con la variante tres hasta el exón seis, rectángulos en gris representan pérdida de secuencia, línea punteada verde SA 5' exón 2-3, línea punteada roja SA 5' exón 1-2 y 2-3, línea vertical naranja (posible pérdida de secuencia).

8.4 Evaluación muestras de sangre periférica (grupo control)

Se evaluaron muestras de sangre periférica de individuos sanos (grupo control), para comprobar si en condiciones de salud se encuentra expresado el gen ZNF695, se evaluaron 9 muestras de sangre periférica donadas por INP y como control

positivo se usaron las líneas celulares de LLA RS4 y Supb15, como control de expresión se empleó el gen RPL4 con un peso de 112 pb (Fig 20a) todas las muestras presentaron la expresión de este gen, posteriormente se procedió a evaluar las variantes 1 y 3 del gen ZNF695 con amplicones esperados de 279 pb y 212 respectivamente (Fig 20b, 20c) en las dos imágenes se muestra que los nueve controles no muestran expresión de la variante 1 y 3 del gen ZNF695 y que las líneas celulares RS4 y Supb15 si muestran expresión de ambas variantes, estas imágenes nos muestran que en condiciones de salud no hay una expresión de la variante 1 y 3 del gen ZNF695 y que en línea celulares de LLA este gen si se encuentra expresado.

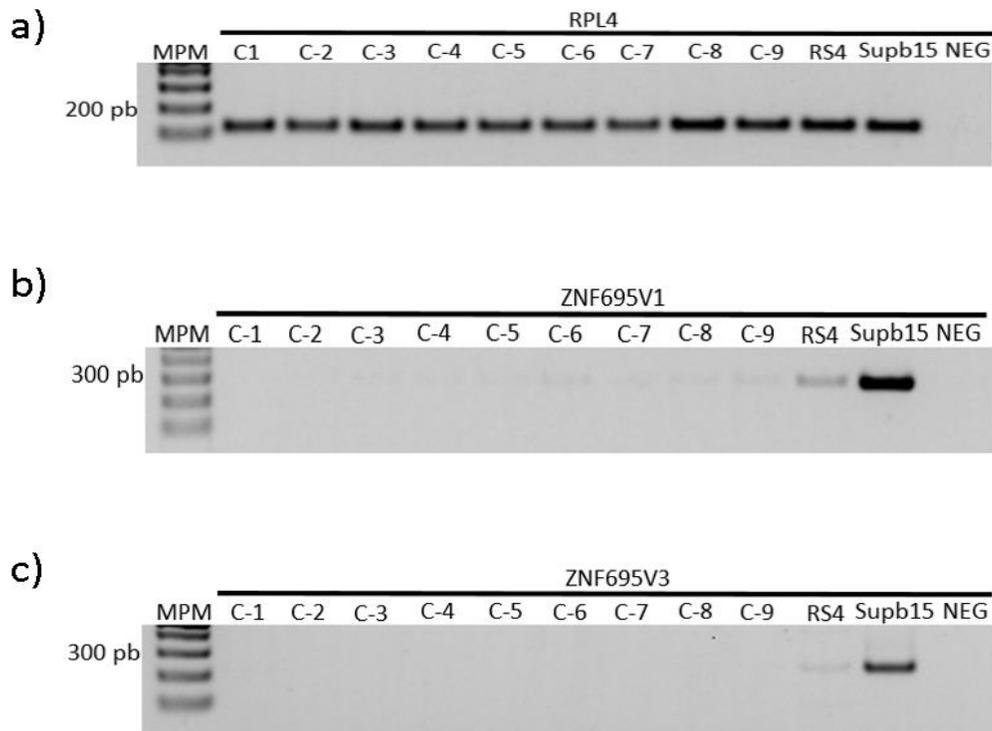


Figura 20 | PCR de sangre periférica y líneas celulares de LLA de ZNF695 a) PCR en el que se observa la expresión de RPL4. b) PCR de la variante uno del gen ZNF695 c) PCR de la variante tres del gen ZNF695. Geles de agarosa al 1.2%, MPM Marcado de peso molecular.

8.5 Evaluación muestras de pacientes con LLA

Se evaluaron 44 RNA de pacientes con leucemia linfoblástica aguda almacenada en el banco de tejidos del laboratorio de Oncología Experimental del INP, la integridad del RNA se evaluó mediante la expresión del gen RPL4 todas las muestras presentaron este gen (Fig 21a), una vez confirmada la integridad del RNA se procedió a evaluar la expresión del gen ZNF695 variante uno y variante tres con amplicones esperados de 279 pb y 212 pb respectivamente. 14 pacientes presentaron la expresión de ZNF695 variante uno (Fig 21b) y 12 de ZNF695 variante tres (Fig 21c), con estas imágenes podemos apreciar que también en pacientes con LLA tenemos una expresión de la variante uno y tres del gen ZNF695 que son las variantes que ya han sido reportadas en el NCBI.

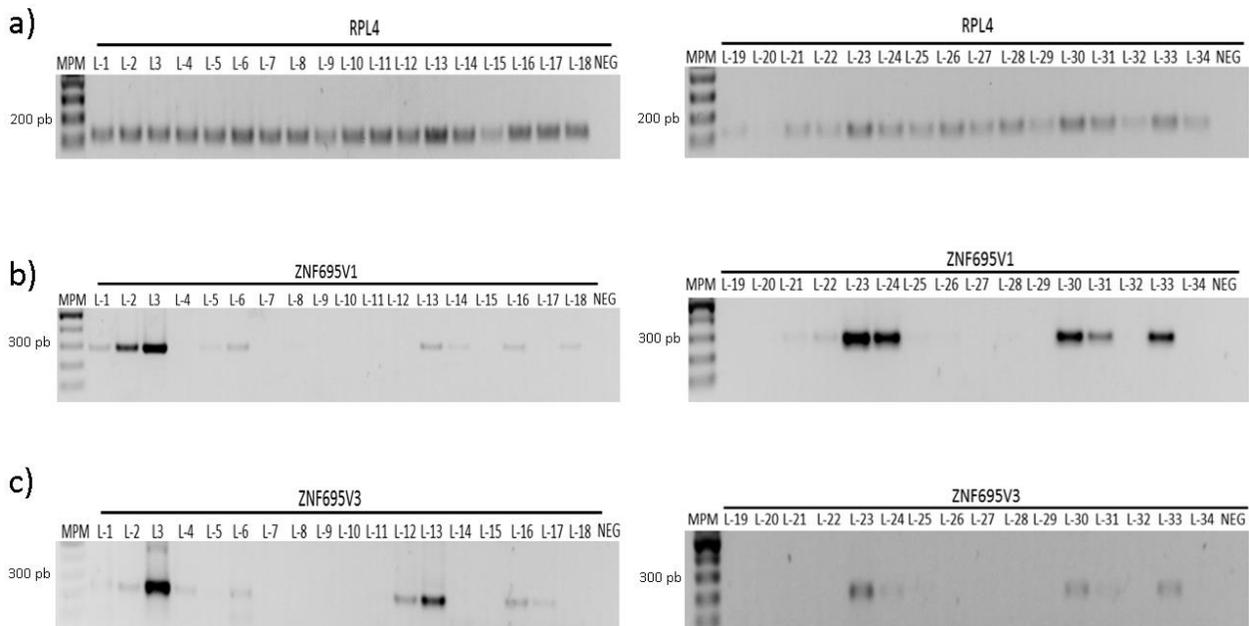


Figura 21 | PCR variantes del gen ZNF695 en pacientes con LLA a) PCR en el que se observa la expresión de RPL4. b) PCR de la variante uno del gen ZNF695 c) PCR de la variante tres del gen ZNF695. Geles de agarosa al 1.2%, MPM Marcado de peso molecular.

Los pacientes positivos para la expresión de ZNF695 variante uno, fueron seleccionados para realizar PCR específicas para las variantes cuatro, cinco con amplicones esperados de 427 pb y 559 pb, respectivamente. Los pacientes positivos para la variante tres se seleccionaron para realizar PCR específicas para las variantes seis y siete con amplicones esperados de 471pb y 602 pb, respectivamente. En la figura 22a se muestra la expresión de la variante cuatro de ZNF695, solo la muestras L-14 no presentó expresión, en la figura 22b se observa expresión de la variante cinco de ZNF695 solo las muestras, L-3, L-23, L30 presentaron expresión. En la figura 22c solo las muestras L-3 y L-13, mostraron poca expresión de la variante seis de ZNF695, En la figura 22d se observó expresión de la variante siete solo en las muestras L-3, L-13, L-23, L-30. Esto resultados nos indican que los pacientes con LLA, además de co-expresar la variante uno y tres, expresan adicionalmente la variante cuatro, cinco, seis y siete. También es importantes destacar que, la variante cuatro tiene alta expresión en los pacientes con LLA. Además, observamos que algunos pacientes co-expresan las 6 variantes del ZNF695.

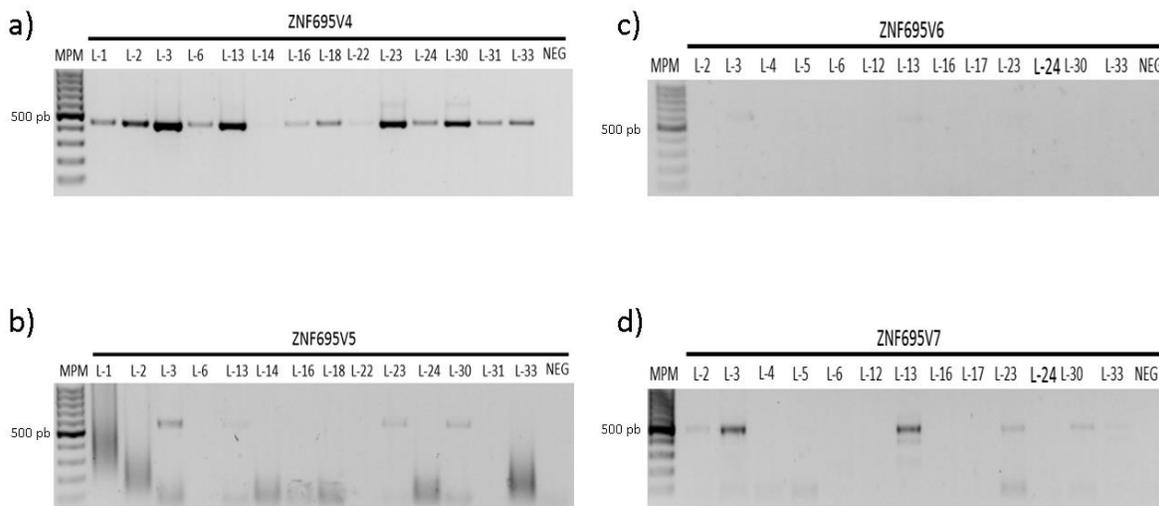
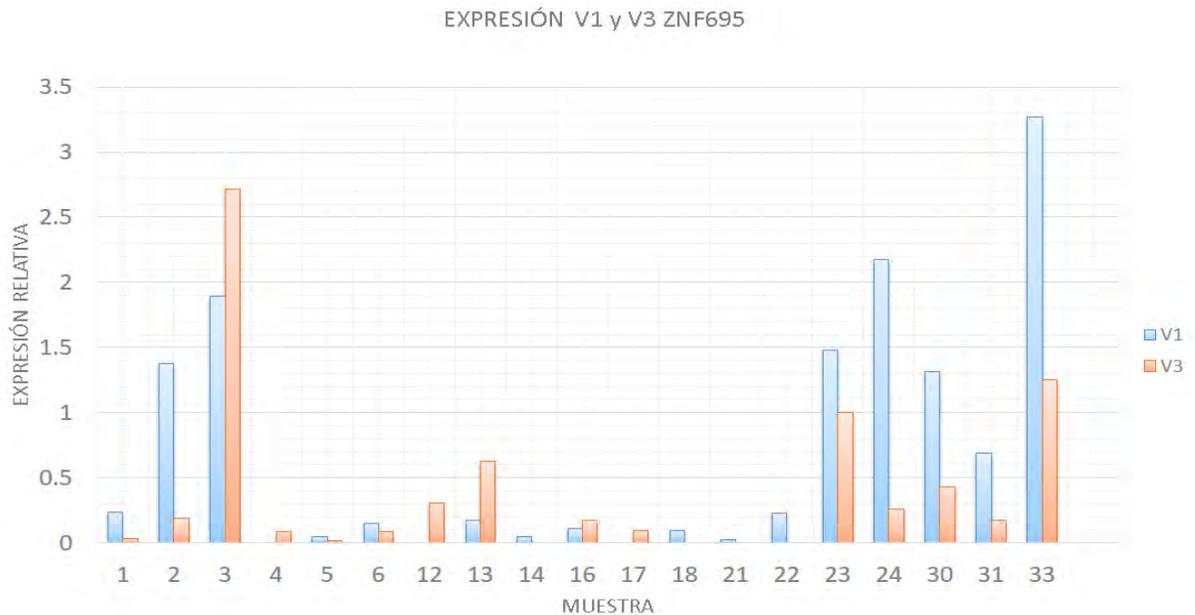


Figura 22 | PCR variantes del gen ZNF695 en pacientes con LLA a) PCR en el que se observa la expresión de ZNF695-V4. b) PCR en el que se observa la expresión de ZNF695-V5 c) PCR en el que se observa la expresión de ZNF695-V6 d) PCR en el que se observa la expresión de ZNF695-V7. Geles de agarosa al 1.2%, MPM Marcado de peso molecular.

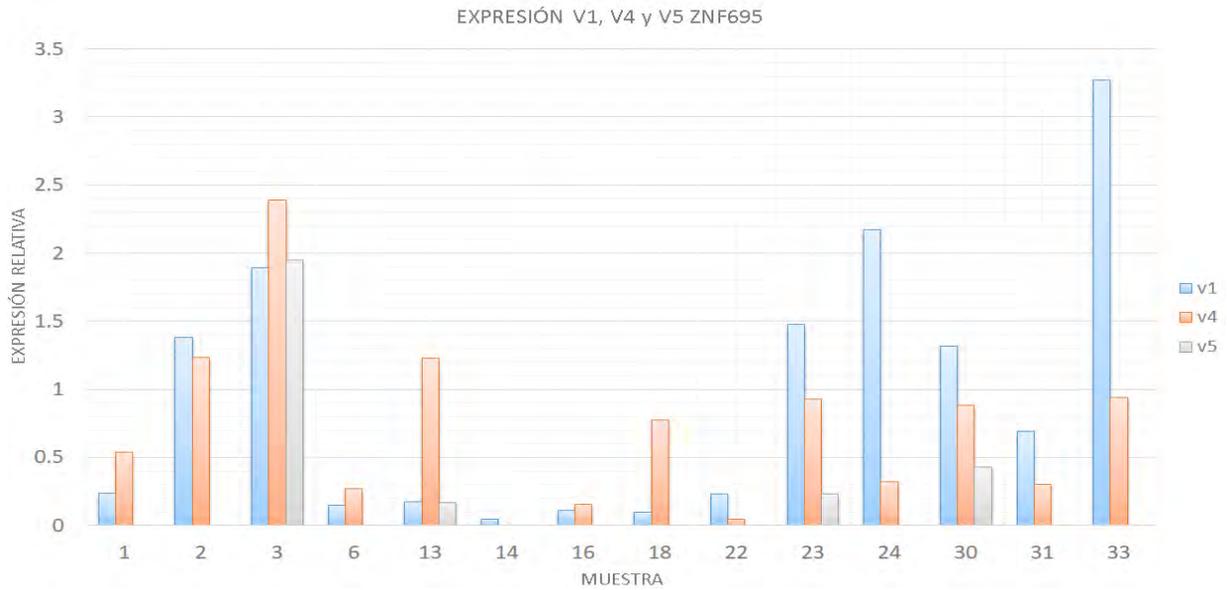
Posteriormente se realizó un análisis densitométrico de cada banda en los pacientes con LLA, mediante el programa *Imagen J*. Los geles fueron evaluados mediante la construcción gráfica de expresión relativa que se muestra a continuación. En dichas gráficas se emplearon los datos obtenidos con *Imagen J* de la expresión de las variantes de ZNF695, todos los datos se normalizaron empleando la expresión de RPL4 de la muestra correspondiente. En la gráfica 1 se muestra la expresión relativa de variante uno y tres de ZNF659 en pacientes con LLA, en el eje vertical se muestra la expresión relativa y en el eje horizontal se muestra de cada paciente, en esta gráfica podemos observar la co-expresión de dos variantes en algunas de las muestras. Con el análisis observamos que 16 muestras expresaron la variante uno, la expresión de la variante tres la observamos en 15 muestras, también podemos observar que para la co-expresión de la combinatoria de indicadores (uno y tres), 12 muestras fueron positivas. Además, observamos en 7 pacientes la expresión de

solo una variante del ZNF695. De estos: Cuatro pacientes expresaron la variante uno (muestras 14, 18, 21, 22); tres pacientes solo expresaron la variante tres (muestras 4, 12, 17) como se muestra en la Grafica 1.



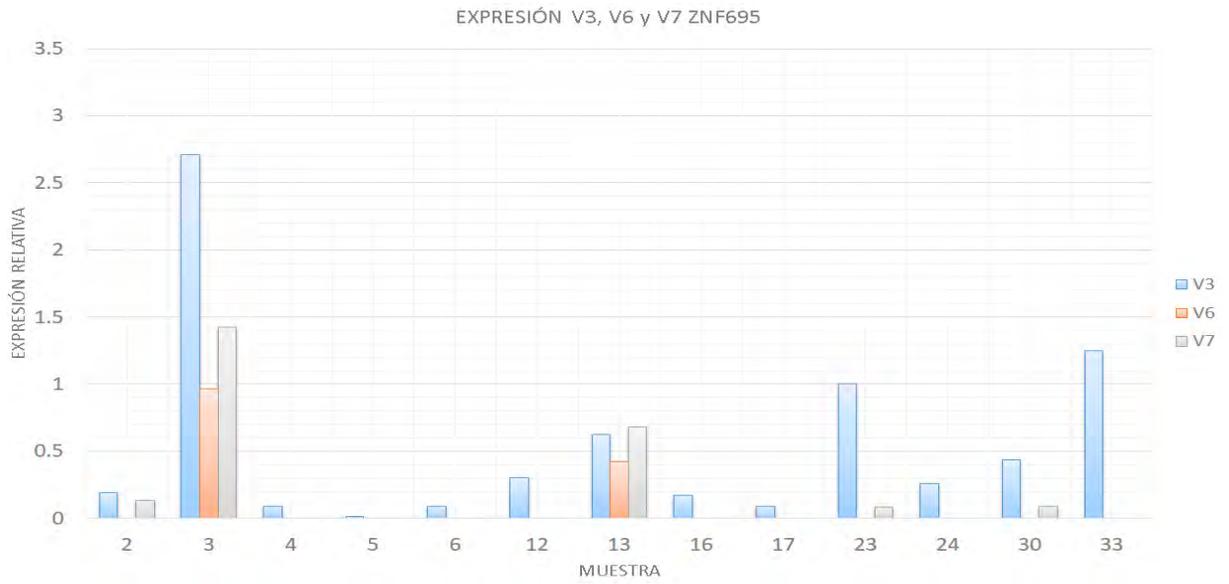
Grafica 1 |expresión relativa de ZNF695-V1 y ZNF695-V3 eje vertical muestra la expresión relativa de las variantes, eje horizontal representa las muestras de los pacientes con LLA

Posteriormente se comparó la expresión de las variantes cuatro y cinco, utilizando a la variante 1 como referencia. Este grafico se construyó de esta manera, debido a que estas variantes presentan alta similitud en secuencia, con esto pudimos evidenciar que 12 pacientes son positivos para la variante cuatro. Mientras que la variante cinco se presentó en 4 pacientes. En relación a la co expresión de las variantes, determinamos que la variante uno, cuatro y cinco se expresan en 4 pacientes. Mientras que la combinatoria uno y cuatro, se presenta en 9 de la muestras. Finalmente, solo un paciente presentó la expresión de la variante uno como se Gráfica 2.



Grafica 2 | expresión relativa de ZNF695-V1, ZNF695-V4 y ZNF695-V5 eje vertical muestra la expresión relativa de las variantes, eje horizontal representa las muestras de los pacientes con LLA

También se procedió a realizar la comparación de la expresión de las variantes seis y siete utilizando como referencia la variante tres. En esta comparación observamos que tres muestras presentaron expresión la expresión de la variante seis. La variante siete se observó en cinco pacientes. La co-expresión de las variantes 3, 6 y 7 se presentaron en dos muestras. En la combinatoria de las variantes 3 y 7 se observó en tres muestras. Ocho muestras solo muestran expresión de la variante tres, como se muestra en la Grafica 3.



Grafica 3 | expresión relativa de ZNF695-V3, ZNF695-V6 y ZNF695-V7 eje vertical muestra la expresión relativa de las variantes, eje horizontal representa las muestras de los pacientes con LLA

9. Discusión

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente entre la población pediátrica, en México ocupa el séptimo lugar en cuanto a mortalidad en niños de uno a cuatro años de edad, con una tasa de 3.2/100 000 habitantes, y en los niños de 5 a 14 años es la segunda causa de muerte (Castillo-Martínez et al. 2009; Sánchez et al. 2016). Nosotros podemos encontrar en nuestro estudio dos picos de edad en los paciente con LLA, el 33.3% tienen una edad de uno a cuatro años y el 64.1% tienen una edad de 6 a 15 años estos rangos de edad concuerdan con lo descrito por Castillo-Martínez et al en 2009, esto es importante ya que la edad es uno de los factores de riesgo mas estudiado, al igual que el género.

La incidencia de leucemia linfoblástica aguda en México es de 1/100,000 habitantes al año, es más frecuente en varones que en mujeres, en el año 2000 se reportaron 1,926 casos nuevos, de éstos 53% fueron varones, con dos picos de manifestación; el primero en edad escolar y el segundo por arriba de 65 años de edad. (Sánchez et al. 2016); En nuestro trabajo se usaron 43 muestras de pacientes pediátricos con LLA de los cuales encontramos que el 56.7% de los pacientes incluidos fueron mujeres y 47.2% corresponde a varones, contrastando cómo lo observado por Manuel Ortega y colaboradores, en nuestro trabajo encontraron una mayor incidencia de LLA en mujeres.

Otra de las características de las células leucémicas que se puede emplear para determinar qué pacientes tienen mayor riesgo, es el inmunofenotipo, éste describe si las células leucémicas son más similares a linfocitos B o linfocitos T. Aproximadamente el 80% de los pacientes pediátricos con LLA tienen

inmunofenotipo B (pacientes de menor riesgo), del 10% al 15% presentan inmunofenotipo T (pacientes de mayor riesgo) (Cooper & Brown 2015). En nuestro grupo de pacientes podemos encontrar que el 88.8% presenta un inmunofenotipo de linfocitos B y el 8.3% de los pacientes presenta un inmunofenotipo de linfocitos T, concordando con lo reportado por Stacy L. Cooper en 2015, al encontrar que el inmunofenotipo de linfocitos B tiene mayor presencia y se puede esperar un mejor pronóstico para más del 80% de los pacientes con LLA.

Otro factor de riesgo es la carga leucémica al momento del diagnóstico que, puede estar representado por el número de leucocitos, de ahí que la cuenta de leucocitos > 50,000 células/ μ l se ha asociado a pacientes con alto riesgo, solo el 24.3% de nuestro grupo de pacientes presentaron cuenta de leucocitos superiores a 50,000 células/ μ l, contrastando con el 75.6% de los pacientes que presentaron cuenta de leucocitos menores a 50,000 células/ μ l, por lo cual la mayoría de los pacientes muestran características de bajo riesgo (Manuell-Lee et al. 2012).

De manera general los estudios epidemiológicos muestran que los factores de riesgo para el desarrollo de LLA son: edad, sexo, cuenta inicial de leucocitos, inmunofenotipo, respuesta a la quimioterapia, estado de nutrición, haber presentado ictericia neonatal, exposición a oxígeno suplementario posnatal, exposición a campos electromagnéticos, exposición a benceno y otros hidrocarburos, sustancias tóxicas como plaguicidas, éste es uno de los factores de riesgo más importantes en niños, pueden causar un desequilibrio cromosómico y actuar como carcinógenos

durante los periodos de desarrollo embrionario de gran división celular (Manuell-Lee et al. 2012).

Algunas investigaciones sobre alteraciones genéticas y moleculares en LLA, han permitido reconocer las alteraciones que se consideran de bajo riesgo, éstas se presentan aproximadamente en el 85% de los casos de LLA entre las que se encuentran: alteraciones citogenéticas (hiperdiploidia y las trisomías 4, 10 y 17), traslocaciones como *TEL-AML1* t(12;21) *TCF3-PBX1* t(1;19), Sobreexpresión de *CRLF2* y de alto riesgo, entre los cuales se encuentran: hipodiploidia (<44 cromosomas), reordenamiento en *MLL*, translocaciones de *MLL-AF4* t(4;11), *BCR-ABL1* t(9;22), mutaciones en *JAK1* y *JAK2*, mutaciones e isoformas generadas por SA en IKAROS, se debe tener en cuenta que la frecuencia de cualquiera de estas alteraciones, por lo general, es menor al 10% del total de las LLA (Manuell-Lee et al. 2012). De acuerdo con estos factores, los pacientes pediátricos diagnosticados con LLA pueden dividirse en grupos de riesgo, para el diseño y aplicación del esquema de tratamiento. Uno de los factores pronósticos estudiados recientemente, es la presencia de isoformas de la proteína ikaros, la cual se ha asociado con el desarrollo de LLA, en 2014 Zhou y colaboradores evaluaron la asociación de la isoforma generada por SA (ik6) y la eficacia de la quimioterapia, evaluaron 25 muestras de pacientes pediátricos con LLA, que presentaron expresión de ik6, dieciséis pacientes respondieron mal a la quimioterapia. En nuestro estudio podemos observar que en las muestras control no se encontró expresión de ZNF695 (Fig. 20d, c) mientras que en las muestras con LLA se encontró expresión de las variantes canónicas y alternativas de ZNF695 como se observa en la figura 21 y 22,

en el caso de nuestras muestras podemos observar co-expresión de las diversas variantes de ZNF659, también podemos destacar muestras que expresan las 6 variantes como son: L-3 y L13 representado en la gráfica 2 y 3, esta sobre expresión podría estar implicada en la evolución y pronóstico de estos pacientes debido a que son los únicos que muestran este patrón de sobre expresión.

También observaron que la sobre expresión de ik6, disminuye la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos como VCR, DNR y L-Asp a través de un efecto antiapoptótico. Por otra parte, el silenciamiento de Ik6 en Supb15 inhibe la proliferación y aumenta la quimiosensibilidad a VCR, DNR y L-Asp, por tal motivo la isoforma pudiera ser un marcador pronóstico de alto riesgo para pacientes con LLA. Empleamos líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer, en donde se observó que Supb15 presentó mayor expresión de la variante uno y tres de ZNF695, en comparación con las otras líneas celulares empleadas (Fig. 12). Además, observamos expresión de las variantes alternativas ZNF695-4 y ZNF695-5 (Fig. 13), la sobre expresión de estas variantes podrían esta relacionas con las características agresivas de esta línea celular, debido que son derivadas de una neoplasia maligna, también podrían comportarse de la misma manera en pacientes con LLA. Zhou y colaboradores indican que las isoformas generadas por SA contribuyen al desarrollo de LLA, por lo cual, la investigación sobre la diversidad de isoformas generada por SA es de suma importancia (Zhou et al. 2014).

Algunas investigaciones sobre SA han permitido conocer la diversidad de alteraciones moleculares en las neoplasias, las cuales, pueden llegar a causar enfermedades como el cáncer. El papel del SA en algunos casos ha sido bien

estudiado y puede causar modificaciones en genes que favorecen la progresión tumoral como: proliferación celular, apoptosis, ciclo celular, resistencia a fármacos, entre otros (Chen & Weiss 2014).

Varios estudios han demostrado que la LLA presenta una alta desregulación de la expresión génica, se ha descrito que la LLA presenta expresión de variantes generadas mediante SA que, están relacionadas con el proceso de leucemiogénesis como son; *AID*, *SLP65*, *PYK2*, *BTK*, *IKAROS*, entre otros. (Imai et al. 2004; Zhou et al. 2014). *IKAROS* es uno de los genes más estudiado en LLA, este gen codifica una proteína con dominios dedos de Zinc (C_2H_2), tiene la cualidad de unirse a DNA y es esencial para el control de la proliferación y diferenciación de los linajes linfoides, en 2014 Lacobucci y colaboradores evidenciaron la expresión de la isoforma IK6, dominante negativa de *IKAROS*, en muestras de paciente con LLA positivas para BCR-ABL. El producto proteico de IK6 pierde la capacidad de unión al DNA y, durante la linfopoyesis temprana, puede desregular la diferenciación de linfocitos que predispone a los precursores linfoides a la transformación y/o progresión leucémica. Adicionalmente, confirmaron en su estudio que, la expresión de Ik6 aumenta fuertemente la proliferación e inhibe la apoptosis (Iacobucci et al. 2014).

Otra proteína dedos de Zinc (C_2H_2) la cual es codificada por el gen *ZNF695*, similar a la proteína Ikaros y que también está sujeta a SA, generando tres isoformas; dos codificantes una corta de 954 pb, conformada por 6 exones y una larga de 3,392 pb, con 4 exones, siendo el exón 4 el más grande con 2,948 . La isoforma larga contiene un domino KRAB y 13 dedos de Zinc y una isoforma corta que solo

contiene el dominio KRAB. La tercera isoforma corresponde a un RNA largo no codificante, pero se sabe poco sobre la función de este gen.

Actualmente solo existe un estudio de SA del ZNF695, en 2013 Juárez Méndez y colaboradores demostraron en muestras de pacientes con cancer de ovario, la existencia de, dos sitios de SA en el transcrito del gen ZNF695, generando isoformas adicionales denominadas como: ZNF695-V4 y ZNF695-V5. Estos resultados han permitido ampliar la información de los transcritos de este gen y su diversidad, debido a que éste ha sido poco estudiado, se sabe poco de su expresión en los distintos tipos de cáncer y no existen trabajos sobre SA de este gen en muestras de pacientes con LLA (Juárez-Méndez et al. 2013). Nuestros resultados confirmaron la expresión de las variantes 4 y 5 del gen ZNF695 (Fig. 13) en distintos tipos de cáncer y en pacientes con LLA, adicionalmente se evidenció que estas dos variantes pudieran tener una pérdida adicional en el exón cuatro como se observa en la figura 18, lo que modificaría la cantidad de dedos de Zinc, alterando el sitio de unión de esta proteína al DNA, también podríamos esperar que las variantes 1, 4 y 5 de ZNF695 al tener mayor homología en secuencia y contener dominios dedos de Zinc (C_2H_2) podrían estar regulando genes transcripcionalmente, ya que se sabe específicamente que, los dedos de Zinc C_2H_2 tienen interacción directa con DNA, como se ha observado en la función de factores de unión al DNA (Dijon et al. 2017; Lupo et al. 2013). Además, se pudo evidenciar la expresión de dos variantes adicionales, variantes 6 y 7, similares en secuencia a la variante tres debido a que, tiene cuatro nucleótidos más que la variante dos como se muestra en

la figura 15, estas dos variantes al igual que la variante tres corresponderían a un RNA no codificante.

Otra de las investigaciones que ha evidenciado la importancia del gen ZNF695 fue realizada en 2014 por Takahashi y colaboradores, ellos observan que la metilación del promotor de ZNF695 se relaciona con la respuesta a quimio-radioterapia, ésto se observó en pacientes diagnosticados con carcinoma escamoso esofágico. Por tal motivo se propone que la metilación de dicha isla es un marcador predictivo para una respuesta positiva al tratamiento. Takahashi y colaboradores también sugieren dos mecanismo de acción para la proteína ZNF695, primera ZNF695 al ser un factor de transcripción puede regular la expresión de genes implicados en la reparación del DNA y la segunda ZNF695 puede activar mecanismos de supervivencia para las células cancerosas que ayudan a evadir la quimio radioterapia (Takahashi et al. 2014). Nuestros resultados sugieren que ZNF695 pudiera estar implicado en el proceso de carcinogénesis, debido a que en muestras de individuos aparentemente sanos, no se obtuvo expresión de las variantes canónicas y alternativas del ZNF695, esto podría indicarnos que la isla CpG de ZNF695 se encuentra metilada en personas sanas cuando no hay expresión de este gen. Mientras que, en las líneas celulares derivadas de cáncer y los pacientes con LLA observamos la presencia de los transcritos de ZNF695, esto también podían indicarnos que la isla CpG de ZNF695 en las líneas celulares y en 51% de muestras de LLA podría encontrarse desmetilada.

Varios estudios han demostrado que los dedos de Zinc cumplen funciones muy diversas, y son esenciales para el desarrollo normal de las células, en 2013 Lin y colaboradores evidenciaron en línea celular Hela de cáncer de cuello uterino, que ZBRK1 una proteína con un dominio KRAB y ocho dedos de Zinc C_2H_2 considerada un supresor, evidenciaron que cuando esta proteína ZBRK tiene pérdida del dominio KRAB, pierde la capacidad de inhibir el crecimiento celular, migración y la invasión celular. También descubrieron una nueva función de ZBRK1 como un represor transcripcional del gen KAP1. Las variantes de ZNF695 (4, 5, 6 y 7) identificadas en el presente estudio, también tiene una pérdida en la secuencia del dominio KRAB por lo cual, podemos esperar una pérdida la función represora. También podríamos esperar que al perder el dominio KRAB estas proteínas puedan incluso cambiar su fusión normal ya que las muestras del grupo control no tuvieron expresión de estas variantes, solo se encuentran expresadas en líneas celulares y pacientes con LLA (Lin et al. 2013).

Chen y colaboradores también han referenciado que adicionalmente a los patrones de SA más estudiados, un transcrito puede tener un sitio alternativo de poliadenilación y a su vez un exón puede estar sujeto a más de una forma de SA. Nuestro resultado sobre la variante ZNF695-V4 y ZNF695-V5 nos sugieren que estas dos variantes podrían presentar sitios de poliadenilación (Fig. 18), lo cual afectaría el dominio N-terminal, donde se encuentra la secuencia que codifica los dedos de Zinc, lo cual, podría modificar la cantidad de los dedos de Zinc de la proteína resultante y por lo cual modificar el sitio de unión de este dominio a DNA (Chen et al. 2012). Otros estudios realizados por Ahmadi en 2009 evidencian

nuevas variantes producto de poliadenilación alternativa HuR que contiene seis exones, en este estudio se encontraron dos nuevas variantes usando métodos informáticos las cuales indicaron dos posibles sitios de poliadenilación que están en el exón 6 de HuR y se confirmó experimentalmente con RT-PCR y Northern blot en el cual se observó la expresión de dos bandas en el peso esperado, demostrando que las variantes generadas por poliadenilación alternativa es un mecanismo adicional de splicing alternativo que le da una mayor diversidad a los transcritos, en el caso de nuestro resultados específicamente de las variantes ZNF695-V4 y ZNF695-V5 los sitios de splicing podrían estar contenidos en el exón cuatro, para poder evidenciarlo se tendría que emplear nuevos métodos como el que presenta Ahmadi, (Al-Ahmadi et al. 2009).

10. Conclusiones

1. Se determinó la expresión de las variantes uno y tres del ZNF695 en líneas celulares derivadas de diferentes tipos cáncer y en muestras de pacientes con LLA.
2. Se identificó la expresión de dos nuevas variantes de ZNF695 similares en secuencia con la variante uno, con distinto patrón de SA denominadas como la variante cuatro y cinco.
3. Se identificó la expresión de dos nuevas variantes de ZNF695 similares en secuencia con la variante tres, con distinto patrón de SA las variantes seis y siete.

4. Se obtuvo la secuencia completa de las variantes seis y siete de ZNF695
5. Se identificaron diversos patrones de co-expresión de las seis variantes de ZNF695 en pacientes con LLA y líneas celulares derivadas de distintos tipos de cáncer.

11. Perspectivas

- I. Realizar estudio para conocer la función de todas las variantes del ZNF695.
- II. Evaluar la expresión de las variantes del ZNF695 en un número mayor muestras controles y pacientes.
- III. Identificar si las variantes de ZNF695 cuatro y cinco, contienen sitios poliadenilación alternativa.

12. Bibliografía

- Al-Ahmadi, W. et al., 2009. Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: Abundance, role of AU-rich elements and auto-Regulation. *Nucleic Acids Research*, Vol 37(11), pp.3612–3624.
- Aranguré, M. et al., 2005. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social México*, Vol 43(4), pp.323–333.
- Armendariz Borunda & Socorro Juan, 2011. *Biología molecular - Armendariz Borunda, Juan Socorro - Google Books*, Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=DCSEBgAAQBAJ&pg=PA50&dq=corte+y+empalme+de+ARN&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwihupu168HQAhUo94MKHf5bArAQ6AEITzAG#v=onepage&q=corte+y+empalme+de+ARN&f=false>.
- Castillo-Martínez, I.D. et al., 2009. Calidad de vida en niños con leucemia linfoblástica aguda durante la inducción a la remisión mediante el PedsQL Cancer Module. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, Vol 66(1), pp.410–418. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462009000500003&nrm=iso.
- Chen, J. & Weiss, W. a, 2014. Alternative splicing in cancer implications for biology and therapy. *Oncogene*, Vol 34(October 2013), pp.1–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441040>.
- Chen, L., Corona, J.M.T. & Araxi O.Urrutia, 2012. Alternative splicing a potential source of functional innovation in the eukaryotic genome. *International Journal of Evolutionary Biology*, Vol 2012(1), pp.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/596274>.
- Clancy, S., 2008. RNA Splicing: Introns, Exons and Spliceosome. *Nature Education*, Vol 1, pp.1978–1981.
- Cooper, S.L. & Brown, P.A., 2015. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, Vol 62(1), pp.61–73.
- Dijon, M. et al., 2017. The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *ResearchGate*, Vol 111(March 2008), p.pp.1138-1146.
- Frías, V.L. et al., 2016. Diagnóstico Precoz De Cáncer En Atención Primaria. *Pediatría Integral*, Vol 20(6), pp.70–75. Available at: http://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2016/09/Pediatrica-Integral-XX-06_WEB.pdf#page=18.
- García, C., 2006. Las versátiles proteínas zinc fingers. *Química Viva*, Vol 5(1), pp.8–18.
- Iacobucci, I. et al., 2014. Expression of spliced oncogenic Ikaros isoforms in

- Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: implications for a new mechanism of resistance. *Blood*, Vol 112(9), pp.3847–3855.
- Imai, C. et al., 2004. Expression of the adaptor protein BLNK/SLP-65 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Society of America*, Vol 18(1), pp.922–925.
- Juárez-Méndez, S. et al., 2013. Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, Vol 6(61), pp.1–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3847372&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Krishna, S.S., Majumdar, I. & Grishin, N. V, 2003. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Research*, Vol 31(2), pp.532–550.
- Lee, Y. et al., 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 2015(84), pp.291–323.
- Licatalosi, D.D. & Darnell, R.B., 2010. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nature reviews. Genetics*, Vol11(1), pp.75–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3229837&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Lin, L.F. et al., 2013. Loss of ZBRK1 Contributes to the Increase of KAP1 and Promotes KAP1-Mediated Metastasis and Invasion in Cervical Cancer. *PLoS ONE*, Vol 8(8), pp.1–13.
- Lupo, A. et al., 2013. KRAB-Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions. *Current genomics*, Vol 14(4), p.pp.268-78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294107>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3731817>.
- Manuell-Lee, G.R. et al., 2012. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. , Vol 69(3), pp.141–262. Available at: www.himfg.edu.mx
www.nietoeditores.com.mx.
- Matera, A.G. & Wang, Z., 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, Vol 15(2), pp.108–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4060434&tool=pmc&rendertype=abstract>.
- Oliver, C.H., Nichols, J. & Watson, C.J., 2013. The KRAB domain zinc finger protein, Zfp157, is expressed in multiple tissues during mouse embryogenesis and in specific cells in adult mammary gland and skin. *Genesis*, Vol 51(3), pp.179–186.
- OMS, 2013. “ Estadísticas a Propósito Del Día Internacional Contra El Cáncer De

Mama ." *Inegi*, Vol 24(1), pp.1–17.

OMS, 2017. OMS | Cáncer. *WHO*. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Accessed September 12, 2017].

Sánchez, M.A.O., Ortega, M.L.O. & Barrientos, J.V.R., 2016. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, Vol 20(6), pp.380–389.

Takahashi, T. et al., 2014. ZNF695 methylation predicts a response of esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Vol 141(3), pp.453–463.

Will, C.L. & Lührmann, R., 2006. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, Vol 43(1), pp.369–400. Available at:
<https://cshmonographs.org/csh/index.php/monographs/article/view/3739>.

Yoshida, T. & Georgopoulos, K., 2014. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *International Journal of Hematology*, Vol 100(3), pp.220–229.

Zhou, F. et al., 2014. Ik6 expression provides a new strategy for the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Reports*, Vol 31(3), pp.1373–1379.