



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional de Occidente



Relación de la variante rs3817621 de *KLF1* con porcentaje de hemoglobina fetal y enfermedad mínima residual en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda

Protocolo de tesis para obtener el título de la Especialidad en
HEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

Dra. Brenda Juárez Mendoza

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Janet Margarita Soto Padilla

Guadalajara, Jalisco 2022



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.

IDENTIFICACIÓN DE AUTORES

ALUMNO (A)

Dr. Brenda Juárez Mendoza

Residente de segundo año de la subespecialidad en hematología pediátrica
UMAE, Hospital de Pediatría, CMNO
Av. Belisario Domínguez No. 735 Col. Independencia.
CP 44340, Guadalajara, Jalisco.

Matricula: 991454984

Teléfono: 3333247330

Correo electrónico: puccabren.brj@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Janet Margarita Soto Padilla,

MNF Hematología pediátrica UMAE, Hospital de Pediatría, CMNO
Av. Belisario Domínguez No. 735 Col. Independencia.
CP 44340, Guadalajara, Jalisco.

Matricula: 11415274

Teléfono: 333668300 ext.32696

Correo: sirenajanet@hotmail.com

ASESOR

Dra. en C. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre

División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente,
IMSS

Sierra Mojada 800 Col. Independencia.
CP 44340, Guadalajara, Jalisco.

Matricula: 31140328

Teléfono: 36 68 30 00 ext.31975

Correo: lourdes.rdl@gmail.com

ÍNDICE

I.	Resumen.....	4
II.	Marco Teórico y antecedentes.....	6
III.	Planteamiento del problema.....	13
IV.	Justificación.....	14
V.	Objetivos.....	15
VI.	Material y métodos.....	17
	a) Tipo de diseño.....	17
	b) Universo y lugar de trabajo.....	17
	c) Calculo muestral.....	17
	d) Criterios de selección.....	17
	e) Variables del estudio.....	19
	f) Definición de variables.....	19
	g) Desarrollo de estudio o procedimientos.....	20
	h) Procesamiento de datos y aspectos estadísticos.....	20
VII.	Aspectos éticos.....	21
VIII.	Recursos, financiamiento y factibilidad.....	23
IX.	Cronograma de actividades.....	24
X.	Referencias bibliográficas.....	25
XI.	Anexos.....	26

RESUMEN

Antecedentes: La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) puede definirse como un trastorno hematológico que deriva de la proliferación descontrolada de células inmaduras de linaje linfoide que afecta tanto a las células de linaje B como T, siendo el primero el más común. De los cánceres infantiles LLA representa más ~80% de estos.

Esta proliferación de blastos en la médula ósea conduce a un cuadro clínico heterogéneo, sin embargo, algunas de las manifestaciones pueden ser la aparición de moretones, fatiga, dolores de cabeza, y hasta en más del 50% de los casos organomegalia, El diagnóstico se basa, además de la evaluación de estas manifestaciones clínicas, en parámetros de la citometría hemática como la cuenta de leucocitos, siendo el aspirado de médula ósea la técnica que lleva a confirmar el diagnóstico con base en la cuenta de blastos presentes >25% y que también ayuda a la identificación morfológica del tipo celular involucrado.

La enfermedad mínima residual se refiere al número de células leucémicas que persisten en médula ósea después de la exposición al tratamiento, su relevancia clínica radica en que sirve como herramienta para evaluar la respuesta al mismo, así como evaluar la posibilidad de recaída. Representa un valor clave para evaluar la supervivencia a largo plazo con valores al final de la fase de inducción a la remisión menor a 0.001.

LA hemoglobina fetal, es el tipo de hemoglobina mayormente presente en etapas fetales que, de manera normal, desciende a por menos del 1.5% del total de las hemoglobinas durante el primer año de vida extrauterina, sin embargo, en ciertas circunstancias como en las neoplasias hematológicas esta puede incrementar, uno de los mecanismos encargados de regularla es la partición de factores de transcripción con *KLF1*, variantes en este gen interfieren con dicha regulación.

Evaluar si existe relación entre la presencia de variantes en este gen, el porcentaje de hemoglobina fetal y la enfermedad mínima residual podría ayudarnos a identificar si este tipo de hemoglobina tiene aplicación como potencial biomarcador en este grupo de pacientes.

Objetivo general: Identificar si hay relación entre la cantidad de hemoglobina fetal con la presencia de la variante rs3817621 al momento de análisis de enfermedad mínima residual en las fases de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento en pacientes pediátricos con LLA.

Objetivos específicos: Cuantificación de hemoglobina fetal al momento de diagnóstico, obtener valor de enfermedad mínima residual, Identificar la presencia de alelo menor de la variante rs3817621 de *KLF1*, analizar la relación del nivel de hemoglobina fetal con el genotipo presente y la enfermedad mínima residual en tres distintas fases del tratamiento.

Material y métodos: se propone un estudio de tipo longitudinal descriptivo en 20 pacientes pediátricos del Centro Médico Nacional de Occidente UMAE Hospital de Pediatría IMSS, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, en el periodo comprendido de enero 2022 a diciembre 2022. Se partirá de remanente de sangre para cuantificar el nivel de hemoglobina fetal por el método de Singer, se extraerá el DNA por la técnica DTAB/CTAB y se llevará a cabo la genotipificación de la variante rs3817621 por PCR en tiempo real con Sondas Taqman. El valor de la enfermedad mínima residual se obtendrá de los expedientes clínicos. Con los datos obtenidos se creará una base de datos en el software Excel del paquete de Microsoft Office 365®, el análisis estadístico se realizará en el programa IBM SPSS v20, se realizarán pruebas paramétricas (t Student o ANOVA) en el caso de que los datos se distribuyan de manera normal y pruebas no paramétricas como U de Mann Whitney o Kruskal Wallis en el caso de distribución no normal, se tomará como estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$.

Recursos e infraestructura: Se cuenta con los equipos e insumos necesarios para el desarrollo de pruebas bioquímicas y moleculares.

Experiencia del grupo: Todos los involucrados en el presente proyecto cuentan con experiencia en el ramo de la hematología pediátrica, así como en el área de genética.

Tiempo para desarrollarse: El presente proyecto se desarrollará dentro del periodo comprendido este enero 2022-diciembre 2022

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

Leucemias

Dentro de las leucemias se engloban diferentes enfermedades de la sangre, dependiendo del tipo de células afectadas, por un lado, se tienen las leucemias agudas que involucran a precursores (células inmaduras) consideradas prácticamente exclusivas de la etapa pediátrica, mientras que por el otro se tiene a las leucemias crónicas que involucran a células maduras y que se presentan en adultos alrededor de los 30 años¹.

Leucemia Linfoblástica Aguda

La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) puede definirse como un trastorno hematológico que deriva de la proliferación descontrolada de células inmaduras de linaje linfóide que afecta tanto a las células de linaje B como T, siendo el primero el más común². De los cánceres infantiles LLA representa más ~80% de estos³.

El desarrollo de LLA se ve influenciado por factores sociodemográficos como el sexo, afectando mayor número de niños, la edad también es un factor de interés siendo LLA-B más frecuente entre los 2-5 años de vida, así como el grupo humano al que pertenezcan habiendo una mayor incidencia en caucásicos e hispanos⁴.

Esta proliferación de blastos en la médula ósea conduce a un cuadro clínico heterogéneo, sin embargo, algunas de las manifestaciones pueden ser la aparición de hematomas, fatiga, cefalea y hasta en más del 50% de los casos organomegalia⁵. El diagnóstico se basa, además de la evaluación de estas manifestaciones clínicas, en parámetros de la citometría hemática como la cuenta de leucocitos, siendo el aspirado de médula ósea la técnica que lleva a confirmar el diagnóstico con base en la cuenta de blastos presentes >25% y que también ayuda a la identificación morfológica del tipo celular involucrado⁶.

Si bien en la última década la tasa de supervivencia ha incrementado a por encima del 90% la recaída sigue siendo uno de los grandes retos en este grupo de pacientes, por lo que previo a iniciar el tratamiento se establece el riesgo de la misma para cada individuo con base en la edad al momento del diagnóstico, la cuenta de leucocitos,

rearrreglos cromosómicos, si hay o no infiltración al sistema nervioso central (Cuadro 1) posterior a la fase de inducción mediante el valor de enfermedad mínima residual⁷⁻⁸.

Cuadro 1. Clasificación de riesgo para estratificar el tratamiento en pacientes con LLA

Criterio	Estándar (40%)	Alto (50%)	Muy alto (10%)
Edad	1-9 años	Pacientes que no cumplen con criterios para los grupos de riesgo estándar ni de muy alto riesgo, incluye a la mayoría de los pacientes con inmunofenotipo T	<1 año; >10 años
Cuenta de leucocitos	<50,000×µL		>100,000 x µL
Infiltración al SNC	No		Sí
Inmunofenotipo	Linaje B		Linaje T
Marcadores moleculares	<i>TEL/AML 1</i> (+) <i>BCR-ABL</i> (-) <i>E2A-PBX1</i> (-) <i>MLL</i> (-)		<i>BCR-ABL-Like</i> (+)
Alteraciones en el número de cromosomas por célula	Hiperdiploidía (51-65 cromosomas)		Hipodiploidía (31-39 cromosomas) o cuasi haploidía (24-30 cromosomas)
Respuesta temprana al tratamiento	Favorable		Desfavorable

Tomado y modificado de Pui et al, 2004⁷

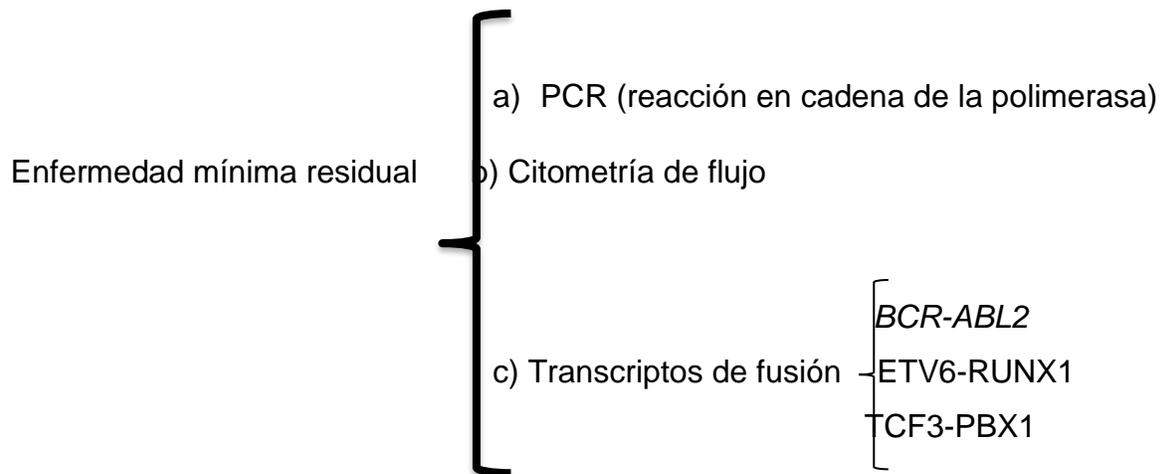
Enfermedad mínima residual

La enfermedad mínima residual se refiere al número de células leucémicas que persisten en médula ósea después de la exposición al tratamiento, su relevancia clínica radica en que sirve como herramienta para evaluar la respuesta al mismo, así como evaluar la posibilidad de recaída⁹.

Representa un valor clave para evaluar la sobrevida a largo plazo con valores al final de la fase de inducción a la remisión menor a 0.001¹⁰. En el caso de pacientes con

valores de enfermedad mínima residual por encima de 0.001 se recomienda modificar el régimen quimioterapéutico optando por uno intensivo, mientras que en el caso contrario se debería optar por limitar el uso de tratamientos intensivos innecesarios¹¹.

Para determinar el valor de la enfermedad mínima residual se pueden utilizar diferentes herramientas como



El objetivo de estas técnicas es identificar la presencia de secuencias específicas derivadas de rearrreglos presentes en la línea celular afectada, así como características inmunofenotípicas y genes de fusión, es importante considerar la sensibilidad de cada una de ellas: PCR, 0.01%-0.001%; Citometría de flujo, 0.01%, transcritos de fusión, 0.1%-0.001%¹².

Hemoglobina Fetal

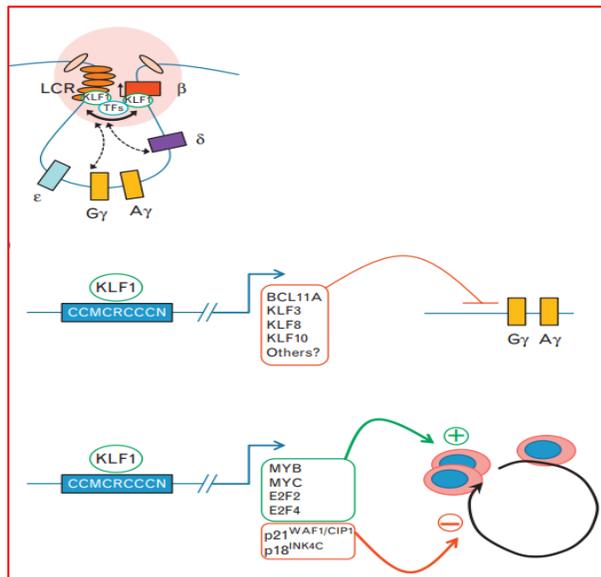
Dentro de los distintos tipos de hemoglobinas presentes a lo largo de la vida de un individuo la hemoglobina fetal (HbF), es la mayormente sintetizada en etapas fetales, se encuentra formada por la unión de dos cadenas globínicas de tipo alfa, codificadas por el gen homónimo ubicado en el cromosoma 16, y dos cadenas globínicas γ^G o γ^A codificadas por los genes globínicos *HBG2* y *HBG1* respectivamente, se sabe que en condiciones normales durante el primer año posterior al nacimiento esta decrece hasta menos del 1.5%¹³

Cerca del término de la gestación toma lugar un proceso conocido como *switching* que hace referencia al cambio “apagado” y “encendido” de genes globínicos no alfa, por un lado los genes gamma disminuyen su actividad transcripcional mientras que la del gen

β aumenta de manera inversamente proporcional dando lugar a la síntesis de hemoglobina adulta (HbA) compuesta por dos cadenas globínicas tipo alfa y dos tipo β , esto en parte gracias a la participación de factores de transcripción como *KLF1*¹⁴(Imagen 1).

KLF1 se localiza en 19p13.13 en orientación antisentido se compone de 2,782 bases, el factor de transcripción eritroide 1 tipo Krüppel es su producto funcional, el cual está formado 362 residuos, su expresión es meramente eritroide¹⁵. La proteína codificada por este gen presenta dos dominios de transactivación en el extremo N- terminal, así como tres dedos de zinc en el extremo C-terminal que tiene la capacidad de interactuar directamente con el DNA, específicamente en un motivo degenerado de nueve pares de bases (CCMCRCCCN, en el que M=C o A, R=A o G y N= cualquier base). Se sabe que *KLF1* regula la actividad de más de 650 genes eritropoyéticos¹⁶

Imagen 1. Participación de *KLF1* en silenciamiento de genes y



Tomada y modificada de Tallack *et al*, 2013.¹⁷

Una de las formas en las que se regula la expresión génica es por la presencia de variantes genéticas (alelos) en *cis*¹⁸, la actividad de *KLF1* no es la excepción ya que se han identificado distintas variantes de un solo nucleótido, mediante análisis de

asociación (GWAS), que modifican tanto la actividad del propio gen, como de su producto funcional¹⁹.

KLF1 como regulador del nivel de hemoglobina fetal

Mediante la implementación de modelos animales, como es el uso de ratones transgénicos en lo que se ha insertado una copia del gen *KLF1* humano se ha ido demostrando el papel de KLF1 en el *Switching* de β a γ globinas (Por ende, al cambio de HbA a HbF)²⁰. Se han descrito tres diferentes formas de acción mediante las cuales KLF1 participa en la regulación de la síntesis de γ globinas: interactuando con la cromatina y ayudando a remodelarla hacia una configuración “adulto”; activando a otros factores de transcripción que silencian a los genes globinicos gamma, como es el caso de BCL11A y mediante la estimulación de la actividad de MYB, encargado de regular el ciclo celular eritroide llevando a la formación de mormoncitos¹⁷.

Hemoglobina Fetal en neoplasias hematológicas

En distintas enfermedades de la sangre como la betatalasemia y anemia de células falciformes un nivel de Hemoglobina fetal elevado representa un factor terapéutico, ya que la síntesis de γ globinas sustituye la deficiencia ocasionada por la disminución de la correcta actividad del gen β , disminuyendo el cuadro patológico²¹.

En el caso de neoplasias hematológicas la hemoglobina fetal ha sido descrita como factor de buen pronóstico, específicamente en la leucemia mieloide crónica en la que uno de los tratamientos utilizados, se basa en agentes hipometilantes, la elevación de esta hemoglobina previo al tratamiento indica ya un estado de hipometilación que favorece la respuesta a estos medicamentos²². Contrario a lo reportado en leucemia linfoblástica aguda enfermedad en la que se ha reportado como hallazgo el incremento de hemoglobina fetal, e incluso se le ha asociado a factores de mal pronóstico como la edad al momento de diagnóstico y la presencia de organomegalia²³⁻²⁴.

ANTECEDENTES

Arámbula-Villalobos y colaboradores reportaron en por primera vez en 1993 en 60 pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica del occidente de México la variación en el porcentaje de hemoglobina fetal, compararon el mismo entre en estos niños y un grupo de referencia encontrando que se presentaba un nivel mayor en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda con un $p=0.001$ ²⁵.

En 2015 Mallick y colaboradores realizaron un trabajo en el que se incluyeron pacientes pediátricos con distintas neoplasias como leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Hodking y leucemia mieloide aguda, encontraron que el grupo con nivel mayor de hemoglobina fetal era el de leucemia linfoblástica aguda y que este parámetro se asociaba a factores pronóstico como infiltración a sistema nervioso central y la presencia de organomegalia²⁴.

Estudios como el de Gnanapragasa han reportado la asociación de la presencia de variantes de un solo nucleótido de *KLF1* con variaciones del perfil hematológico de pacientes con distintas neoplasias , ya que cambios en los residuos que constituyen la proteína interfiere con las interacciones con otras moléculas necesarias para regular mecanismos como la diferenciación y maduración eritrocitaria, respecto al SNV rs3817621 ha relacionado a variación de variables como el conteo de reticulocitos y de hemoglobina fetal²⁶

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En pacientes pediátricos mexicanos con leucemia linfoblástica aguda ha reportado un nivel variable de hemoglobina fetal, sin embargo, no se ha establecido el tipo de relación que guarda con la evolución del paciente, mientras que en otros países como India se le ha relacionado con mal pronóstico. La enfermedad mínima residual es una herramienta invasiva ampliamente utilizada para evaluar la respuesta al tratamiento, que se basa en el conteo de células leucémicas, así como la identificación de rearrreglos cromosómicos al final de cada fase del tratamiento. Por lo que estudiar los valores de enfermedad mínima residual durante las distintas fases del tratamiento e identificar su potencial relación con el nivel de hemoglobina fetal y la variante rs3817621 del gen *KLF1* podría ayudar a establecer a la misma como un factor pronóstico para este grupo de pacientes y de esta manera dirigir adecuadamente la intensidad del tratamiento.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial más del 80% de los cánceres infantiles corresponden a leucemia linfoblástica aguda, el panorama en México no es distinto. Este tipo de leucemia es una neoplasia hematológica, que deriva en gran parte de la presencia de modificaciones cromosómicas estructurales, de espectro clínico variable. Si bien más del 80% de los pacientes bajo manejo logran entrar a fase de vigilancia, de estos alrededor del 15% sufre recaída lo que a la fecha representa un reto para los médicos tratantes, por lo que estudiar los valores de enfermedad mínima residual durante las distintas fases del tratamiento e identificar su potencial relación con el nivel de hemoglobina fetal y la variante rs3817621 del gen *KLF1* podría ayudar a establecer a la misma como un factor pronóstico para este grupo de pacientes y de esta manera dirigir adecuadamente la intensidad del tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar si hay relación entre la cantidad de hemoglobina fetal con la presencia de la variante rs3817621 al momento de análisis de enfermedad mínima residual en las fases de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento en pacientes pediátricos con LLA.

Objetivos particulares

1. Cuantificación de hemoglobina fetal al momento de diagnóstico
2. Obtener valor de enfermedad mínima residual
3. Identificar la presencia de alelo menor de la variante rs3817621 de *KLF1*
4. Analizar la relación del nivel de hemoglobina fetal con el genotipo presente y la enfermedad mínima residual en tres distintas fases del tratamiento.

HIPÓTESIS

La presencia del alelo polimórfico rs3817621 de *KLF1* se relaciona con el nivel de HbF y enfermedad mínima residual en fases de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento en pacientes pediátricos con LLA.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio

Longitudinal descriptivo

Universo de Estudio

Pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda del Hematología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social de Noviembre del 2021 a junio del 2022.

Tamaño de muestra

Se cálculo mediante *Openepi* el tamaño de muestra tomando en cuenta la frecuencia (0.21) del alelo menor del rs3817621 del gen *KLF1* y un estimado de 120 pacientes por año que ingresan al servicio de hematología pediátrica con la siguiente formula:

$$n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p))]$$

obteniendo un número de 12 individuos. Sin embargo, para este estudio se pretende incluir al menos 20 pacientes.

Criterios de Inclusión

Pacientes pediátricos (menores a 17 años, 11 meses) del servicio de hematología pediátrica del Centro Médico Nacional de Occidente con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

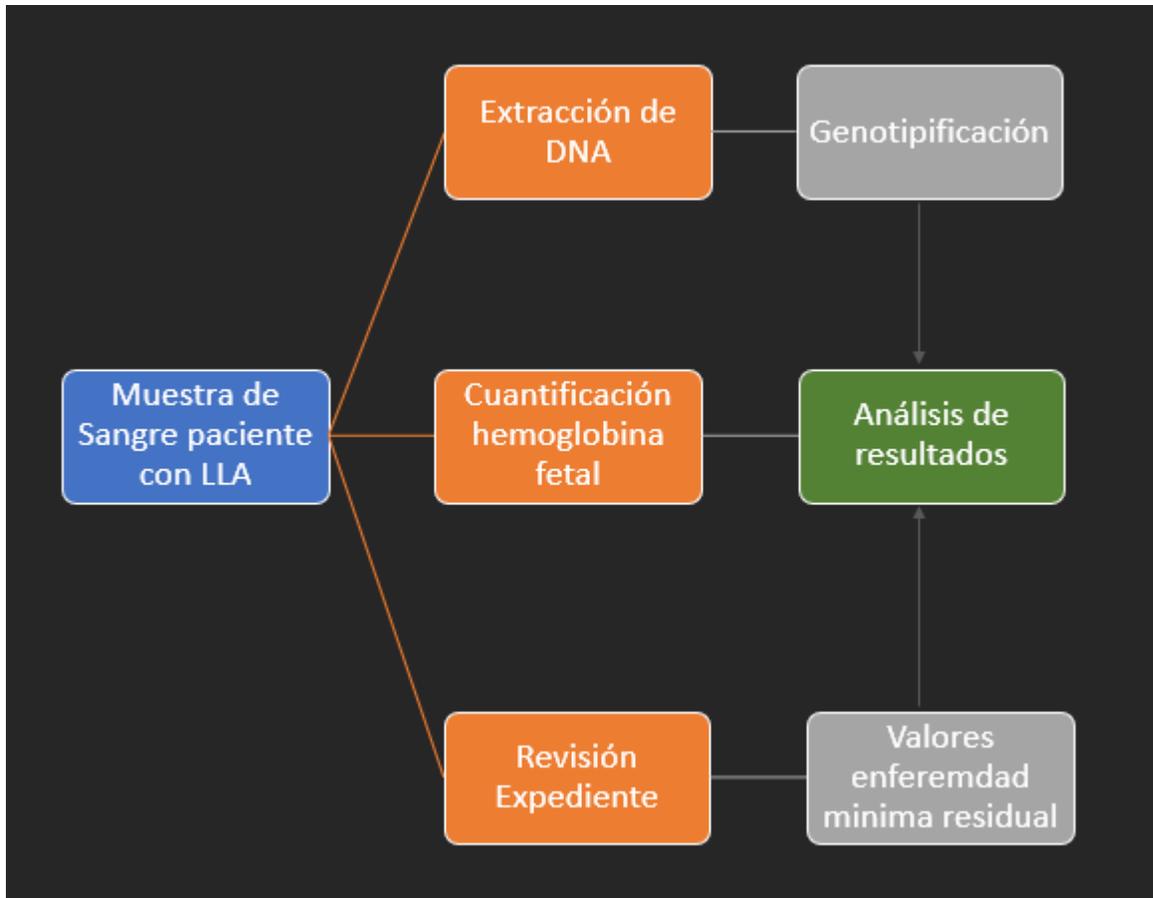
Criterios de Exclusión

Pacientes que presenten otra alteración hematológica, como beta talasemia y anemia de células falciformes.

Criterios de Eliminación:

Pacientes cuya muestra se degrade o termine y no sea posible coleccionarla nuevamente.

Diagrama de Flujo



Cuadro de Variables

Variable	Clasificación	Indicador	Escala de medición	Estadístico
Presencia de alelos menores	Independiente	Presencia de alelos polimórficos	Nominal	Porcentajes, frecuencias, χ^2 , exacta de Fischer
Porcentaje de HbF	Dependiente	%	Continua	Medias, DE; t de Student, U de Mann-Whitney
Aumento de HbF	Dependiente	>2.5%	Nominal	Porcentajes, frecuencias, χ^2 , exacta de Fischer
Enfermedad mínima residual	Independiente	%	Nominal	Porcentajes, frecuencias, χ^2 , exacta de Fischer

DESARROLLO DEL ESTUDIO Y PROCEDIMIENTOS

Una vez captado el paciente, a partir remanente de muestra sanguínea, se realizará:

- a) Se colecta el remanente de la muestra utilizada para el estudio de gabinete del paciente
- b) Se genera folios consecutivos para la base de datos, de manera que sea anónima la información del paciente
- c) El nivel de hemoglobina fetal por la técnica de Singer (Anexo1).
- d) Extracción de DNA por el método de DTAB/CTBA (Anexo 2).
- e) se llevará a cabo la genotipificación mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas Taqman® (Anexo 3).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La base de datos se realiza en el programa Excel (Microsoft Office 365 2019) y el análisis de resultados mediante el paquete estadístico IBM SPSS v22.0. Se realizan pruebas paramétricas (t de Student o ANOVA) para aquellos datos que se distribuyen de manera normal mediante la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov; y pruebas no paramétricas cuando los datos se distribuyen de manera no normal (χ^2 , U de Mann Whitney o Kruskal Wallis) para determinar la relación entre las variables. Para realizar la asociación entre la presencia de las variantes y el porcentaje de HbF se utiliza análisis de regresión logística. Se toman como estadísticamente significantes los valores de $p < 0.05$.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente trabajo se apega al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a la Declaración de Helsinki de 1975 de la Asociación Médica Mundial Sobre Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos en su séptima revisión celebrada en Fortaleza, Brasil, en octubre de 2013 y sus enmiendas, así como a los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica.

En conformidad al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título segundo de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos. Capítulo I. Artículo 17. En su última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de abril de 2014. Se considera investigación de **sin riesgo** ya que se utilizará el remanente de la muestra sanguínea utilizada por el médico tratante al momento del diagnóstico y consecuente seguimiento del paciente.

Aspectos de Bioseguridad

Debido a la utilización de muestras sanguíneas para los análisis planteados, el presente trabajo se apegará a la Ley de Salud del Estado de Jalisco, Capítulo II que establece el manejo de sangre, componentes sanguíneos, células progenitoras hematopoyéticas y hemoderivados.

Así como a lo establecido en las NOM-052-SEMARNAT-2005 para el manejo de residuos químicos, NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y NOM-054-SEMARNAT-199.

Todos los involucrados en el presente proyecto recibirán la capacitación adecuada para manipular las muestras y reactivos utilizados en el presente trabajo. El proyecto de investigación se llevará a cabo de acuerdo con lo que establece la Ley General de Salud y el Reglamento de la Ley General en Salud en Materia de Investigación para la Salud.

De acuerdo con lo que establece la Norma Oficial Mexicana 087 (NOM-087-SEMARNAT- SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico- infecciosos – clasificación y especificaciones de manejo) el presente proyecto tiene implicaciones de bioseguridad ya que se trabajará con ADN extraído de sangre periférica humana.

Las muestras obtenidas se identificarán con un folio consecutivo y posteriormente serán almacenadas a 4°C por un tiempo no mayor a 48 horas desde su llegada, posteriormente se procederá a realizar la extracción de ADN. Los residuos generados por la extracción de ADN serán aproximadamente 50 mL de eritrocitos lisados con NH_4HCO_3 y NH_4Cl en proporción 10:1 y posteriormente inactivados con hipoclorito de sodio al 6% y desechados en un contenedor rígido hermético color rojo para líquidos. Los productos de PCR o derivados de otras técnicas moleculares utilizadas en el desarrollo de este proyecto serán almacenados en congelación a -20°C hasta concluir el análisis final de resultados, posteriormente serán desechados en una bolsa de polietileno color rojo. De igual manera los geles de agarosa y utilizados en electroforesis serán inactivados con carbón activado y posteriormente desechados en una bolsa de polietileno color rojo.

El manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos se realizará con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana 087 (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos clasificación y especificaciones de manejo) y el Manual de procedimientos para el manejo y control de residuos Biológico-Infecciosos y Tóxico-Peligrosos en Unidades de Atención Médica del I.M.S.S. (1996).

RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Humanos

Dra. Janet Margarita Soto Padilla, se encarga de capacitar acerca de diagnóstico de la enfermedad, así como los momentos relevantes según el protocolo de quimioterapia para la toma de enfermedad mínima residual.

Dra. Brenda Juárez Mendoza, residente de hematología pediátrica; redacción de documento, recolección de muestras y datos clínicos de pacientes, así como trabajo experimental y análisis de resultados.

Dra. en C. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre; asesoría metodológica y experimental.

Materiales

La infraestructura para la cuantificación de hemoglobina fetal en el laboratorio de genética 2 del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, mediante la técnica de Singer para la cual se tiene los reactivos necesarios: Tubos de vidrio, agua desmineralizada, hidróxido de Sodio, y sulfato de amonio, así como equipo de espectrofotometría.

Se cuenta también con insumos para llevar a cabo la extracción de DNA mediante la técnica de DTAB/CTAB; tubos *ependorf*; reactivos: buffer de lisis de eritrocitos, DTAB, cloroformo, CTAB, cloruro de sodio, agua destilada, alcohol puro; equipos; centrifuga, termoblock.

Para la genotipificación se tiene el sistema de tiempo real 7500 de Applied Biosystems® así como las sondas Taqman® para detectar la variante genética de interés.

Financiamiento o recursos financieros

No se requiere financiamiento externo, todo el material requerido será proporcionado por los investigadores participantes y encargados de este.

Infraestructura

Se cuenta en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional de Occidente con el personal hospitalario a evaluar de quienes se obtendrán los datos para la revisión y análisis de resultados.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	enero febrero	marzo abril	mayo junio	julio agosto	septiembre octubre	noviembre diciembre
Actividades						
Revisión bibliográfica						
Elaboración de protocolo						
Registro de proyecto						
Captación de pacientes						
Cuantificación Hemoglobina Fetal						
Extracción de DNA						
Genotipificación						
Interpretación de resultados						

BIBLIOGRAFÍA

1. Juliusson y Hough, 2016
2. Onciu, M. (2009). Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 23(4), 655-674
3. Alexander, T. B., & Mullighan, C. G. (2021). Molecular Biology of Childhood Leukemia. *Annual Review of Cancer Biology*, 5, 95-117
4. Madhusoodhan, P. P., Carroll, W. L., & Bhatla, T. (2016). Progress and prospects in pediatric leukemia. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, 46(7), 229-241
5. Chang, J. H. C., Poppe, M. M., Hua, C. H., Marcus, K. J., & Esiashvili, N. (2021). Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 68, e28371
6. Kato, M., & Manabe, A. (2018). Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International*, 60(1), 4-12
7. Pui, C. H., Relling, M. V., Sandlund, J. T., Downing, J. R., Campana, D., Evans, W.E. (2004). Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Annals of Hematology*, 83, S124-6
8. Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. J. B. C. J. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6), e577-e577.
9. Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H. N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H., ... & Kim, Y. M. (2020). Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1054
10. Puyó y Sanjuán, 2021
11. González et al. 2011
12. Cárdenas y Gutierrez, 2018
13. Manca, L., & Masala, B. (2008). Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB life*, 60(2), 94-111
14. Laurentino, M. R., Barbosa, M. C., Santos, T. E. J., Perdigão, A. C. B., Araújo, F., Lemes, R. P. (2018). Analysis of BCL11A gene polymorphisms and hemolysis parameters in patients with sickle-cell disease. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 54(3), 132-137

15. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, and Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis, *Current Protocols in Bioinformatics* (2016), 54:1.30.1 - 1.30.33
16. Fraser, N. S., Knauth, C. M., Moussa, A., Dean, M. M., Hyland, C. A., Perkins, A. C., Schoeman, E. M. (2019). Genetic Variants Within the Erythroid Transcription Factor, KLF1, and Reduction of the Expression of Lutheran and Other Blood Group Antigens: Review of the in (Lu) Phenotype. *Transfusion medicine reviews*, 33(2), 111-117
17. Tallack, M. R., & Perkins, A. C. (2013). Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching. *Current opinion in hematology*, 20(3), 193-200
18. Signor, S. A., & Nuzhdin, S. V. (2018). The evolution of gene expression in cis and trans. *Trends in Genetics*, 34(7), 532-544
19. Tumburu, L., & Thein, S. L. (2017). Genetic control of erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 24(3), 173-182
20. Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, et al. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res* 2010; 20:1052–1063.
21. Lettre, G., Bauer, D. E. (2016). Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. *The Lancet*, 387(10037), 2554–2564
22. Press, K. R., Uy, N., Keefer, J., Gore, S. D., Carraway, H. E., Sakoian, S., Prebet, T. (2017). Clinical evaluation of combined azacitidine and entinostat on the induction of fetal hemoglobin in patients with acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*, 59(3), 755-757
23. Ibarra 1991
24. Mallick, D., Karmakar, R., Barui, G., Gon, S., Chakrabarti, S. (2015). The Prognostic Significance of HbF in Childhood Haematological Malignancies. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 31(1), 116-120
25. Villalobos-Arambula, A. R., Aguilar-Luna, J. C., Esparza, A., Perea, F. J., de Loza, R., Hernandez-Cordova, A., & Ibarra, B. (1993). Fetal hemoglobin and the

gamma G/gamma A chain ratio in children with acute lymphoblastic leukemia L1 and L2. *Sangre*, 38(1), 31-35.

26. Gnanapragasam, M. N., Crispino, J. D., Ali, A. M., Weinberg, R., Hoffman, R., Raza, A., & Bieker, J. J. (2018). Survey and evaluation of mutations in the human KLF1 transcription unit. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.

Anexo 1 CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA FETAL POR MÉTODO DE SINGER

La hemoglobina Fetal es más resistente a la desnaturalización por hidróxido que el resto de las hemoglobinas. Bajo las condiciones del ensayo, el hidróxido convierte a las hemoglobinas sensibles a una hematina alcalina en un minuto. La desnaturalización se prepara por la adición de sulfato de amonio que disminuye el pH y precipita la hemoglobina desnaturalizada; la HbF, al ser resistente a esta desnaturalización, es posible cuantificarla por espectrofotometría.

Preparación del Hemolizado

- Tomar 2mL de sangre total, centrifugar a 1,500 rpm por 3 minutos, retirar plasma y capa de células blancas con pipeta pasteur.
- Lavar los glóbulos rojos con solución salina isotónica, 3 veces a 2,500 rpm por 3 minutos cada vez.
- Al volumen de células lavadas empaquetadas, adicionar igual volumen de agua destilada y agitar en vórtex por 1 minuto.
- Adicionar por cada mL de células empaquetadas obtenidas 0.4 mL de CHCL₃. Agitar en vórtex por 1 minuto y centrifugar a 5,000 rpm durante 15 minutos.
- El hemolizado es el sobrenadante, recuperarlo en un nuevo tubo y descartar pellet.

Metodología

- Colocar en tubo de 1.6 mL de NaOH o KOH, manteniendo los tubos a una temperatura de 200C.
- Adicionar 0.1 mL de hemolizado, poniendo, al mismo tiempo, a andar el cronómetro.
- Se agita el tubo durante 20s y 40s más tarde se agregan 3.4 mL de (NH₄)₂SO₄.
- Se agita y a los 30s de reposo se filtra en papel filtro Whatman No. 3
- Se debe realizar la cuantificación por duplicado para cada muestra.
- Para la cuantificación de la hemoglobina total se colocan 5 mL de agua destilada y 0.02 mL del hemolizado.
- Concentración de hemoglobina fetal:
- 1-2 % (adultos) 70-90% (recién nacidos)

ANEXO 2 EXTRACCIÓN DE DNA

Micro método DTAB/CTAB

La extracción de DNA es una técnica utilizada para aislar el ácido desoxirribonucleico del interior de la célula, la cual se requiere ser lisada para obtener dicha molécula de interés.

A 3 mL se muestra sobrante de médula ósea se le agregan de 2 a 3 veces el volumen de solución de lisis de leucocitos y se deja incubar por 20 minutos a 4 °C

Posteriormente se agita y se centrifuga por 20 min/7500 rpm/4 °C.

Se descarta el sobrenadante y se recupera el botón de leucocitos al que se le agregan 600 µL de DTAB y se deja en baño maría a 68 °C por 5 minutos.

A continuación, se agita hasta desvanecer el botón y se agregan 900 µL de Cloroformo, se agita mecánicamente por 5 minutos. Al finalizar se centrifuga a 10,000 rpm/10 minutos, se recupera la fase acuosa, que contiene el DNA, se le agregan 150 µL de CTAB más 900 µL de agua bidestilada, se agita por 2 minutos o hasta precipitar el DNA.

Se centrifuga a 10,000 rpm/10 minutos, se descarta el sobrenadante; se agregan 150 µL de NaCl a 1.2M más 750 µL de etanol frío al 100%, se agita y se centrifuga a 10,000 rpm/10 minutos. Se descarta el sobrenadante.

Se colocan 1000 µL de alcohol frío al 70% y se centrifuga a 10,000 rpm/5 minutos, se descarta sobrenadante y se repite este paso.

Se deja evaporar el alcohol por 24 hrs.

Finalmente se disuelve en 200 µL de TE a 37 °C.

ANEXO 3 GENOTIPIFICACIÓN

PCR tiempo real

Para la detección de las variantes de un solo nucleótido se utilizará la tecnología TaqMan de Thermo Fisher, la cual consiste en el uso de sondas que contienen un fluorocromo en el extremo 5' y un quencher (el cuál actúa como bloqueador de la fluorescencia) en el extremo 3' de la sonda.

Si durante la reacción en cadena de la polimerasa, esta sonda encuentra una región complementaria para hibridar la DNA polimerasa remueve al quencher del extremo 3' permitiendo la emisión de luz, la cual sirve de indicador de la presencia de la variante a buscar.

Metodología

Se coloca el DNA genómico en una reacción que incluye un Máster mix de genotipificación Taqman® con cebadores *forward* y *reverse*, así como dos Sondas MGB Taqman®

Cada sonda reconoce una secuencia complementaria, de estar presente, entre las regiones flanqueadas por los cebadores, cuando la sonda no ha hibridado la proximidad del apantallador suprime la fluorescencia del reportero.

Cuando la sonda hibrida con la secuencia diana, la actividad exonucleasa de la polimerasa AmpliTaq Gold® escinde al apantallador aumentando la fluorescencia del reportero, por lo que esta señal surgida durante la reacción de PCR indica la presencia del alelo de interés en la muestra.

ANEXO 4 CARTA DE DISPENSA DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

DIRIGIDA A: Comité de Ética en Investigación

Dra. Ana Bertha Rodríguez López

PRESIDENTE

Dra. Elizabeth Arce Mójica

SECRETARIO

1. IDENTIFICACION DEL ESTUDIO:

- **Título del estudio:** RELACIÓN DE LA VARIANTE RS3817621 DE KLF1 CON PORCENTAJE DE HEMOGLOBINA FETAL Y ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL
- **Investigador Responsable:** Dra. Janet Margarita Soto Padilla
- **Tesista:** Dra. Brenda Juárez Mendoza
- **Unidad/Departamento/Servicio:** UMAE Pediatría Centro Médico Nacional de Occidente, Servicio de Hematología Pediátrica

2. JUSTIFICACION DE LA DISPENSA

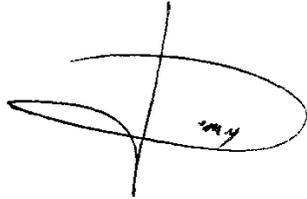
Por medio de la presente se solicita al Comité de Ética en Investigación y al Comité Local de Investigación en Salud 1302 del Hospital de Pediatría CMNO la dispensa de la carta de consentimiento informado dadas las siguientes condiciones:

La investigación no sería viable sin la exención de la carta de consentimiento informado.

El presente estudio tiene un valor social importante y de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Art. 17) esta investigación se clasifica dentro de la categoría sin riesgo, ya que se trata de un estudio longitudinal descriptivo y comprende un amplio periodo de tiempo, donde se obtendrán por medio de remanentes de muestras sanguíneas, lo mínimo necesario para cuantificación de hemoglobina fetal (tres mililitros). Se utilizará base datos por el área de genética del Centro de Investigación Biomédica de Occidente

En cuanto al procedimiento para la obtención de muestra para medición de enfermedad mínima residual se realiza en todos los pacientes del Centro Médico

Nacional de Occidente con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda como parte del protocolo de tratamiento, dicho valor se obtendrá de cada expediente clínico. No se identificarán a los pacientes por nombre, las muestras obtenidas se foliarán con número consecutivo, correlacionadas con porcentaje de enfermedad mínima residual. De manera que el estudio NO contiene datos de carácter personal que permita identificar a los pacientes.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop on the left and a vertical line on the right that crosses the loop. The initials "J.M.P." are visible within the loop.

Dra. Janet Margarita Soto Padilla
Investigador responsable

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized loop on the left and a vertical line on the right that crosses the loop. The initials "B.J.M." are visible within the loop.

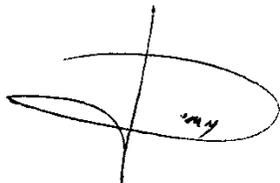
Dra. Brenda Juárez Mendoza
Tesista

ANEXO 5. CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Guadalajara, Jalisco, enero 2022.

El. C Janet Margarita Soto Padilla, investigador responsable del proyecto titulado “Relación de la variante rs3817621 de *KLF1* con porcentaje de hemoglobina fetal y enfermedad mínima residual”, con domicilio ubicado en Av. Belisario Domínguez No. 735, Colonia Independencia CP 44340. Guadalajara, Jalisco; a 1 de enero del 2022, me comprometo a resguardar, mantener la confidencialidad y no hacer mal uso de los documentos, expedientes, reportes, estudios, actas, resoluciones, oficios, correspondencia, acuerdos, directivas, directrices, circulares, contratos, convenios, instructivos, notas, memorandos, archivos físicos y/o electrónicos, estadísticas o bien, cualquier otro registro o información que documente el ejercicio de las facultades para la evaluación de los protocolos de investigación a que tena acceso en mi carácter investigador responsable, así como a no difundir, distribuir o comercializar con los datos personales contenidos en los sistemas de información, desarrollados en el ejercicio de mis funciones como investigador responsable.

Estando en conocimiento de que en caso de no dar cumplimiento se estará acorde a la sanciones civiles, penales o administrativas que procedan de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y el Código Penal del Estado de Jalisco, a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y demás disposiciones aplicables en la materia.



Acepto,

Dra. Janet Margarita Soto Padilla.

Investigador Responsable