



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DEL
RECEPTOR DE MOTILIDAD MEDIADO POR ÁCIDO HIALURÓNICO (HMMR)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B RAMÍREZ CHIQUITO JOSSELEN CARINA

TUTOR PRINCIPAL: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN
INMEGEN

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DEL
RECEPTOR DE MOTILIDAD MEDIADO POR ÁCIDO HIALURÓNICO (HMMR)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B RAMÍREZ CHIQUITO JOSSELEN CARINA

TUTOR PRINCIPAL: DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN
INMEGEN

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1076/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **26 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **RAMÍREZ CHIQUITO JOSSELEN CARINA** con número de cuenta **311334791** con la tesis titulada **“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LAS VARIANTES DEL RECEPTOR DE MOTILIDAD MEDIADO POR ÁCIDO HIALURÓNICO (HMMR)”**, realizada bajo la dirección del **DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO
Vocal: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
Vocal: DR. FABIÁN ARECHAVALETA VELASCO
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de México por permitirme realizar mis estudios de maestría y seguir formándome como una profesional dedicada al progreso de la ciencia y su aplicación en nuestro país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios (CVU: 1018273) y por el financiamiento del proyecto de investigación: "Identificación de variantes de RNA mensajero como marcadores de pronóstico temprano en pacientes con leucemia" (272633).

A mi tutor principal, el Dr. Sergio Juárez Méndez, por su guía y motivación para la realización de este proyecto, también por la confianza y el apoyo otorgado para mi crecimiento profesional.

A las doctoras Marcela Lizano Soberón y Karla I. Vázquez Santillán, miembros del comité tutor, por su disposición y apoyo, así como críticas y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, a mi madre Teresa por su acompañamiento paciente y amoroso en este periodo, su comprensión y motivación, eres inspiración.

A mi hermano José por apoyarme en momentos difíciles y cotidianos, desde prepararme el desayuno en un día atareado hasta abrazarme y aconsejarme en situaciones vulnerables.

A mi hermano Rodrigo por involucrarse y escucharme numerosas veces en las versiones de este proyecto, ayudarme a estudiar y por ser un estímulo y acompañante en este mundo de la ciencia.

Finalmente, a las doctoras y doctores que conforman el Jurado: Dra. Laura Díaz, Dra. Patricia Piña, Dra. Marcela Lizano, Dr. Fabián Arechavaleta y Dr. Alejandro Zentella, por sus comentarios y observaciones que hicieron de este un mejor proyecto.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Cáncer.....	3
3.1.1 Leucemia	4
3.1.2 Leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B).....	5
3.2 Corte y empalme del RNA mensajero (<i>splicing</i>)	8
3.2.1 Mecanismo catalítico del empalme	11
3.2.2 Regulación del empalme.....	12
3.2.3 Empalme alternativo y cáncer	15
3.3 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (HMMR)	20
3.3.1 Funciones celulares de HMMR	21
3.3.2 Empalme alternativo de <i>HMMR</i>	22
3.3.3. HMMR en cáncer	23
4. JUSTIFICACIÓN	30
5. HIPÓTESIS	31
6. OBJETIVOS	31
6.1 Objetivo general.....	31
6.2 Objetivos particulares.....	31
7. METODOLOGÍA	32
7.1 Análisis <i>in silico</i> de expresión diferencial en recaída de LLA-B	32
7.2 Material biológico	34
7.3 Cultivo celular	35
7.4 Extracción de RNA de línea celular.....	35
7.5 Síntesis de DNA complementario.....	35
7.6 PCR en punto final.....	36
7.7 qRT-PCR	36

7.8 Análisis estadístico	38
8. RESULTADOS	39
8.1 Análisis <i>in silico</i> de datos de expresión en recaída de LLA-B: <i>HMMR</i> se sobre- expresa en la recaída de LLA-B pediátrica	39
8.2 Evaluación del DNA complementario sintetizado a partir de muestras de LLA-B pediátrica y controles	45
8.3 Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la cuantificación relativa por PCR en tiempo real para las variantes de <i>HMMR</i>	46
8.4 Las variantes <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> se sobre-expresan en LLA-B	51
8.5 La expresión de <i>HMMRV1</i> se relaciona con la mortalidad en la LLA-B mientras que, la expresión de <i>HMMRV3</i> se relaciona con la recaída	53
8.6 La baja expresión de <i>HMMRV2</i> y alta expresión de <i>HMMRV3</i> se relacionan con una menor supervivencia en la LLA-B.	54
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
10. CONCLUSIONES	65
11. PERSPECTIVAS	65
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO DE EXPERIMENTOS	74
Anexo 1. Evaluación de cDNA SUPB-15	74
Anexo 2. Curvas de amplificación y disociación para los genes cuantificados por PCR en tiempo real.....	74

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Características del cáncer.....	4
Figura 2. Alteraciones genéticas y moleculares en la LLA-B.....	8
Figura 3. Clasificación del empalme.....	10
Figura 4. Mecanismo catalítico del empalme.....	12
Figura 5. Regulación del empalme alternativo.....	13
Figura 6. Eventos dependientes del contexto, que regulan el empalme.....	14
Figura 7. Expresión diferencial de factores de empalme en 11 tipos de cáncer.....	16
Figura 8. Empalme alternativo aberrante y la biología del cáncer.....	17
Figura 9. Patrones de empalme aberrante de genes involucrados en la biología del cáncer.....	18
Figura 10. Localización genómica y predicción de la estructura proteica de HMMR.....	20
Figura 11. Funciones celulares de HMMR.....	21
Figura 12. Empalme alternativo del gen humano <i>HMMR</i>	23
Figura 13. Expresión de HMMR (RNAm y proteína) en condiciones fisiológicas normales.....	24
Figura 14. Expresión de HMMR (RNAm) en cáncer y condiciones fisiológicas normales.....	25
Figura 15. Expresión de HMMR: RNAm y proteína en condiciones normales y en cáncer.....	27
Figura 16. Curvas de supervivencia para la expresión de <i>HMMR</i> en leucemia mieloide aguda (LAML) y leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B).....	28
Figura 17. Diagrama metodológico.....	32
Figura 18. Gráficos de control de calidad antes y después de la normalización.....	40
Figura 19. Análisis de expresión diferencial en la recaída de LLA-B pediátrica.....	41
Figura 20. Redes de interacción de DEGs anotados funcionalmente en recaída de LLA-B.....	44
Figura 21. Evaluación del DNA complementario sintetizado a partir de muestras de LLA-B pediátrica e individuos control.....	45
Figura 22. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la cuantificación de <i>HMMRV1</i> por PCR en tiempo real.....	47
Figura 23. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la cuantificación de <i>HMMRV2</i> por PCR en tiempo real.....	48
Figura 24. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la cuantificación de <i>HMMRV3</i> por PCR en tiempo real.....	49
Figura 25. Curvas de validación para la cuantificación de <i>HMMRV4</i> por PCR en tiempo real.....	50
Figura 26. Expresión relativa de las variantes uno, dos y tres de <i>HMMR</i> en muestras de pacientes con LLA-B y controles.....	51
Figura 27. Análisis de correlación para la expresión de las variantes <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en muestras de pacientes con LLA-B.....	52
Figura 28. Expresión relativa de <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en muestras de pacientes con LLA-B vivos y fallecidos.....	53

Figura 29. Expresión relativa de <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en muestras de pacientes con LLA-B con y sin recaída.....	54
Figura 30. Curvas ROC y Kaplan Meier para la expresión de <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en muestras de LLA-B.....	55
Figura 31. Curvas ROC y Kaplan Meier para la expresión de <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en la recaída de LLA-B.....	56
Figura 32. Potenciales funciones de las variantes <i>HMMRV1</i> , <i>HMMRV2</i> y <i>HMMRV3</i> en la LLA-B.....	64
Tabla 1. Genes y sus funciones, cuyas alteraciones se asocian con la leucemogénesis ..	7
Tabla 2. Criterios para la minería de datos en bases de datos públicas (ArrayExpress y GEO).....	33
Tabla 3. Características de los pacientes con LLA-B incluidos en la cuantificación de las variantes de <i>HMMR</i>	34
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la cuantificación relativa de las variantes de <i>HMMR</i> por qRT-PCR	37
Tabla 5. Anotación funcional de los DEGs en recaída de LLA-B infantil	42
Tabla 6. Comparación entre los resultados estadísticos obtenidos con la evaluación de <i>HMMR</i> y las variantes de <i>HMMR</i>	63

ABREVIATURAS

AUC	<i>Area Under Curve</i>
BS	Secuencia de ramificación
cDNA	DNA complementario
CGAP	<i>Cancer Genome Atlas Project</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DEGs	Genes Expresados Diferencialmente
E	Especificidad
ESEs	Secuencia Potenciadora Exónica
ESSs	Secuencia silenciadora Exónica
FDR	False Discovery Rate
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GEPIA	<i>Gene Expression Profiling Interactive Analysis</i>
hNRPs	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
HA	Ácido hialurónico
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de Confianza
IY	Índice de Youden
INP	Instituto Nacional de Pediatría
ISEs	Secuenciadora Potenciadora Intrónica
ISSs	Secuencia Silenciadora Intrónica
KM	Kaplan Meier
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
mRNA	RNA mensajero
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORA	<i>Over Representation Analysis</i>
RBP	Proteínas de unión a RNA
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
S	Sensibilidad

SA	<i>Splicing</i> Alternativo
SAGE	Análisis en serie de expresión génica
snRNA's	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
SR	Proteínas ricas en serina- treonina
SS	Sitio de <i>Splicing</i>

1. RESUMEN

El gen *HMMR* codifica para el receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico; el procesamiento de *HMMR* por empalme alternativo resulta en cuatro transcritos que codifican para proteínas independientes (NCBI, 2021). Aunque se conocen las secuencias de aminoácidos no se ha descrito aún, la estructura ni función de cada isoforma. De manera general, se ha evidenciado que *HMMR* participa en procesos de motilidad, invasión y progresión del ciclo celular. En condiciones fisiológicas normales la expresión de los transcritos es baja, sin embargo, en procesos patológicos como el cáncer, la expresión de las variantes es alta (Messam et al. 2021).

El cáncer es un problema de salud global, en la infancia, la neoplasia maligna más frecuente es la leucemia, siendo México uno de los países con las tasas de incidencia y mortalidad más altas (IARC 2020). El subtipo más común de leucemia en los niños mexicanos es la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) cuya tasa de supervivencia a cinco años es de solo el 65%, en contraste con países desarrollados donde las tasas de supervivencia son mayores al 90%. Entre los factores que influyen, se ha evidenciado ineficiencia en la estratificación de los pacientes, puesto que, más de la mitad de los pacientes que se clasifican con riesgo estándar siguen presentando recaídas, por lo que la identificación de marcadores moleculares pronósticos permitiría mejorar la estratificación de los pacientes (Jiménez-Hernández et al. 2015; Juárez-Avendaño et al. 2020).

En este trabajo se determinó el nivel de expresión de *HMMR* en la recaída de LLA-B mediante un análisis *in silico* y se midió la expresión de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en muestras de pacientes con LLA-B y controles. Los resultados mostraron que la expresión de *HMMR* incrementa cuando hay una recaída en LLA-B. En cuanto a las variantes, se evidenció que *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* están sobre-expresadas en la enfermedad, además, que la alta expresión de *HMMRV1* se relaciona con una menor probabilidad de supervivencia libre de recaída, y que la baja expresión de *HMMRV2* y alta expresión de *HMMRV3* se vinculan con una menor supervivencia de los pacientes con LLA-B.

2. ABSTRACT

The HMMR gene encodes the hyaluronan-mediated motility receptor; HMMR processing by alternative splicing results in four transcripts that encode for independent proteins, although the amino acid sequences are known, the structure and function of each isoform have not yet been described. In general, it has been shown that HMMR is involved in motility, invasion and cell cycle progression. Under normal physiological conditions, the expression of transcripts is low, however, in pathological processes such as cancer, the expression of variants is high.

Cancer is a global health problem, in childhood, the most frequent malignancy is leukemia, and Mexico is one of the countries with the highest incidence and mortality rates. The most common subtype of leukemia in Mexican children is B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL), its 5-year overall survival rate is only 65%, in contrast to developed countries where survival rates are >90%. Among the influencing factors, inefficiency in the stratification of patients has been evidenced, since more than half of the patients classified as standard risk continue to relapse, so the identification of prognostic molecular markers would improve the patient stratification.

In this work, the level of HMMR expression in relapsed B-ALL was determined by *in silico* analysis, and the expression of the variants HMMRV1, HMMRV2 and HMMRV3 was measured in samples from patients with B-ALL and controls. The results showed that HMMR expression is increased in relapsed B-ALL. In terms of variants, HMMRV1, HMMRV2 and HMMRV3 were found to be overexpressed in the disease, furthermore, high HMMRV1 expression is associated with a lower probability of relapse-free survival, and low HMMRV2 expression and high HMMRV3 expression are associated with lower survival of patients with B-ALL.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer

El cáncer representa la segunda causa de muerte a nivel global, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2020, 9.96 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad, es decir que, 1 de cada 6 defunciones fueron consecuencia del cáncer (Ferlay et al. 2021).

El cáncer se entiende como un conjunto de enfermedades, de origen multifactorial, que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células anormales. Aunque no existe una causa puntual que genere cáncer, ciertos factores contribuyen a su desarrollo, estos pueden ser: genéticos, agentes físicos, agentes químicos y carcinógenos biológicos (National Cancer Institute 2015).

El origen del cáncer deriva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que generan cambios en los niveles de expresión génica, en todas las etapas: pre-transcripcional, transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. Por ejemplo, mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53* o en proto-oncogenes como *MYC* derivan en la transformación de las células (Pon and Marra 2015). Asimismo, cambios en los patrones de metilación del DNA y las modificaciones de histonas se han relacionado con la formación del cáncer (Feinberg, Koldobskiy, and Göndör 2016) (Hanahan and Weinberg 2011).

Con base en numerosas investigaciones referentes a esta afección, en el 2011 Hanahan y Weinberg resumieron la biología del cáncer en diez características fundamentales (Figura 1) (Hanahan and Weinberg 2011). Debido a la naturaleza del cáncer, éste puede desarrollarse en cualquier parte del organismo y diseminarse e invadir otros tejidos u órganos. En hombres, los tipos de cáncer más frecuentes son de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado. Mientras que, en mujeres, los tipos de tumor con mayor incidencia son cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cervicouterino y tiroides. En la población infantil, los tipos de cáncer más comunes son de cerebro, nódulos linfáticos y leucemia (IARC 2020).

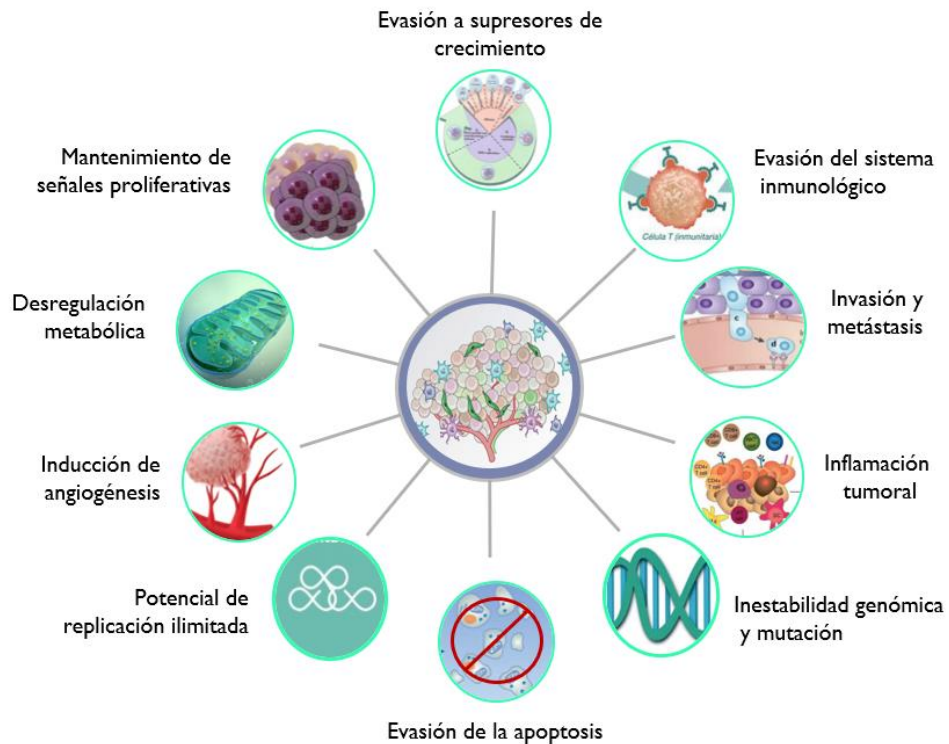


Figura 1. Características del cáncer. El diagrama muestra las diez características del microambiente tumoral, resumidas por Hannahan y Weinberg en un artículo publicado en 2011.

3.1.1 Leucemia

La leucemia es el tipo de cáncer pediátrico más frecuente, en México, en el 2020, el 33.2% de los cánceres diagnosticados en niños (0-19 años) fueron leucemias, representando el tipo de cáncer de mayor incidencia y también, el de mayor mortalidad (IARC 2020). La leucemia es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación desordenada de células progenitoras hematopoyéticas anormales, en la médula ósea. La causa puntual de este cáncer es desconocida, sin embargo, existen ciertos factores de riesgo genéticos y ambientales que contribuyen a su desarrollo, por ejemplo, el Síndrome de Down y la exposición a niveles altos de radiación (Terwilliger and Abdul-Hay 2017) (Kaplan 2019).

Este tipo de cáncer se clasifica con base en la estirpe y el grado de diferenciación celular en cuatro tipos: leucemia mieloide aguda, leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crónica y leucemia mieloide crónica. Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación de células en estadios inmaduros o poco diferenciados, con una progresión veloz. En contraparte, las leucemias crónicas se singularizan por la proliferación de células en estadios más diferenciados, así como, por una progresión más lenta de la enfermedad (American Cancer Society 2018).

El diagnóstico definitivo se establece por la presencia de al menos 20% de blastos en médula ósea o sangre periférica. Para la estratificación de riesgo y pronóstico, se evalúa la morfología celular, inmunofenotipo, genética y citogenética. Así como características clínicas: edad, género, conteo celular al momento del diagnóstico y presencia de blastos en sistema nervioso central u otros sitios extramedulares (Terwilliger and Abdul-Hay 2017) (Malard and Mohty 2020).

México se posiciona entre los países de mayor mortalidad en niños a causa de leucemia. Si bien, en países desarrollados, la tasa de supervivencia a 5 años es prometedora, en países poco desarrollados, las probabilidades de supervivencia se ven reducidas (Malard and Mohty 2020) (Namayandeh et al. 2020).

Diversos factores influyen en la baja supervivencia de pacientes pediátricos con leucemia de países en desarrollo, por ejemplo, condiciones sociales, económicas, de vivienda, así como factores genéticos poblacionales, el momento del diagnóstico, la estratificación de los pacientes con base en el riesgo y el monitoreo de la enfermedad mínima residual (Juárez-Avendaño et al. 2020) (Namayandeh et al. 2020).

3.1.2 Leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B)

Se estima que, del total de casos de leucemia en niños, entre el 70 y 80% corresponden a leucemia linfoblástica aguda (LLA), con un pico de incidencia entre el primer y cuarto año de vida (Terwilliger and Abdul-Hay 2017). A su vez, las leucemias linfoblásticas agudas, se subclasifican de acuerdo con la estirpe celular

implicada, en LLA de células T y LLA de células B, este último grupo representa cerca del 80% de las leucemias linfoblásticas agudas en niños (Kaplan 2019).

Los pacientes con LLA de células B con riesgo estándar son aquellos entre 1 y 10 años, con conteo de células blancas <50,000 células/uL sin presencia extramedular de blastos. En tanto que, los pacientes de alto riesgo son aquellos <1 año y >10 años con conteo de células blancas \geq 50,000 células/uL y presencia de blastos en sistema nervioso central y/o testículos (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002) (Namayandeh et al. 2020).

La terapia convencional duran entre 2 y 3 años, e incluye 4 fases: inducción a la remisión, consolidación, intensificación y mantenimiento (Namayandeh et al. 2020). Fallas en el tratamiento se reflejan como recaídas, las cuales pueden suceder en cualquier etapa. Cerca de una cuarta parte de los pacientes mexicanos con LLA-B presentan recaída y menos del 65% sobrevive 5 años (Jiménez-Hernández et al. 2015) (Muñoz-Aguirre et al. 2021), mientras que, en otros países como Australia, Estados Unidos o Japón, la supervivencia es alrededor del 90% (Tomizawa et al. 2022) (Kaplan 2019) (Tomizawa et al. 2022).

A pesar de que más del 50% de los pacientes mexicanos se clasifican como de riesgo alto, la frecuencia de recaídas en los pacientes estratificados como de riesgo estándar es del 55%. Lo cual evidencia la necesidad por mejorar la estratificación o implementar una sub-estratificación de los pacientes en México (Juárez-Avenida et al. 2020).

Numerosas investigaciones se han enfocado en identificar características genéticas y citogenéticas de la LLA-B, mismas que se han relacionado con la leucemiogénesis y el pronóstico de la enfermedad. Entre los hallazgos más comunes están las aneuploidías y traslocaciones cromosómicas, por ejemplo: *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* (Shurtleff et al. 1995; Hunger 1996; Ribeiro et al. 1987; C. G. Mullighan 2012a).

También se han evidenciado alteraciones (deleciones, rearreglos, mutaciones y amplificaciones) de distintos genes (C. G. Mullighan 2012a) (C. G. Mullighan 2012b)

(Woo, Alberti, and Tirado 2014) (Iacobucci and Mullighan 2017) (Malard and Mohty 2020) (Tabla 1 y Figura 2). Y recientemente, investigaciones han destacado la participación de mecanismos moduladores de la expresión a nivel co-transcripcional, como el *splicing*, en la leucemiogénesis. Black y colaboradores demostraron que la desregulación de los genes de cáncer en LLA-B ocurre principalmente a nivel del corte y empalme de mRNA, y no de mutaciones genéticas (Black et al. 2018).

Tabla 1. Genes y sus funciones, cuyas alteraciones se asocian con la leucemiogénesis.

FUNCIONES	GENES CON ALTERACIONES
Modificación de histonas	<i>CREBBP, WHSC1, SETD2, EZH2, TBL1XR1</i>
Factores de transcripción	<i>PAX5, ERG, EBF1, IZF1-3</i>
Supresores tumorales	<i>RB1, CDKN2A/2B, TP53</i>
Receptores de la respuesta inmune	<i>CRFL2, IL7R</i>
Maduración de las células B	<i>KMT2A, ERG, SH2B3</i>
Apoptosis	<i>BTG1</i>
Asociados a la vía RTK-RAS	<i>FLT3, NRAS, PTPN11</i>
Cinasas	<i>PDGFRB, ABL1, JAK1/2, EPOR</i>

Asimismo, se han descrito variantes de genes, producidas por empalme alternativo, que se relacionan con el desarrollo de LLA-B (Figura 2), por ejemplo: el transcrito alternativo (Del-E11) del gen que codifica para la beclina 1, una proteína implicada en la autofagia celular (Niu et al. 2014). Así como, las variantes alternativas del gen Ikaros (*IKZF1*) Ik6 e Ik8 (Del-E3 y Del-E5) que interrumpen la diferenciación de las células linfoides (C. Mullighan and Downing 2008). No sólo se han relacionado transcritos alternativos con la leucemiogénesis, sino también con la resistencia al tratamiento (Figura 2), como la isoforma del receptor CD19 (Del-E2) que evita la unión del agente inmunoterapéutico (Sotillo et al. 2015).

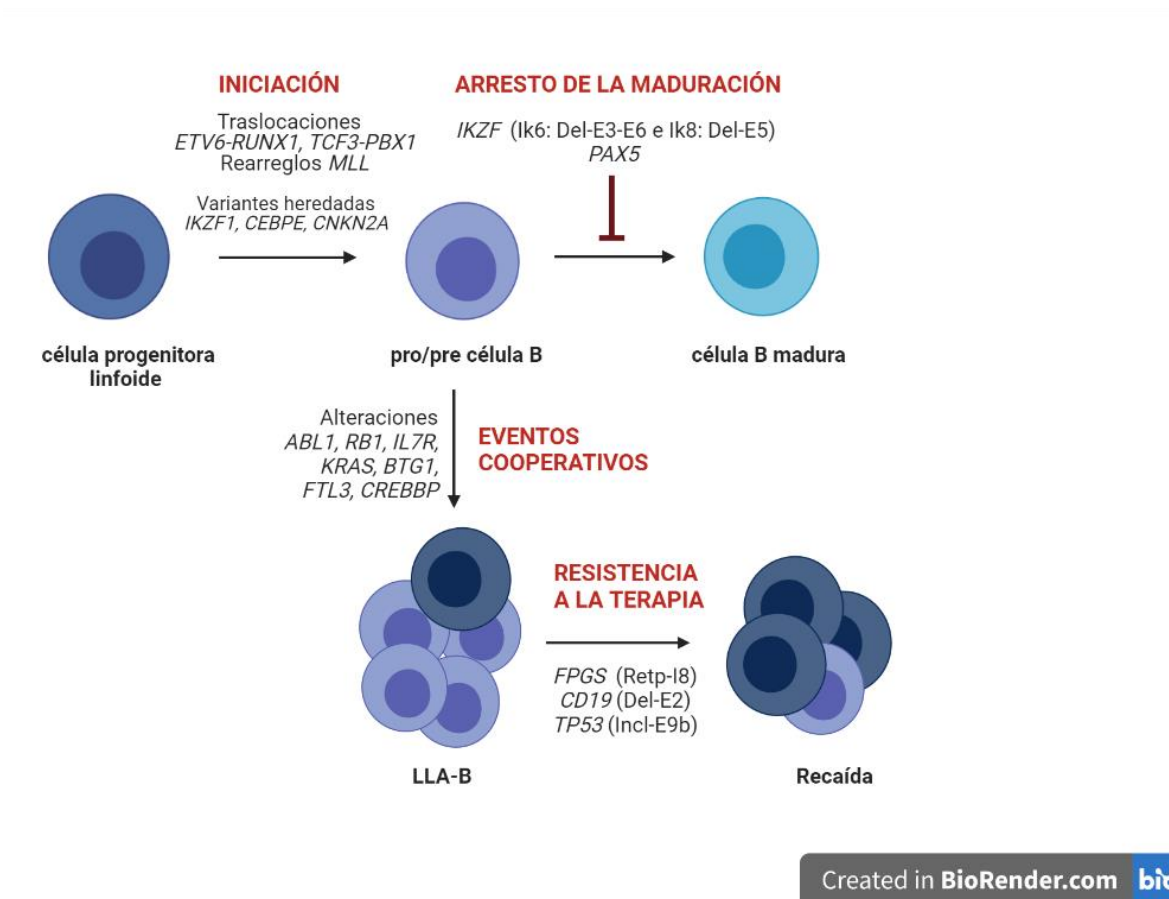


Figura 2. Alteraciones genéticas y moleculares en la LLA-B. Variantes heredadas, reordenamientos cromosómicos y alteraciones genéticas que promueven la autorrenovación de las células progenitoras linfoides, la acumulación de alteraciones genéticas y generación de variantes alternativas de transcritos expresados en procesos como el ciclo celular, señalización de cinasas y reguladores epigenéticos, entre otros, son denominados como eventos cooperativos que contribuyen a la supervivencia y proliferación de las células malignas. Tras la presión de selección generada por los agentes terapéuticos, algunas células desarrollan resistencia al tratamiento y promueven la recaída. Modificado de (C. G. Mullighan 2013)

3.2 Corte y empalme del RNA mensajero (*splicing*)

La regulación de la expresión génica constituye uno de los procesos celulares más importantes, resulta clave en la maduración, diferenciación y respuesta celular. Diferentes mecanismos contribuyen a la modulación de la expresión en distintos niveles: pre-transcripcional, transcripcional, traduccional o post-traduccional. Por ejemplo: modificaciones de histonas, RNA no codificantes, metilación del DNA y modificaciones post-traduccionales, por mencionar algunos.

A nivel transcripcional, el *splicing*, definido como el corte y empalme del pre-RNA mensajero participa en la regulación de la expresión génica. Se trata de un mecanismo altamente conservado en eucariontes, mediante el cual las regiones intrónicas del pre-RNA mensajero son escindidas y los exones son unidos covalentemente, generando el RNA mensajero maduro. Los patrones de unión generados por el empalme se diferencian en dos tipos: empalme constitutivo y empalme alternativo (Figura 3).

El empalme constitutivo se caracteriza por la escisión de todos los intrones y la unión consecutiva de los exones, mientras que, el empalme alternativo tiene diferentes patrones de exclusión e inclusión de regiones codificantes y no codificantes, tales como: omisión de exón(es), retención de intrón(es), sitios alternativos de empalme en los extremos 3' o 5', omisión excluyente de exón(es), y sitios alternativos de poliadenilación o capuchón CAP.

Debido a la diversidad de patrones de unión que se generan por el empalme alternativo, este evento contribuye a la diversificación del transcriptoma y del proteoma, lo cual es sumamente importante en procesos de diferenciación y respuesta celular. Wang y colaboradores calcularon que el 86% de los genes humanos codificantes, son procesados por este mecanismo (E. T. Wang et al. 2008), y otro estudio estima que en promedio se generan siete transcritos distintos por cada gen codificante (Sveen et al. 2016).

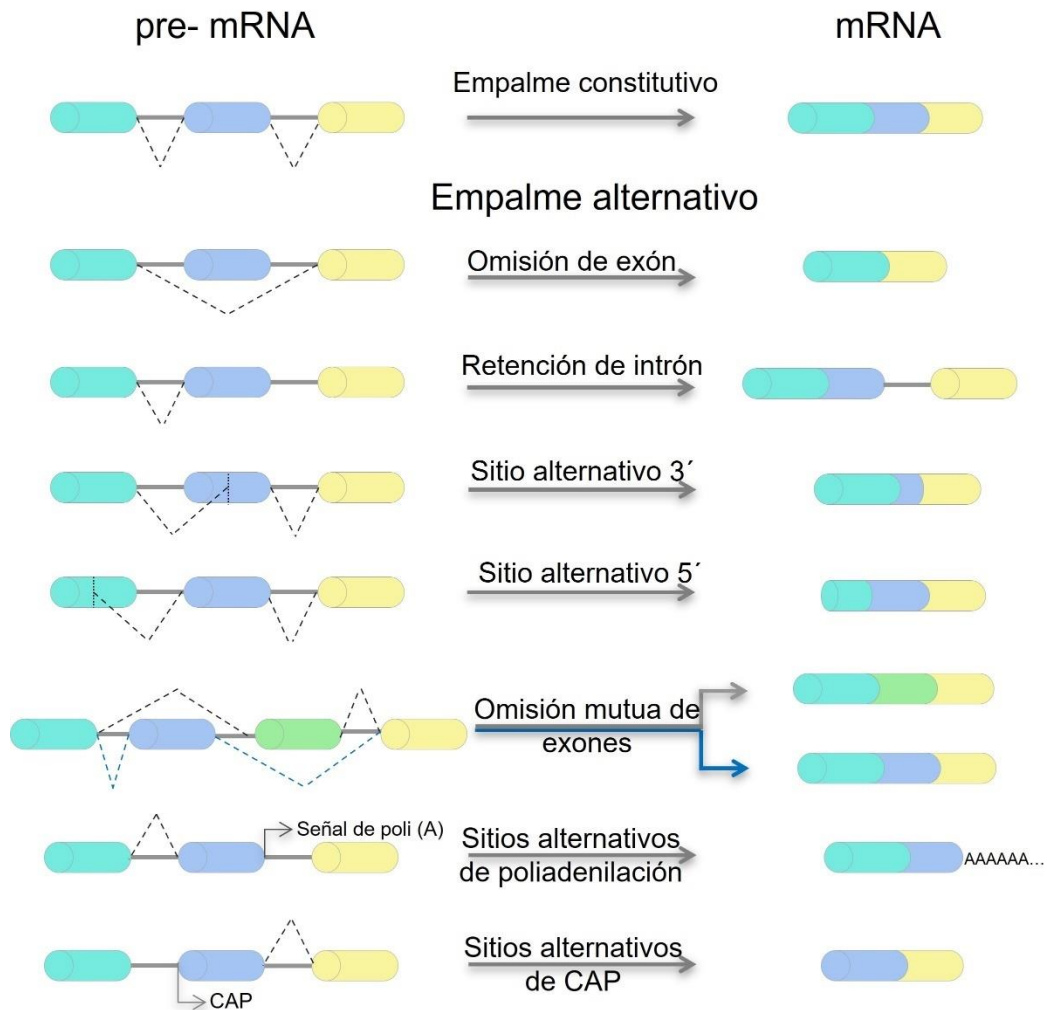


Figura 3 Clasificación del empalme. En el empalme constitutivo del pre-mRNA ocurre la escisión de los intrones y la unión consecutiva de los exones, mientras que, en el empalme alternativo hay diferentes patrones de unión: omisión, del exón, retención de intrón, sitios alternativos de empalme en 5' y 3', omisión excluyente de exones y sitios alternativos de cola poli A y capuchón CAP. Las líneas punteadas representan los sitios de corte, los cilindros de colores los exones y las líneas sólidas los intrones. Modificado de (J. Chen and Weiss 2015).

3.2.1 Mecanismo catalítico del empalme

Mecanísticamente, el empalme constitutivo y el empalme alternativo son iguales, la catálisis es realizada por un complejo conformado por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNA's): U1, U2, U4, U5 y U6, y cientos de cofactores proteínicos, este complejo es denominado espliceosoma, cuya conformación y composición es altamente dinámica (Will and Lührmann 2011) (Roy, M. Haupt, and R. Griffiths 2013) (Matera and Wang 2014).

El ensamble del espliceosoma (Figura 4) inicia con el reclutamiento de la snRNA U1 hacia la secuencia específica del pre-RNA mensajero, denominada sitio de *splicing* 5' (5'ss: GU), este paso es catalizado por la polimerasa II. Enseguida, la snRNA U2 y factores como SF1 y U2AF se unen al sitio de *splicing* 3' (3'ss: AG) y a la secuencia de ramificación (*branch site*, BS) localizada 15-50 nucleótidos río arriba del sitio 3'ss, este evento es catalizado por Prp5 y Sub2. El resultado de estas interacciones es la formación del complejo pre-catalítico A, también denominado pre-espliceosoma (Will and Lührmann 2011) (Matera and Wang 2014).

Paralelamente las snRNA's U4/U6 y U5 son pre-ensambladas por la helicasa Prp28. El trímero es reclutado hacia el complejo A, U5 se une a la secuencia 5'ss y U6 se asocia con U2, formando así, el complejo pre-catalítico B. El paso siguiente, resulta de la desestabilización de interacciones RNA-RNA y RNA-proteína, las snRNA's U1 y U4 son desplazadas del complejo y helicasas (Prp2, Brr2, Sn114) confieren la capacidad catalítica del complejo B (espliceosoma) (Will and Lührmann 2011) (Matera and Wang 2014).

El espliceosoma lleva a cabo la formación del asa intrónica, originada por la primera reacción de transesterificación SN2, donde, el extremo terminal 5' del intrón se liga a la adenina de la secuencia de ramificación (BS). Después, la snRNA U5 cataliza la segunda reacción de transesterificación que escinde el 5'ss para separar al exón del asa intrónica, uniendo covalentemente los exones. Consecutivamente, la snRNA U5 se asocia con U6/U2 en unión con el asa intrónica y el RNA mensajero, formando el complejo post-espliceosoma.

Finalmente, las snRNA's U2, U5 y U6 se disocian del asa intrónica para su posterior participación en otras rondas de empalme, y el RNA mensajero queda en su forma madura. (Will and Lührmann 2011) (Matera and Wang, 2014).

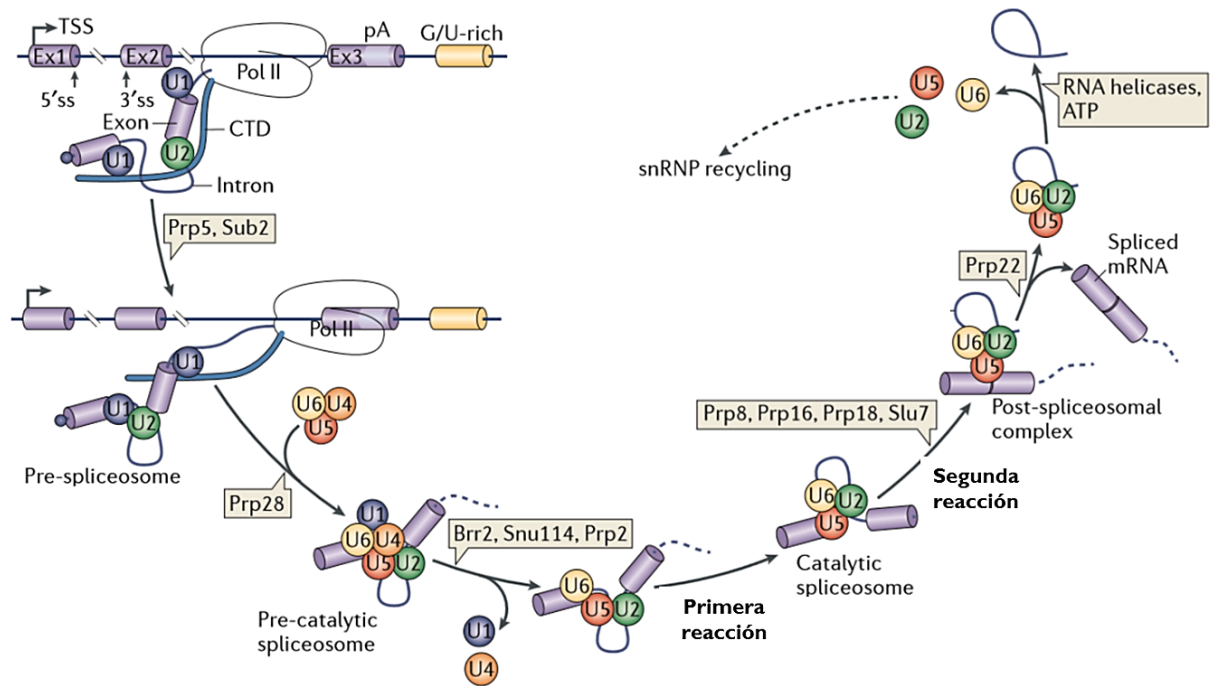


Figura 4. Mecanismo catalítico del empalme. Las snRNAs U1 y U2 se unen a los sitios de *splicing* 5' y 3' del pre-RNA: pre-espliceosoma, catalizada por Prp5 y Sub2. Después mediante la proteína Prp28 las snRNAs U5 y U4/U6 son reclutadas: spliceosoma pre-catalítico, el rearrreglo estructural catalizado por Brr2, Snu114 y Prp2 desplaza a U1 y U4, confiriendo la capacidad catalítica del spliceosoma. El complejo catalítico lleva a cabo la primera reacción, generando el asa intrónica, posteriormente, la U5 cataliza la segunda reacción que corta el 5'ss para separar al exón del asa intrónica, ligando covalentemente los exones. La unión de U2 U4 y U6 al asa, forman el complejo post-espliceosoma. Finalmente, las snRNAs son liberadas por RNA helicasa ATP dependiente, para su reciclado y el producto final es el RNAm maduro (Matera and Wang, 2014).

3.2.2 Regulación del empalme

Los cofactores proteínicos del spliceosoma (helicasa de RNA y miembros de la familia DExD/H-box) tienen un rol fundamental en el reconocimiento y unión a los sitios de *splicing* en el pre-RNA mensajero, además confieren flexibilidad y dinámica en las interacciones RNA-RNA y RNA-proteína durante el empalme del pre-mRNA. Modificaciones post-traduccionales de estas enzimas repercuten de igual forma en la regulación del empalme (Will and Lührmann 2011).

Asimismo, la interacción entre secuencias en *cis* (pre-RNA mensajero) como los potenciadores exónicos (ESEs) e intrónicos (ISEs) y silenciadores exónicos (ESSs) e intrónicos (ISSs), factores en *trans*: proteínas SR (fosfoproteínas nucleares ricas en residuos Ser/Arg), y ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), modulan el ensamble del espliceosoma (Figura 5).

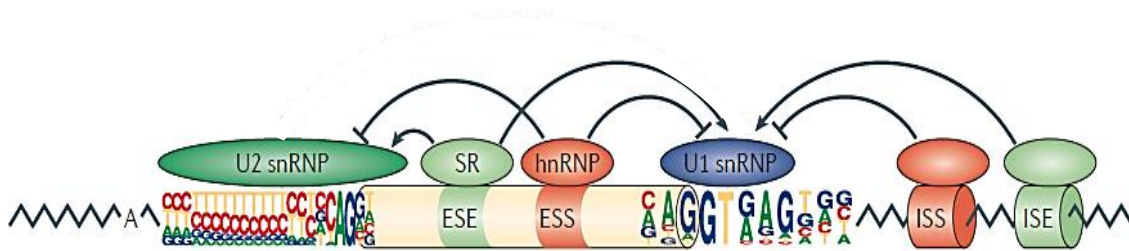


Figura 5. Regulación del empalme alternativo. Interacciones RNA-proteína entre secuencias en *cis* (ESEs, ISEs, ISSs, ESSs) y factores en *trans* (proteínas ricas en serina-arginina SR y ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares hnRNP) modulan el empalme del pre-mRNA.

Las flechas \rightarrow indican la promoción del *splicing*, mientras que las flechas \dashv señalan su inhibición, se muestran también las secuencias consenso de los sitios de *splicing* (Matera and Wang, 2014).

Generalmente, las proteínas SR reconocen sitios ESEs, mientras que las hnRNPs se unen a secuencias ESSs, sin embargo, este patrón de reconocimiento no es una regla. Los mecanismos de modulación del *splicing* son dependientes del contexto celular, es decir que, existen diferentes factores que determinan los patrones de corte y empalme (Figura 6), por ejemplo, la competencia por el reclutamiento de las snRNA's hacia determinados sitios de *splicing* en un mismo o diferentes pre-RNA mensajeros y los efectos dependientes de la posición de factores de *splicing* (Matera and Wang, 2014) (Fu and Ares 2014).

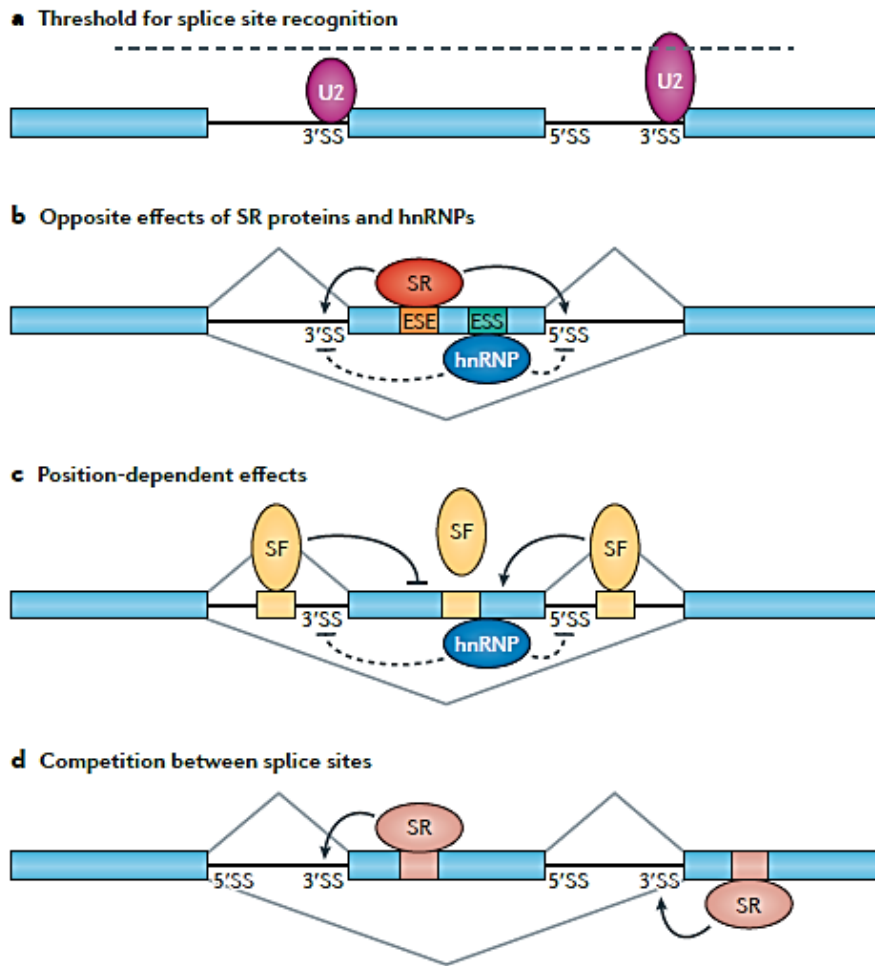


Figura 6. Eventos dependientes del contexto, que regulan el empalme. Las actividades moduladoras de las proteínas de unión a RNA (RBPs) están coordinadas en función del ensamble del espliceosoma, primero se definen los sitios de empalme y luego se regula el empalme selectivo. a) Umbral de reconocimiento del sitio de *splicing* (SS). El exón alternativo (en medio) tiene señales débiles del sitio de empalme, en comparación con otros exones (derecha) lo que genera la exclusión del exón medio. b) Efectos opuestos de proteínas SR y hnRNP. Las proteínas SR y hnRNP pueden tener efectos opuestos sobre el reconocimiento de los sitios de empalme adyacentes. c) Efectos dependientes de la posición. Diversos factores de *splicing* secuencia específica, al unirse a una región intrónica corriente arriba inhiben la selección de otros exones, mientras que al unirse a una región intrónica corriente abajo mejoran la selección del exón alternativo. d) Competencia por el SS. El reconocimiento mejorado del SS induce la inclusión del exón, mientras que el reconocimiento aumentado del SS competitivo flanqueante provoca la omisión del exón (Fu and Ares 2014).

La plasticidad que confiere el empalme alternativo en el remodelado del transcriptoma y proteoma resulta clave para la diferenciación celular y la respuesta al microambiente y otros eventos celulares, sin embargo, también representa una oportunidad para el desarrollo y progresión de diferentes patologías como la β -talasemia, atrofia muscular espinal (H. He et al. 2011), ataxia telangiectasia (Dhir et al. 2010) y el cáncer (David and Manley 2010) (Roy, M. Haupt, and R. Griffiths 2013) (Matera and Wang, 2014).

3.2.3 Empalme alternativo y cáncer

Múltiples investigaciones han evidenciado que la desregulación del empalme alternativo se vincula con la biología del cáncer (Figura 8) (Oltean and Bates 2014) (Sveen et al. 2016). Las alteraciones incluyen, variantes alternativas específicas del tumor, y modificaciones de las secuencias en *cis* y factores en *trans* que participan en el ensamble del espliceosoma. En conjunto, estos eventos se conocen como empalme aberrante (Singh and Eyras 2017).

En leucemia linfocítica crónica y mielodisplasia se han evidenciado mutaciones en la maquinaria del *splicing*, por ejemplo: snRNA U2 y los factores *SF3B1* y *U2AF35* (Cazzola, Rossi, and Malcovati 2013) (Yoshida et al. 2011). De forma similar, en cáncer pulmonar de células no pequeñas y cáncer colorrectal, los factores mutados son *U2AF1* y *HNRNPL*, respectivamente (Brooks et al. 2014) (Sebestyén et al. 2016).

Cambios en los niveles de expresión de los factores en *trans* también conducen al desarrollo del cáncer (Figura 7), por ejemplo la hnRNP A2 promueve la inclusión del exón 2 en el transcrito alternativo de gen *TP53*, que da lugar a una isoforma implicada en la invasión (Moran-Jones et al. 2009), de forma análoga, el factor PTB promueve la producción de variantes relacionadas con la migración e invasión, en gliomas y cáncer de ovario (X. He et al. 2007) (David and Manley 2010).

Otros factores como SRSF1 son considerados oncogenes, puesto que promueven la transformación de células, por ejemplo, en células epiteliales de mama favorece la expresión de isoformas anti-apoptóticas (BIM y BIN1) (Anczuków et al. 2012).

Similarmemente, los factores SRSF6 y PRPF6 tiene propiedades oncogénicas en tumores pulmonares y de colon (Cohen-Eliav et al. 2013) (Adler et al. 2014).

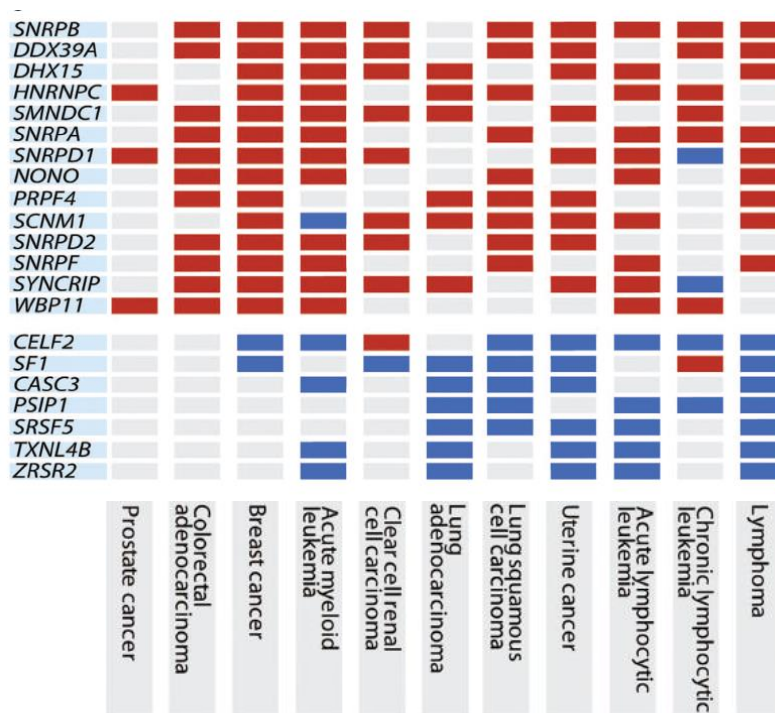


Figura 7. Expresión diferencial de factores de empalme en 11 tipos de cáncer. Datos de expresión diferencial de factores de empalme en once tipos de cáncer, obtenidos de microarreglos de mRNA (MediaSapiens database). La desregulación en la expresión de los factores de *splicing* contribuye al corte y empalme aberrante, la mayoría de los factores están sobre-regulados (rojo), *SNRPB* y *DDX39A* son los de mayor frecuencia. Los factores de empalme regulados a la baja se muestran en azul. Modificado de (Sveen et al. 2016).

Además de estas alteraciones en los factores del *splicing*, mutaciones en las secuencias reguladoras del corte y empalme son capaces de conducir al empalme aberrante (Singh and Eyra 2017). Por ejemplo, las mutaciones en las secuencias límite de exón-intrón se han vinculado con la retención de intrones en genes supresores de tumores como *MLL2*, *CHD1*, *TP53*, *PTEN*, *ARID1A* y *PTCH1*. Mutaciones sinónimas de regiones contiguas a exones resultan en la ganancia de motivos ESEs y pérdida de motivos ESSs, por ejemplo, en oncogenes *JAK3*, *ITK* y *NTRK1* estas variaciones incrementan la inclusión de exones (Supek et al. 2014). También, mutaciones intrónicas favorecen la producción de transcritos alternativos relacionados con la resistencia a la terapia, como la variante del gen *BRAF* que confiere la resistencia a Vemurafenib (Poulikakos et al. 2011).

Los patrones de empalme encontrados en tejidos sanos difieren de los provenientes de tejidos con cáncer, por lo que, numerosos hallazgos han demostrado la presencia de transcritos alternativos en diferentes tipos de tumores, que se vinculan estrechamente con las firmas del cáncer (Figura 8) (Oltean and Bates 2014) (Sveen et al. 2016).

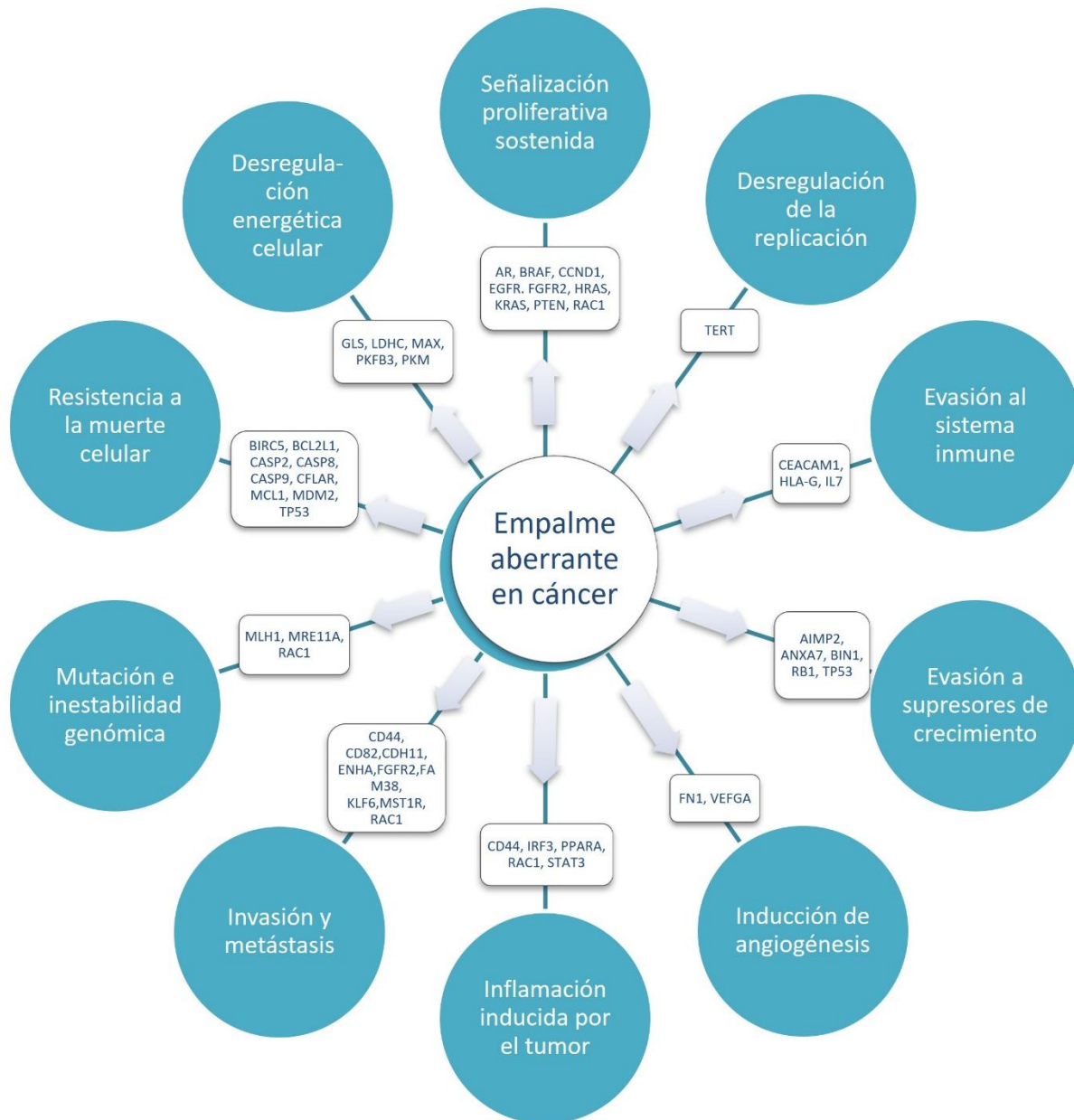


Figura 8. Empalme alternativo aberrante y la biología del cáncer. El empalme alternativo de genes (recuadros) se ha relacionado con las diez características del cáncer (círculos). Modificado de (Sveen et al. 2016)

Algunos ejemplos de estos patrones de empalme aberrante en cáncer se ilustran en la figura 9. El transcrito alternativo del gen *EGFR* que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidermal, carente del exón 4 (de4 EGFR), da lugar a una proteína constitutivamente activa que promueve la proliferación celular, ésta se expresa en cáncer de próstata, ovario y gliomas pero no en tejidos adyacentes al tumor (H. Wang et al. 2011).

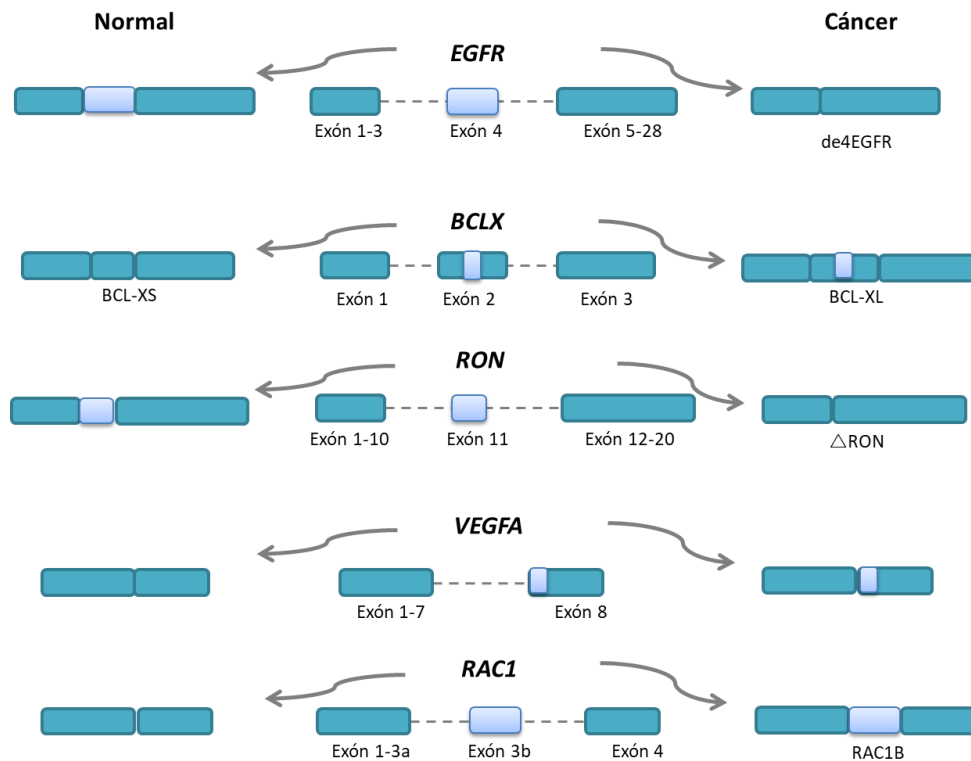


Figura 9. Patrones de empalme aberrante de genes involucrados en la biología del cáncer. Transcritos alternativos de los genes *EGFR*, *BCLX*, *RON*, *VEGFA* y *RAC1* se expresan diferencialmente en distintos tipos de tumores. La isoforma de *EGFR* donde se omite el exón 4 incrementa la proliferación celular, la variante BCL-xL generada por un sitio alternativo 5' ss se considera un factor anti-apoptótico, el transcrito alternativo de *RON* que carece del exón 11 se relaciona con la invasión celular, la isoforma derivada del transcrito alternativo de *VEGFA* tiene un efecto pro-angiogénico y RAC1B resulta de la inclusión del exón 3b y aumenta la proliferación celular. Los rectángulos de color azul fuerte representan los exones que no se modifican, mientras que los de color azul claro a aquellos exones en donde se lleva a cabo el empalme alternativo.

En relación con la evasión de la apoptosis, el pre-RNA mensajero del gen *BCLX* tiene un sitio alternativo de *splicing* en el extremo 5' (exón 2), que da lugar a la producción de dos transcritos diferentes, cuyas traducciones son dos proteínas: BCL-X_s y BCL-X_L, la primera de ellas promueve la apoptosis, mientras que BCL-X_L tiene efectos anti-apoptóticos (Boise et al. 1993), el desbalance en la expresión de estas isoformas se ha descrito en diferentes tipos de cáncer (Oltean and Bates 2014) (J. Chen and Weiss 2015).

Otro ejemplo relacionado con la activación de invasión y metástasis es la variante alternativa del gen *RON*, que codifica para un receptor tirosina cinasa, la omisión del exón 11 (Δ Ron) da lugar a una proteína activa en ausencia del ligando, que promueve la motilidad e invasión celular. En cáncer de mama, próstata y colon se ha evidenciado su sobre-expresión (Ghigna et al. 2005) (Moon et al. 2014).

En angiogénesis también se han descrito variantes vinculadas con su promoción, como la isoforma del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFA*), derivada de un sitio alternativo 3'ss (exón 8), cuyas funciones son pro-angiogénicas en comparación con la proteína canónica que posee propiedades anti-angiogénicas. En carcinoma renal la expresión de esta variante alternativa es alta, a diferencia de tejido renal sano donde el balance de la variante canónica y la alternativa es 50:50 (Bates et al. 2002).

Algunas variantes se vinculan con más de una "firma" del cáncer, por ejemplo, RAC1B, el transcrito alternativo de RAC1 que incluye el exón 3b, cuyo producto proteico promueve la proliferación celular, migración e invasión. La expresión de este transcrito se regula a la alta en diversos tipos de tumor como cáncer pulmonar, colorrectal y pancreático, por mencionar algunos (Matos and Jordan 2008) (Sahu et al. 2016) (Mehner et al. 2015).

3.3 Receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (HMMR)

Entre los genes humanos que son procesados por empalme alternativo y que se han vinculado con el desarrollo y la progresión del cáncer, se encuentra *HMMR*, también denominado *CD168* o *RHAMM*. Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma cinco en la región q34 de la cadena sentido (Figura 10), el transcrito canónico del gen está conformado por 18 exones, tiene un tamaño de 3 016 pb y codifica para el receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (HMMR) (Ensembl, 2021).

HMMR fue identificado por primera vez como un componente soluble de la matriz extracelular de fibroblastos de pollo (E. A. Turley 1982). Es una proteína de 725 aminoácidos (84.2 kDa) perteneciente a la familia de las hialaderinas (B. P. Toole 1990), tiene dos dominios de unión a ácido hialurónico (Bx7B) en el extremo carboxilo terminal (Bryan P. Toole 2001) y carece de dominio transmembranal (Eva A. Turley, Noble, and Bourguignon 2002) así como de péptido señal (Klewes, Turley, and Prehm 2015). Aunque no se ha cristalizado la estructura proteica de HMMR, predicciones basadas en la homología de la secuencia de aminoácidos, suponen una estructura larga helicoidal con capacidad de formar dímeros o trímeros (Figura 10).

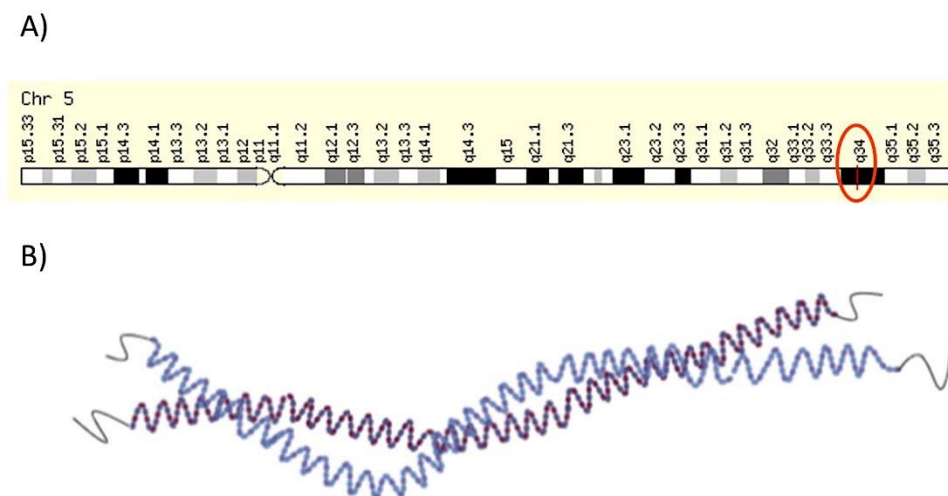


Figura 10. Localización genómica y predicción de la estructura proteica de HMMR. En **A)** se señala la ubicación genómica del gen *HMMR* con un ovalo rojo (cromosoma 5, región q34). En **B)** se representa la predicción de la estructura proteica de HMMR, así como su posible interacción intermolecular.

3.3.1 Funciones celulares de HMMR

La distribución celular de HMMR es amplia, se localiza tanto en superficie membranal como en citoplasma y núcleo (Okamoto et al. 1999), también participa en diferentes mecanismos celulares (Figura 11) relacionados con la motilidad, la regulación del ciclo celular y la degradación de la matriz extracelular (Misra et al. 2015). A nivel extracelular HMMR interactúa con ácido hialurónico (HA), el receptor de ácido hialurónico (CD44) y receptores de factores de crecimiento (TGF β , bFGFR, PDGFR), estas interacciones promueven la migración celular, dependiente de la señalización ERK1/2/MAPK, aún en ausencia de HMMR intracelular (Savani et al. 2001) (Tolg et al. 2006) (Park et al. 2012).

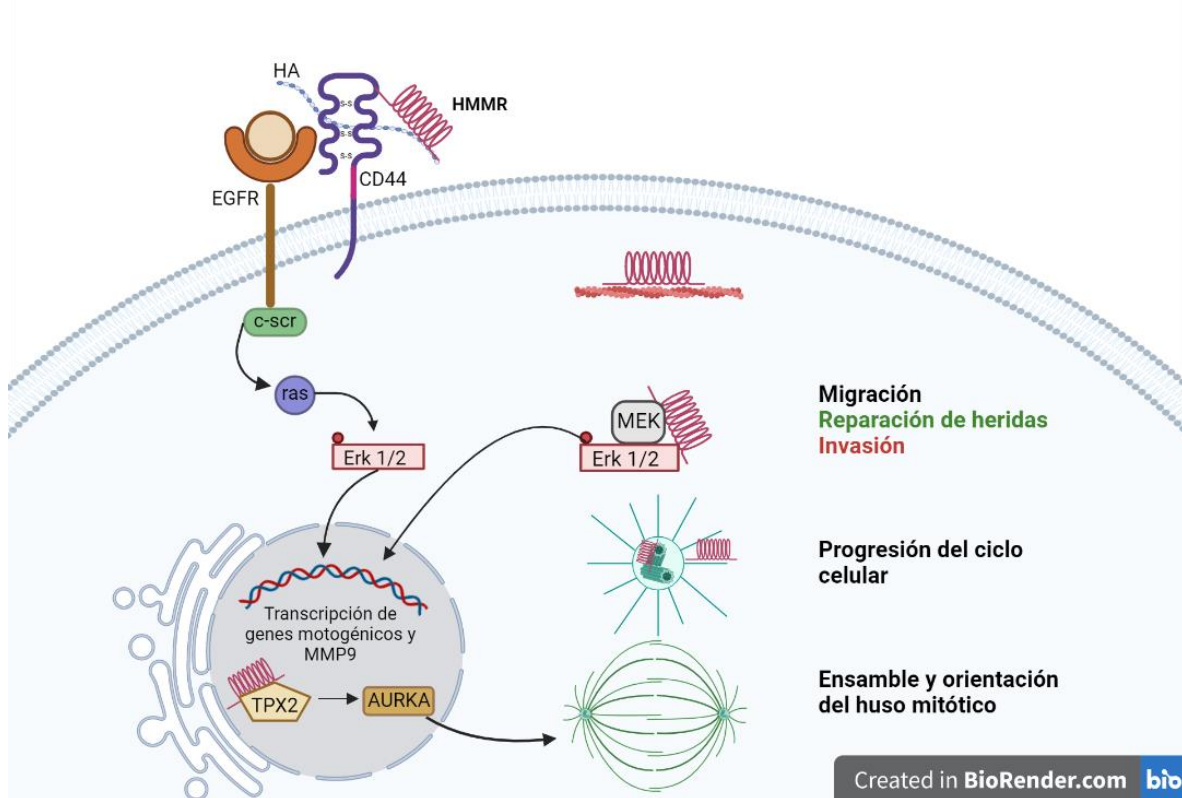


Figura 11. Funciones celulares de HMMR. HMMR extracelular promueve la motilidad celular dependiente de la cascada ERK1,2, al formar el complejo activador con HA, CD44 y receptores de factores de crecimiento. HMMR intracelular se une a cinasas ERK1,2. MEK1, factores de ensamble del huso mitótico (TPX2, AURKA y dineína), filamentos de actina y microtúbulos, activando la motilidad, proliferación y degradación de la MEC.

Intracelularmente, HMMR se une a diferentes proteínas como filamentos de actina y microtúbulos (Assmann et al. 1999) (Maxwell et al. 2003) regulando la dinámica del citoesqueleto y del centrosoma. En núcleo HMMR activa cinasas ERK1/2, MEK1 y factores de ensamble del huso mitótico como TPX2, AURKA y dineína (Taylor et al. 2006) (H. Chen et al., 201), estas interacciones activan cascadas de señalización que promueven la motilidad, progresión del ciclo celular y la transcripción de genes relacionados con la invasión celular como *MMP9* que codifica para la metaloproteasa de matriz extracelular 9 (Tolg et al. 2014).

3.3.2 Empalme alternativo de *HMMR*

Como se mencionó con anterioridad, *HMMR* es procesado por empalme alternativo, como resultado se han reportado cuatro transcritos distintos codificantes para proteínas independientes (Figura 12). El transcrito canónico *HMMRV1* (NM_001142556.2) tiene una longitud de 3 016pb organizadas en 18 exones, y codifica para la isoforma “a” de 725 aminoácidos (NCBI, 2021).

La isoforma “b” de 724 aminoácidos, está codificada por el transcrito alternativo *HMMRV2* (NM_012484.3), éste se caracteriza por un sitio alternativo de *splicing* en el extremo 5´ que ocasiona la pérdida de tres nucleótidos, por lo que su longitud es de 3 013pb contenidas en 18 exones. La variante *HMMRV3* (NM_012485.3) tiene un tamaño de 2 968pb y se distingue por la omisión del exón 4, dando lugar a la isoforma c de 709 residuos (NCBI, 2021).

Finalmente, el transcrito *HMMRV4* (NM_001142557.2) se diferencia por la omisión de los exones 2, 3 y 4, tiene una longitud de 2,789 pb y codifica para la isoforma “d” de 638 aminoácidos (NCBI, 2021). Debido a que los patrones de empalme alternativo están localizados en la primera región del pre-RNA mensajero de HMMR, todas las isoformas conservan las secuencias codificantes para los dominios de unión a ácido hialurónico. Sin embargo, se desconoce de qué forma repercuten estos eventos de empalme alternativo en la estructura proteica, así como la localización y función celular que desempeña cada isoforma.

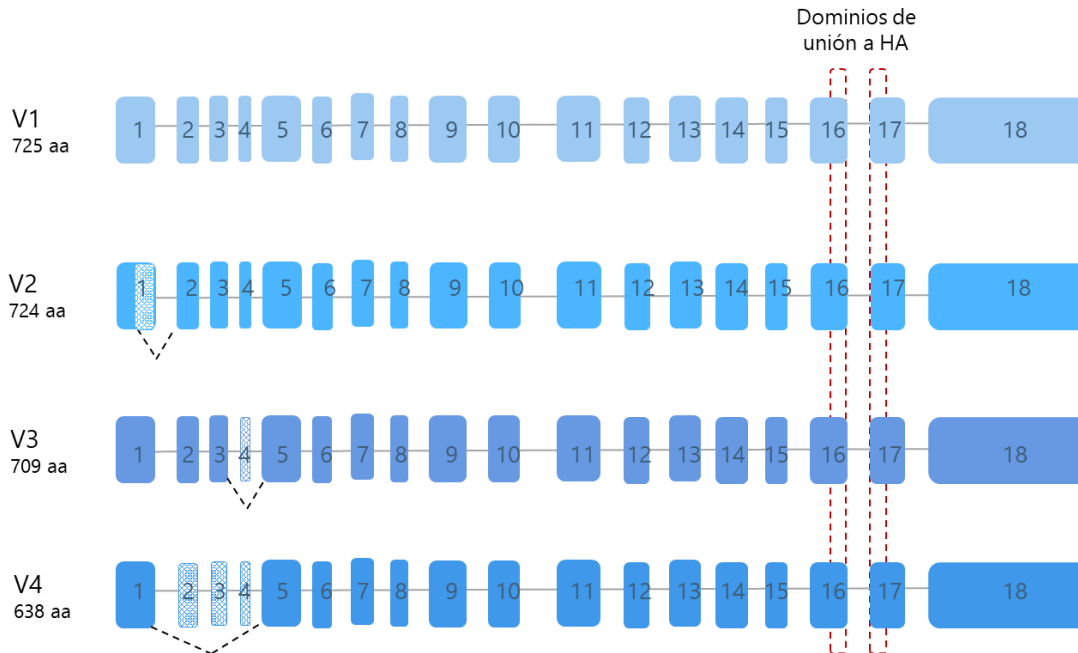


Figura 12. Eventos de empalme alternativo del gen humano *HMMR*. Los esquemas hacen referencia a los patrones de empalme del pre-mRNA de *HMMR* y al tamaño de la isoforma que codifica cada transcrito (*HMMRV1*: NM_001142556.2, *HMMRV2*: NM_012484.3, *HMMRV3*: NM_012485.3, *HMMRV4*: NM_001142557.2). Los recuadros sólidos indican los exones mientras que los sombreados indican las regiones escindidas, las líneas punteadas en color negro señalan los sitios de *splicing* y los rectángulos punteados en color rojo indican las regiones codificantes para los dominios de unión a HA (Bx7B).

Cabe mencionar que también se han reportado transcritos alternativos no codificantes, los cuales, se encuentra en la cadena antisentido del locus de *HMMR*, estos no fueron objeto de análisis en este trabajo, dado que se pretende continuar con el estudio funcional de las variantes codificantes.

3.3.3 *HMMR* en cáncer

La expresión de *HMMR* en condiciones homeostáticas se encuentra regulada a la baja, con excepción de testículos y sangre (Figuras 13 y 14A) donde se ha detectado alta expresión, así como, durante la reparación de tejidos, donde se sabe, coordina mecanismos mitogénicos de fibroblastos y queratinocitos (Tolg et al. 2006) (Tolg et al. 2014) (Tolg et al. 2020) .

En procesos inflamatorios y tumorigénicos se ha reportado la sobre-expresión de *HMMR*, a nivel de RNA mensajero y de proteína, por ejemplo en cáncer de ovario

(Buttermore et al. 2017), páncreas (Choi et al. 2019), riñón (Chi et al. 2012) e hígado (C. W. Yang et al. 2005), por mencionar algunos. Interesantemente, la expresión de *HMMR* se ha identificado en células troncales tumorales de glioblastoma (Tilghman et al. 2014) (Stangeland et al. 2015) sugiriendo que juega un rol importante en la autorrenovación de las células malignas y en consecuencia en la recurrencia tumoral y la resistencia terapéutica.

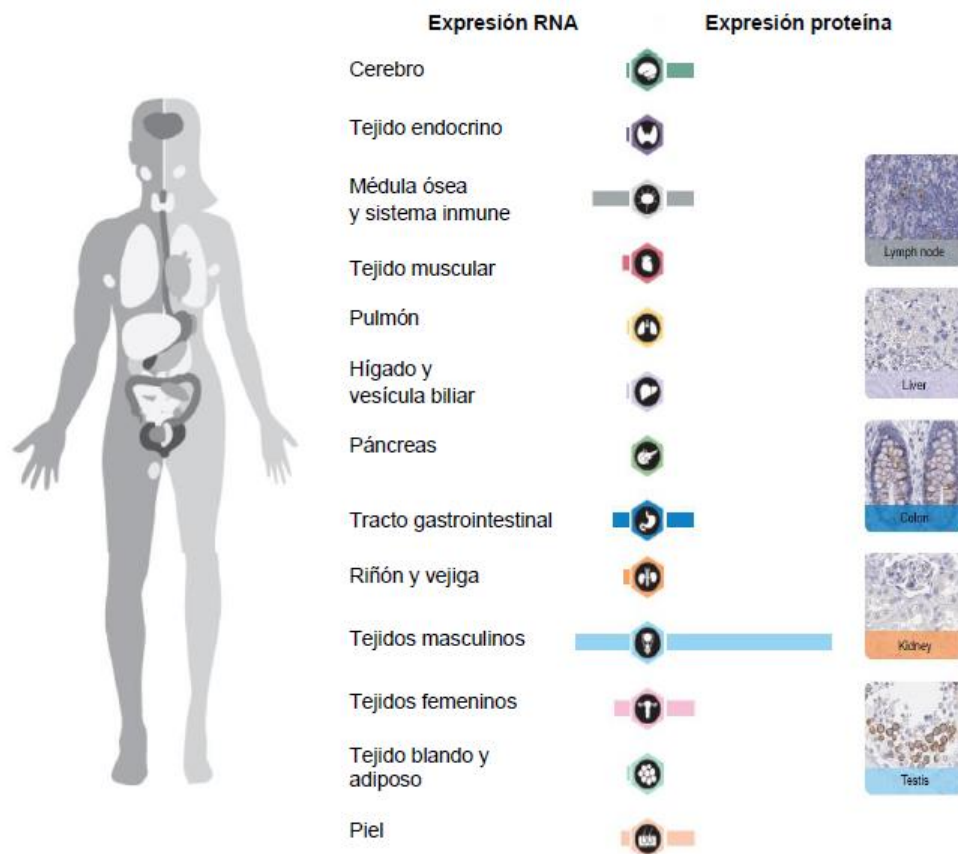


Figura 13. Expresión de HMMR (RNAm y proteína) en condiciones fisiológicas normales. Las barras indican los niveles de expresión basados en: TPM (transcritos por millón) para RNAm, resultado de RNA-seq, y para proteína se puntúa un score obtenido a partir de ensayos de inmunohistoquímica. Cada barra representa la puntuación de expresión más alta encontrada en un grupo particular de tejidos (modificado de *The Human Protein Atlas*, 2019).

Datos de expresión a nivel de mRNA contenidos en GEPIA (*Gene Expression Profile Interactive Analysis*) muestran que *HMMR* se sobre-expresa en distintas neoplasias malignas (Figura 14) respecto de tejidos sanos, con excepción de la leucemia

mieloide aguda donde la expresión de *HMMR* es significativamente menor que en condiciones de salud (Figura 14B).

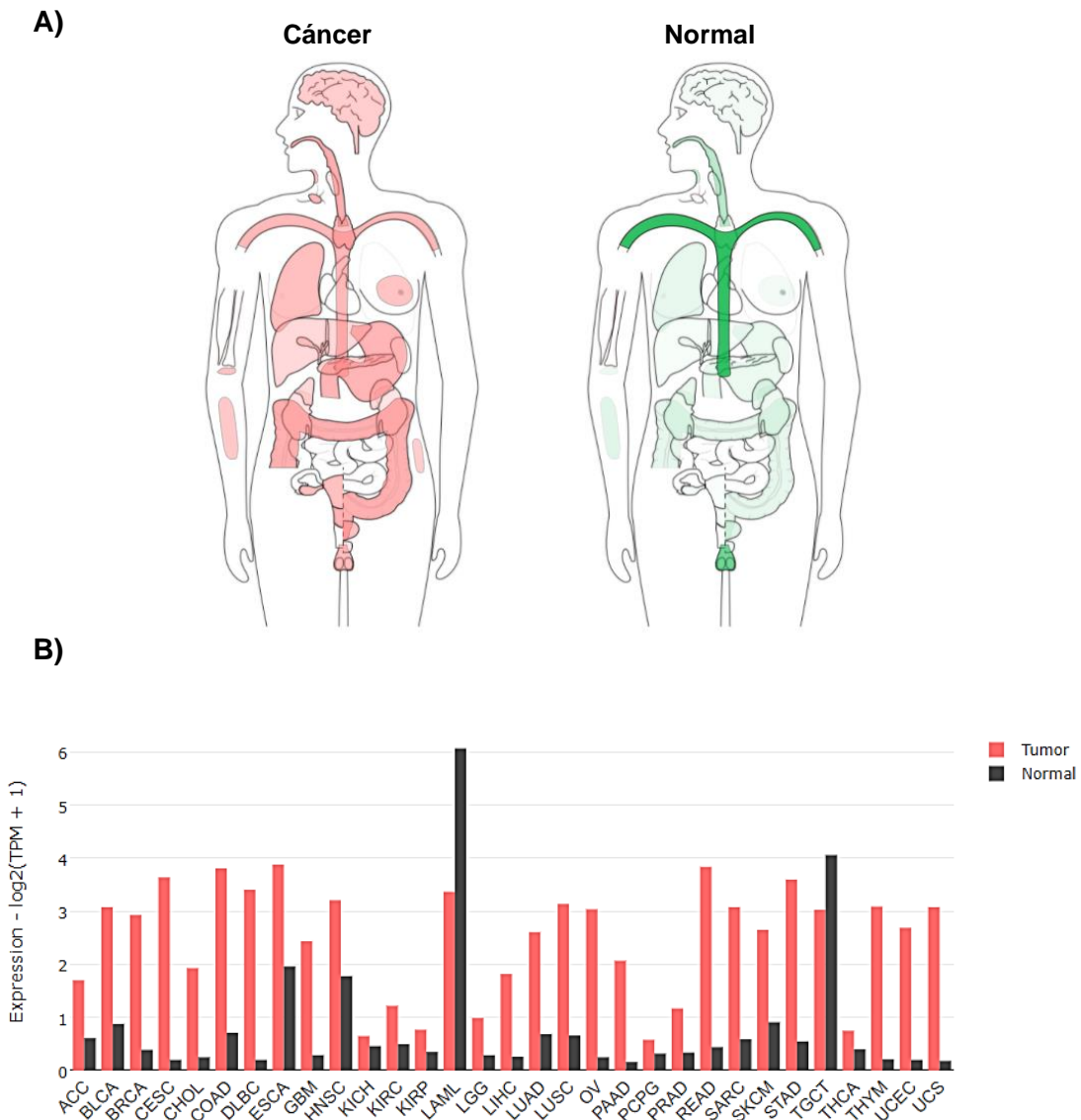


Figura 14. Expresión de *HMMR* (RNA) en cáncer y condiciones fisiológicas normales. El diagrama en **A)** y la gráfica en **B)**, ilustran la mediana de expresión $\text{Log}_2(\text{TPM} + 1)$ obtenidos por secuenciación de RNA en tejidos tumorales y tejidos sanos, entre mayor intensidad de color mayor nivel de expresión. Datos de TCGA y GETex contenidos en GEPIA (*Gene Expression Profile Interactive Analysis*), 2021.

ACC: Carcinoma adrenocortical, BLCA: Carcinoma urotelial de vejiga, BRCA: carcinoma de seno invasivo, CESC: adenocarcinoma cervical, CHOL: colangiocarcinoma, COAD: adenocarcinoma de colon, DLBC: linfoma difuso de células grandes, ESCA: carcinoma esofageal, GBM: glioblastoma multiforme, HNSC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello, KICH: cromóforo de riñón, KIRC: carcinoma de riñón células claras, KIRP: carcinoma papilar de riñón, LAML: leucemia mieloide aguda, LGG: Glioma de bajo grado, LIHC: carcinoma hepatocelular, LUAD: adenocarcinoma pulmonar, LUSC: carcinoma pulmonar escamoso, OV: cáncer de ovario, PAAD: adenocarcinoma pancreático, PCPG: Feocromocitoma y paraganglioma, PRAD: adenocarcinoma de próstata, READ: adenocarcinoma rectal, SARC: Sarcoma, SKCM: melanoma, STAD: adenocarcinoma de estómago, TGCT: carcinoma testicular de células germinales, THCA: carcinoma de tiroides, THYM: timoma, UCEC: carcinoma endometrial, UCS: carcinosarcoma uterino.

Similarmente, resultados obtenidos del Análisis en Serie de Expresión Génica (SAGE) disponible en la base de datos *Cancer Genome Anatomy Project* (CGAP) (Figura 15A) indican que *HMMR* se expresa más en cáncer de próstata, linfoma, mama, ovario, colorrectal y de tiroides (Figura 15B).

Múltiples investigaciones apuntan que la sobre-expresión de *HMMR* se vincula con la progresión del cáncer. En tumores de endometrio (Rein et al. 2003), hígado (Lu et al. 2020) y pulmón de células no pequeñas (D. Wang et al. 2016) la alta expresión de *HMMR* corresponde con un alto grado tumoral histopatológico. Por otra parte, en cáncer de vejiga se ha descrito que la sobre-expresión de *HMMR* correlaciona con un fenotipo invasivo (Niedworok et al. 2013), y en tumores colorrectal y pulmonar la expresión es elevada cuando hay metástasis (Mele et al. 2017) (D. Wang et al. 2016).

Asimismo, se ha reportado que *HMMR* regulado al alta se relaciona con el pronóstico adverso en hepatocarcinoma (Lu et al. 2020), leucemia linfocítica crónica de células B (Giannopoulos et al. 2009) y cáncer gástrico (Ishigami et al. 2011). Además, en tumores de próstata (Korkes et al. 2014) y estómago (Zhang et al. 2019) la expresión elevada de *HMMR* se vincula con la resistencia a la terapia.

De acuerdo con datos de *The Human Protein Atlas*, existe una relación entre la alta expresión de *HMMR* con una menor supervivencia ($p < 0.001$) en tumores de páncreas, hígado y pulmón, mientras que, resultados en GEPIA, indican que en leucemia mieloide aguda la baja expresión de *HMMR* se relaciona con una menor supervivencia (Figura 16A). En nuestro grupo de trabajo se midió la expresión de *HMMR* en 68 muestras de pacientes con leucemia aguda linfoblástica de células B, por PCR en tiempo real, encontrando que la alta expresión (> 0.37 *HMMR/RPS18*) se relaciona con una menor supervivencia ($p = 0.007$) (Figura 16B).

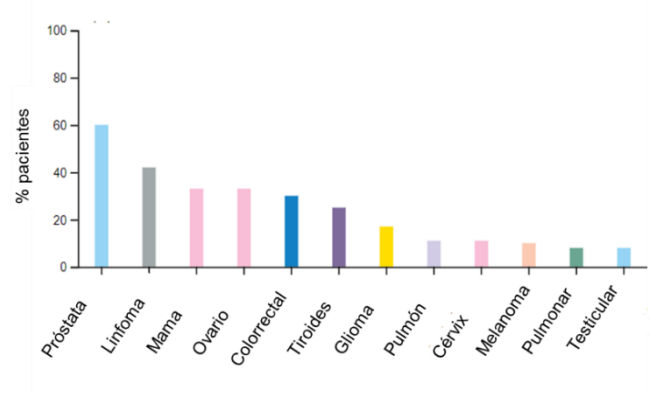
A) NORMAL **CÁNCER**

	NORMAL		CÁNCER
		cerebro	
		retina	
		tiroides	
		pulmón	
		corazón	No aplica
		mama	
		Estómago	
		páncreas	
		hígado	
		riñón	
		colon	
		peritoneo	
		columna	Sin datos
		ovario	
		placenta	No aplica
		próstata	
		Médula ósea	
	Sin datos	cartílago	
		músculo	
		piel	
		Nódulos linfáticos	
		leucocitos	Sin datos
		Células troncales	Sin datos
		Tejido vascular	Sin datos

Tags por 200,000

- <2
- 2-3
- 4-7
- 8-15
- 16-31
- 32-63
- 64-127
- 128-255
- 256-512
- >512

B)



C)

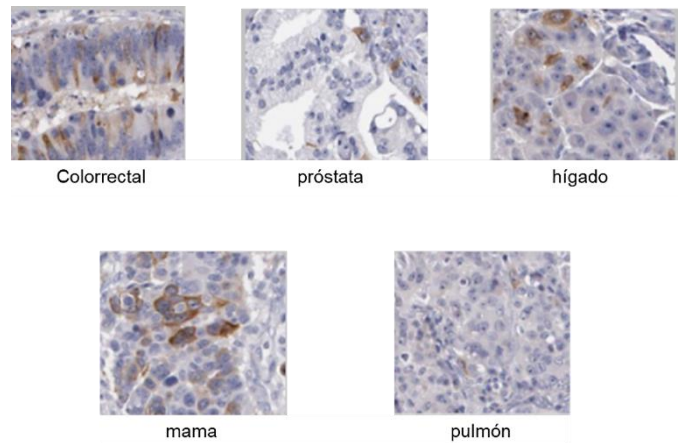
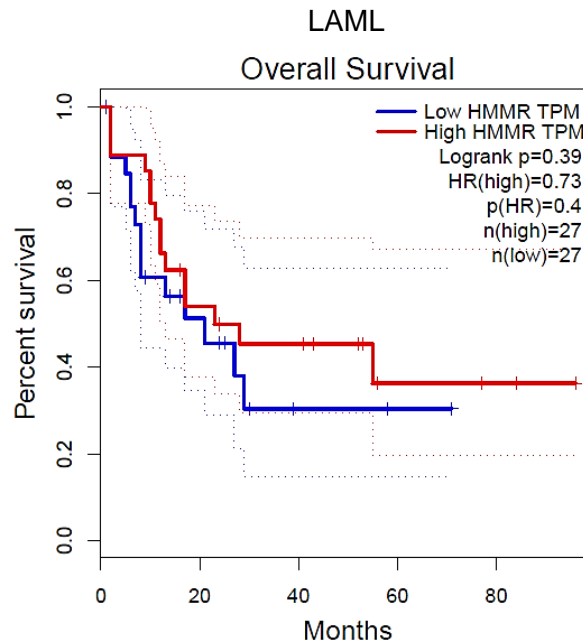


Figura 15. Expresión de *HMMR*: RNAm y proteína en condiciones normales y en cáncer.

A) SAGE de *HMMR* en diferentes tejidos (modificado de CGAP, 2019). **B)** Gráfico de porcentaje de pacientes (el 100% corresponde a 12 pacientes) con expresión proteica de HMMR (media-alta) (*The Human Protein Atlas CAB002433*, 2021) **C)** Imágenes representativas de inmunohistoquímica de HMMR en diferentes tipos de tumor (*The Human Protein Atlas*, 2021).

A)



B)

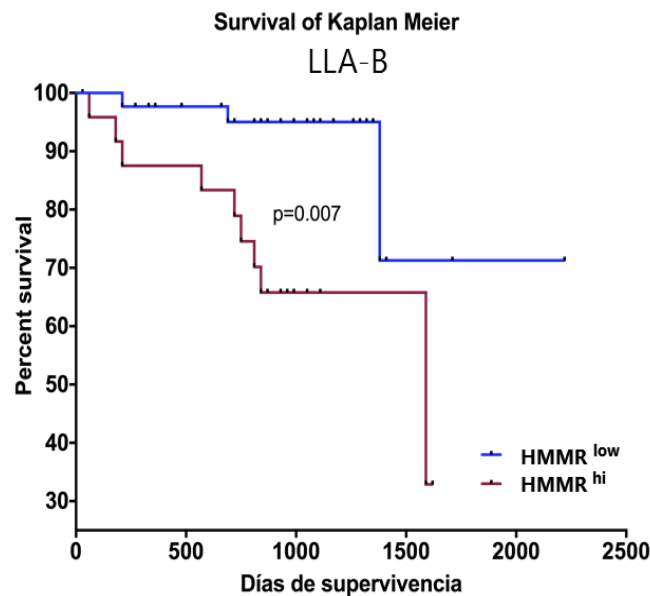


Figura 16. Curvas de supervivencia para la expresión de *HMMR* en leucemia mieloide aguda (LAML) y leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B). A) Curva de supervivencia creada en GEPIA considerando cuartiles y un intervalo de confianza al 95% B) La curva de supervivencia se construyó con datos de expresión (RNAm) obtenidos por PCR cuantitativa en un grupo de 68 muestras de pacientes con LLA-B. El punto de corte calculado fue 0.37. (Juárez, S., 2018, datos no publicados).

Respecto a las variantes de HMMR, hasta la fecha hay pocos estudios que reporten su comportamiento en cáncer. En adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas la expresión de *HMMRV3* y *HMMRV1* es alta en comparación de *HMMRV2* y *HMMRV4* (D. Wang et al. 2016). Otra investigación en muestras de pacientes con mieloma múltiple, evidenció que un valor alto de la relación de expresión (mRNA) *HMMRV3/HMMRV1* correlaciona con una menor supervivencia (Maxwell et al. 2004). Y en líneas celulares de cáncer de mama, se encontró que la baja expresión de *HMMRV1* y *HMMRV2* correlaciona con la resistencia a la radioterapia (Schütze et al. 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer representa un problema de salud a nivel mundial, en la población infantil, el tipo de neoplasia maligna más frecuente es la leucemia, siendo México uno de los países con mayor índice de morbilidad y mortalidad. Del total de casos de leucemias pediátricas cerca del 80% corresponden a leucemia linfocítica aguda B (LLA-B). Los pacientes con LLA-B se estratifican con base en el riesgo de presentar una recaída en alto o riesgo estándar, sin embargo, de los pacientes mexicanos incluidos en el grupo de riesgo estándar, más de la mitad presentan recaídas, por lo cual surge la necesidad de profundizar en la estratificación de los pacientes.

Diferentes alteraciones en los patrones de expresión génica se han vinculado con el desarrollo y la progresión del cáncer, entre ellos, la desregulación del corte y empalme del pre-mRNA, denominado como empalme aberrante. Numerosos transcritos alternativos se han relacionado con los *hallmarks* del cáncer, el pronóstico y la resistencia a la radio y quimioterapia, por lo que su estudio resulta crucial para identificar nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnóstico o pronóstico que coadyuven a la estratificación y tratamiento de los pacientes aumentando las probabilidades de sobrevida.

Entre los genes humanos que son procesados por empalme alternativo se encuentra *HMMR*, el cual codifica para el receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico. *HMMR* participa en mecanismos de motilidad y progresión del ciclo celular; en condiciones homeostáticas *HMMR* se expresa a la baja, en contraste con estados patológicos como el cáncer, donde se ha evidenciado sobre-expresión, con excepción de la leucemia mieloide aguda. La alta expresión de *HMMR* en cáncer se ha relacionado con la invasión, metástasis y menor probabilidad de sobrevida.

Hasta ahora se han descrito cuatro transcritos distintos que codifican para proteínas independientes (*HMMRV1*, *HMMRV2*, *HMMRV3* y *HMMRV4*), asimismo se ha reportado la expresión diferencial de estas variantes en muestras de adenocarcinoma pulmonar y pancreático, sugiriendo que las isoformas podrían participar de forma distinta en el proceso carcinogénico y tumorigénico. Por lo cual,

este proyecto es relevante para determinar los patrones de expresión en pacientes con LLA-B infantil y su posible asociación con características clínicas.

5. HIPÓTESIS

Las variantes alternativas de gen *HMMR* se expresarán diferencialmente en muestras de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica B, y los niveles de expresión se asociarán con las características clínicas adversas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Conocer la expresión de las variantes del receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (*HMMR*) en la Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B).

6.2 Objetivos particulares

- Determinar *in silico* el nivel de expresión de *HMMR* en pacientes con recaída de LLA-B pediátrica.
- Cuantificar los niveles de expresión relativa de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2*, *HMMRV3* y *HMMRV4* en muestras de pacientes con leucemia aguda linfoblástica B.
- Determinar el impacto pronóstico de las variantes del receptor de motilidad mediado por ácido hialurónico (*HMMR*) en pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica B.

7. METODOLOGÍA

En la Figura 17 se presenta un diagrama de flujo con la metodología empleada para el análisis computacional de la recaída de LLA-B y la cuantificación de las variantes de *HMMR* en las muestras de los pacientes de LLA-B y las muestras control. En los siguientes apartados se describen cada una de estas etapas experimentales.

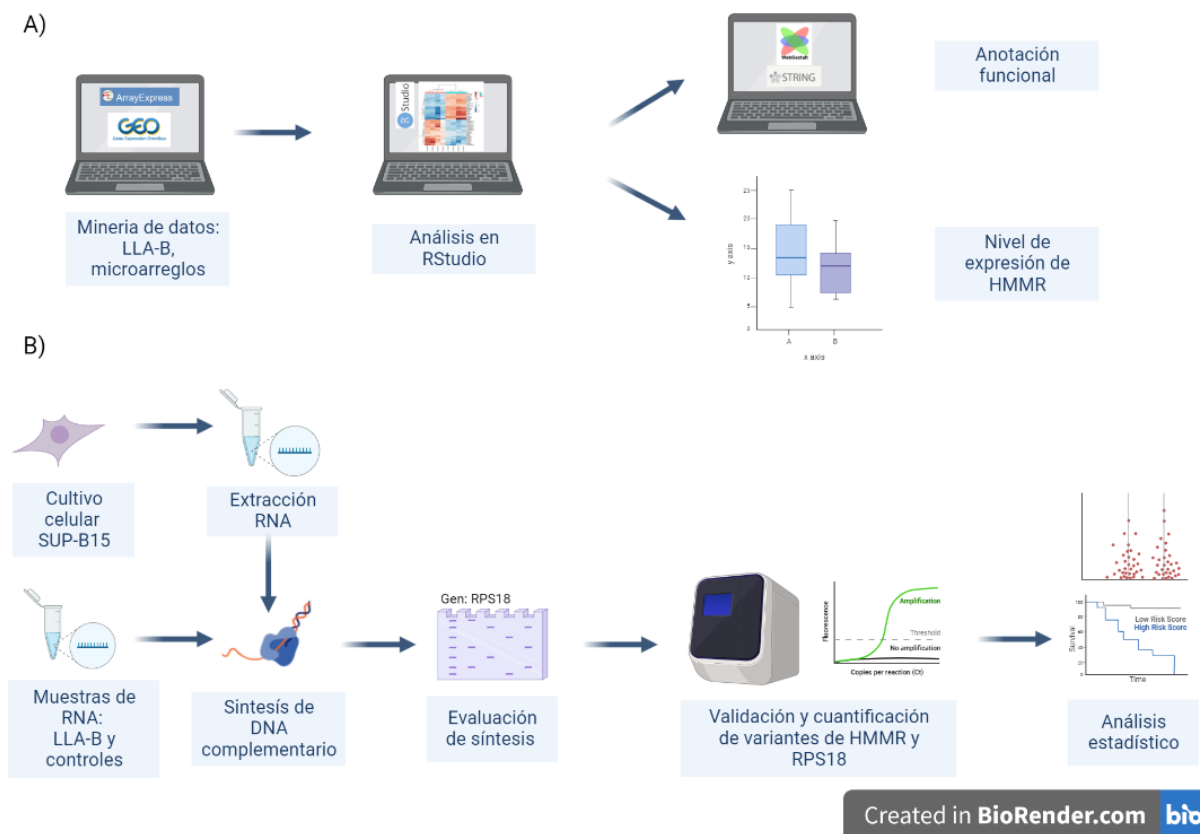


Figura 17. Diagrama metodológico para A) el análisis *in silico* de la recaída de LLA-B en niños y B) de la cuantificación de las variantes de HMMR en muestras de pacientes con LLA-B y muestras control.

7.1 Análisis *in silico* de expresión diferencial en recaída de LLA-B

Se realizó la minería de datos de expresión en dos bases de acceso público: ArrayExpress y GEO (*Gene Expression Omnibus*), la búsqueda se filtró hacia resultados de recaídas en pacientes pediátricos con LLA-B. Acorde con los criterios de inclusión y exclusión (Tabla 2) se obtuvieron un total de 93 muestras pareadas,

de tres análisis independientes (E-GEOD-18497(Staal et al. 2010), E-GEOD-28460 (Hogan et al. 2011), E-GEOD-60926 (van der Velden et al. 2016)) que utilizaron la plataforma de microarreglos *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array*.

Tabla 2. Criterios para la minería de datos en bases de datos públicas (ArrayExpress y GEO)

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Muestras de pacientes pediátricos con LLA-B	Muestras de pacientes pediátricos con otros tipos de leucemia (LLA-T, LMA, LMC)
Muestras de médula ósea	Muestras de fluido cerebro – espinal
Muestras pareadas: diagnóstico y recaída	Muestras no pareadas
Plataforma: <i>GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array</i>	Otras plataformas de microarreglos

Estos datos se organizaron en dos grupos: diagnóstico (N=93) y recaída (N=93), que fueron comparados usando bioconductor en R. El flujo de análisis inició con el control de calidad, seguido de la normalización usando la paquetería de Oligo (RMA *Robust Multichip Average*), el agrupamiento de las muestras con la construcción de un mapa de calor, la anotación de los genes expresados diferencialmente (DEGs) y el filtrado de los DEGs bajo los criterios de valor $FDR < 0.0001$ y tasa de cambio (*Fold Change FC*) ≥ 3 y ≤ -3 .

Posteriormente, la anotación funcional de los DEGs en WEBGestalt usando el método de ORA (*Over-Representation Analysis*) y la base de datos *Biological Process* y *Pathway Reactome* obteniendo las vías enriquecidas de forma significativa ($FDR < 0.05$). Y la construcción de redes de interacción en STRING (score de alta confianza 0.9).

7.2 Material biológico

La determinación de los niveles de expresión de las variantes de HMMR se cuantificó en 56 muestras de médula ósea de pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría (INP) diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda de células B obtenidas al momento del diagnóstico (Tabla 3) y 30 muestras de sangre periférica de niños sin antecedentes de neoplasias malignas ni desórdenes hematológicos. Este material biológico forma parte del banco de muestras del laboratorio de Oncología Experimental, previa firma del consentimiento informado, el cual forma parte de un protocolo de investigación aprobado por el Comité de Ética del INP 060/2016.

Tabla 3. Características de los pacientes con LLA-B incluidos en la cuantificación de las variantes de HMMR.

PACIENTES LLA-B	N= 56 (100%)
Sexo	
Femenino	30 (53.6%)
Masculino	26 (46.4%)
Edad	
Edad promedio al momento del diagnóstico	9 ± 5 años
Edad más frecuente al momento del diagnóstico	4 años (17.9%)
Grupos de edad (años)	
0-5	19 (33.9%)
6-10	16 (28.6%)
11-15	13 (23.2%)
16-18	8 (14.3%)
Presencia de recaída	27 (48.2%)
Recaída temprana	8 (29.6%)
Recaída tardía	19 (70.4%)
Sin recaída	29 (51.8%)
Vivos	38 (67.9%)
Vivos con recaída	17 (30.4%)
Vivos sin recaída	21 (37.5%)
Fallecidos	18 (32.1%)
Fallecidos con recaída	10 (17.9%)
Fallecidos sin recaída	8 (14.3%)

Las muestras tanto de médula ósea como de sangre periférica fueron procesadas para la extracción del RNA total utilizando el kit *RNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA) como se muestra más adelante (7.3). Las muestras de RNA total se conservaron en congelamiento a -70°C hasta su uso. Del mismo modo, para la estandarización del método de cuantificación relativa se utilizó RNA de la línea celular SUP-B15 (ATCC, VA USA).

7.3 Cultivo celular

La línea celular SUP-B15 (ATCC, VA USA) se creció en medio IMEM (Gibco, MA USA) suplementado con suero fetal bovino (Gibco, MA USA) al 20% y antibióticos estreptomycin (10µg/ml) penicilina (100U/ml) al 1%, bajo las siguientes condiciones: 37°C/ 5% CO₂/ 85% humedad relativa.

7.4 Extracción de RNA de línea celular

La extracción de RNA total de la línea celular SUP-B15 se realizó con el kit *RNeasy* (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, se lavaron las células con PBS 1X, se agregaron 500µL de buffer de lisis RLT y se disgregaron las células en el *TissueLyser system* (Qiagen, Valencia, CA, USA) por 2min a 25 Hz. Después se adicionó etanol al 70% en proporción 1:1 al lisado celular y se transfirió a la columna de extracción. Se neutralizó con el Buffer RW1, se realizaron dos lavados con buffer RPE y se eluyó el RNA con 35µL de agua libre de RNAasa. La concentración final de las muestras se midió en el espectrofotómetro *NanoDrop One UV-Vis* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.5 Síntesis de DNA complementario

Las muestras de RNA total se procesaron con DNAsa (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) para eliminar la contaminación por DNA, para 5µg de RNA total se usó 1U de enzima y 1µL de Buffer 10X, con agua como medio de reacción hasta un volumen final de 10µL. La reacción se incubó a 37°C por 30min, posteriormente la reacción se detuvo añadiendo 1µL de EDTA 50mM y se incubó a 65°C durante 10min.

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA) se empleó el kit *Revert Aid Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), acorde con las indicaciones emitidas por el fabricante, la reacción se llevó a cabo usando 5µg de RNA, 4µL de buffer 5X, dNTPs Mix 0.5mM, *random hexamers* 100pmol, 10U de *RiboLock RNase Inhibitor*, 200U de *RevertAid Reverse Transcriptase* y H₂O DEPC hasta un volumen final de 20µL. La reacción se incubó a 25°C durante 10min, 42°C por 1h y 70°C por 10min. La concentración final del cDNA sintetizado fue de 250ng/µL.

7.6 PCR en punto final

El cDNA sintetizado a partir de las muestras de pacientes con LLA-B, individuos sanos y la línea celular SUP-B15, se evaluaron determinando la expresión del gen constitutivo RPS18, por PCR en punto final. Para ello se usaron 7.5µL del mix comercial *KAPA 2G Fast HotStar Ready Mix* (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA), 10mM de primer sentido (5´- AATCCACGCCAGTACAAGATCCCA-3´), 10mM del primer antisentido (5´- TTTCTTCTTGGACACACCCACGGT-´3), 50ng de cDNA y H₂O DEPC hasta un volumen final de 15µL.

La mezcla de reacción se incubó a 95°C por 3min para la pre-desnaturalización, seguido de 38 ciclos de amplificación: 95°C por 15seg, temperatura de alineamiento (T_m) por 15seg y 72°C por 15 seg. Finalmente, un ciclo de extensión final a 72°C por 5min. Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% a 90Volts durante 35min, fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el fotodocumentador FUSION FX (VilberLoumart, Collégien, France).

7.7 qRT-PCR

Para cuantificar la expresión de las variantes de *HMMR* y el gen calibrador *RPS18* en las muestras biológicas, se usó PCR en tiempo real, empleando el kit comercial *Sybr Fast qPCR Master Mix (2x)* (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA). Brevemente, se preparó un master mix mezclando el reactivo *Kapa Sybr Fast* que

contiene MgCl₂ 2.5mM, H₂O DEPC, primer sentido 10μM y antisentido 10μM. 8μL de master mix y 10ng de cDNA fueron añadidos por reacción, las muestras se evaluaron por triplicado y se incluyó un control negativo sin cDNA en cada corrida.

Las mezclas de reacción se incubaron en el termociclador *Step One Real-Time PCR System* (Applied Biosystem Inc, California, USA) bajo el siguiente proceso de ciclado: 95°C por 10 min, 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15seg seguido de 30seg a la T_m de cada par de iniciadores (Tabla 4) y un ciclo a 95°C durante 15seg. Finalmente, se creó una curva de disociación en un intervalo de temperatura de 55°C a 95°C, con cuantificación cada +0.3°C.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la cuantificación relativa de las variantes de *HMMR* por qRT-PCR.

Gen	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)
<i>RPS18</i>	Sentido 5'-CAGCCAGGTCCTAGCCAATG -3'	60	82
	Antisentido 5'-CCATCTATGGGCCCGAATCT -'3		
<i>HMMR</i> V1	Sentido 5'- AATGACCCTTCTGGTTGTGC -3'	57	206
	Antisentido 5'- TTTTGAGATTCCTTCTTTGATTCCG -3'		
<i>HMMR</i> V2	Sentido 5'- CCAGGTGCTTATGATGTTAAACT -3'	57	173
	Antisentido 5'- TGAGATTCCTTTGATTCCGAAGAC -3'		
<i>HMMR</i> V3	Sentido 5'- CTTCGGAATCAAAG ATTCGTGT-3'	57	106
	Antisentido 5'- GCATTTAGCCTTGCTTCCAT -3'		
<i>HMMR</i> V4	Sentido 5'- GACCCTTCTGATTCGTGTTCT -3'	57	105
	Antisentido 5'- GCAGCATTAGCCTTGCTTC -3		

Para validar el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$, se construyeron curvas estándar empleando cDNA de la línea celular SUP-B15, el gen de referencia evaluado fue *RPS18*. Cinco puntos fueron cuantificados para la construcción de cada curva, las concentraciones de los estándares iniciaron en 100ng/μL (*HMMRV1*, *HMMRV3*) y 75ng/μL (*HMMRV2*) con un factor de dilución FD=5. Las condiciones de ciclado fueron las ya descritas.

7.8 Análisis estadístico

Los datos de expresión relativa para las tres variantes de *HMMR* se analizaron con el programa *GraphPad Prism v9*. Los valores atípicos de cada grupo se excluyeron aplicando el método de ROUT (*Robust regression and Outlier removal*) (Q=1%) y se determinó el tipo de distribución aplicando la prueba D'Agostino-Pearson ($\alpha=0.05$). Finalmente, acorde con la naturaleza de los datos, se compararon las medianas de los grupos con la prueba U-Mann Whitney (dos colas, $p<0.05$), o bien, las medias usando t-student paramétrica (dos colas, $p<0.05$).

Se construyeron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (ABC con intervalo de confianza 95%) para determinar los puntos de corte en la expresión de cada variante, calculando el índice de Youden (Sensibilidad + Especificidad-1). Una vez establecidos los puntos de corte, se construyeron curvas Kaplan Meier para la recaída y sobrevida de los pacientes, se compararon con el método Mantel-Cox (Log-rank).

8 RESULTADOS

8.1 Análisis *in silico* de datos de expresión en recaída de LLA-B: *HMMR* se sobre-expresa la recaída de LLA-B pediátrica.

Como un estudio preliminar para conocer el nivel de expresión de *HMMR* y su potencial relación con la progresión de la LLA-B, se realizó un análisis *in silico* con datos de expresión génica de pacientes pediátricos con este tipo de cáncer. Para ello, se hizo la recolección de datos en dos bases de acceso público: ArrayExpress y GEO (*Gene Expression Omnibus*).

Los datos se filtraron inicialmente por dos condiciones, el tipo de enfermedad LLA-B pediátrica y la plataforma de origen: microarreglo *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. Posteriormente los resultados se seleccionaron por el origen: médula ósea, y el tipo de muestra: pareadas (diagnóstico, recaída); con base en estos criterios, se obtuvieron 93 pacientes incluidos en el análisis.

Las muestras de los pacientes se clasificaron en dos grupos: diagnóstico (control, N=93) y recaída (problema, N=93). Estos grupos se compararon usando Bioconductor en R, en primera instancia, se analizó la intensidad de señal para cada una de las muestras, como se observa en los gráficos de caja (Figura 18A) y el histograma (Figura 18B), las muestras tienen intensidades de señal distintas entre sí, así como una amplia distribución, ambas características se encuentran más pronunciadas en el grupo problema. Estos resultados evidencian la necesidad de normalizar las señales para hacer comparables las muestras.

La normalización se llevó a cabo usando el paquete *oligo* que aplica el algoritmo RMA (*Robust Multichip Average*), los resultados de este procedimiento se muestran en los gráficos 18C y 18D, se observa que la distribución de la intensidad de señal es mínima, lo cual permite que las muestras sean comparables.

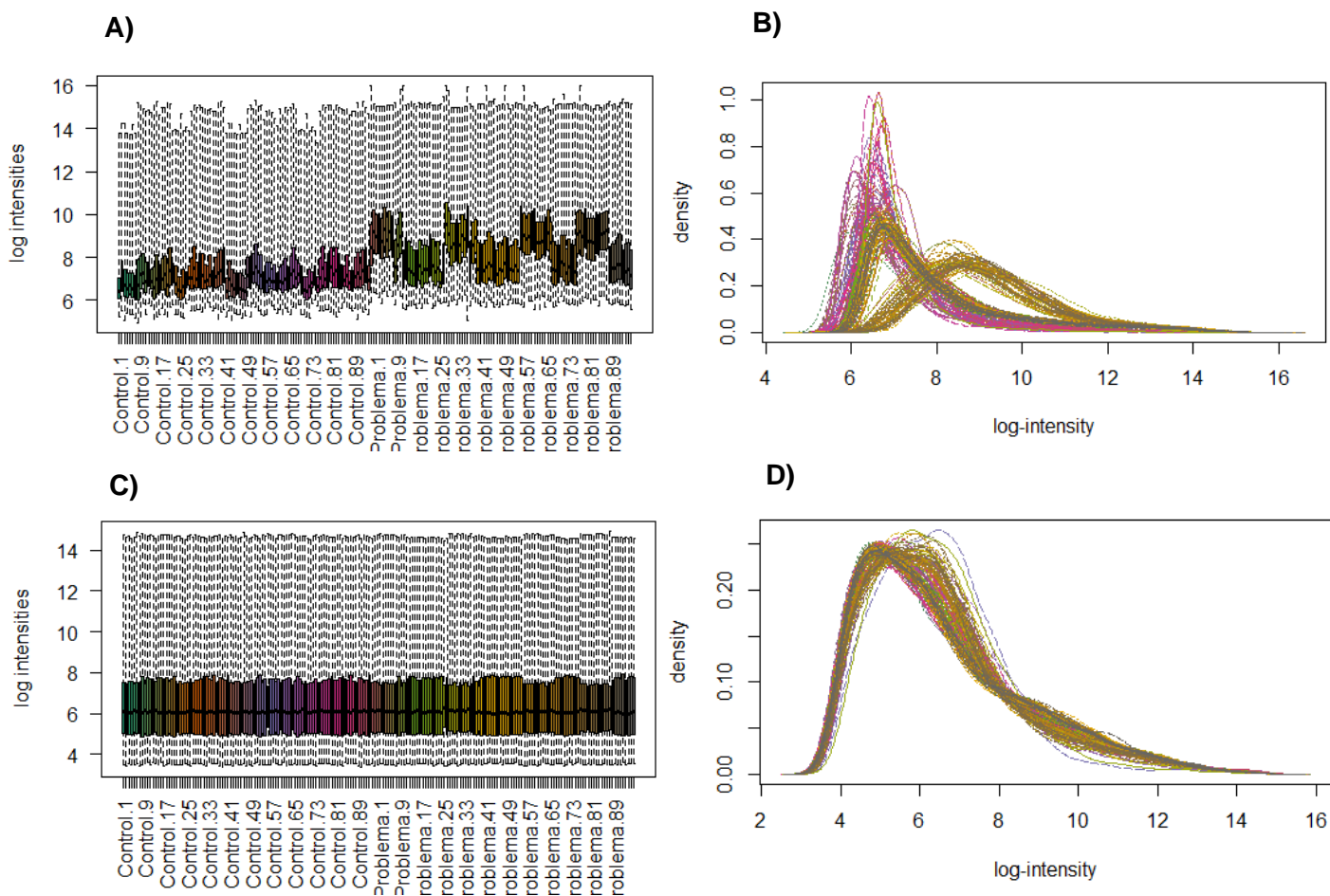


Figura 18. Gráficos de control de calidad antes y después de la normalización. A) Gráfico de caja de logaritmo de intensidad para cada una de las muestras antes de la normalización y C) después de la normalización. B) Histograma de logaritmo de intensidad para cada muestra, antes de la normalización y D) después de la normalización.

Posteriormente, se analizó el patrón de agrupamiento construyendo un mapa de calor (Figura 19A), en el gráfico se definen dos grupos de muestras, los cuales corresponden a la condición control: muestras al momento del diagnóstico y la condición problema: muestras en la recaída; esto indica que cada condición tiene un perfil distintivo de expresión génica.

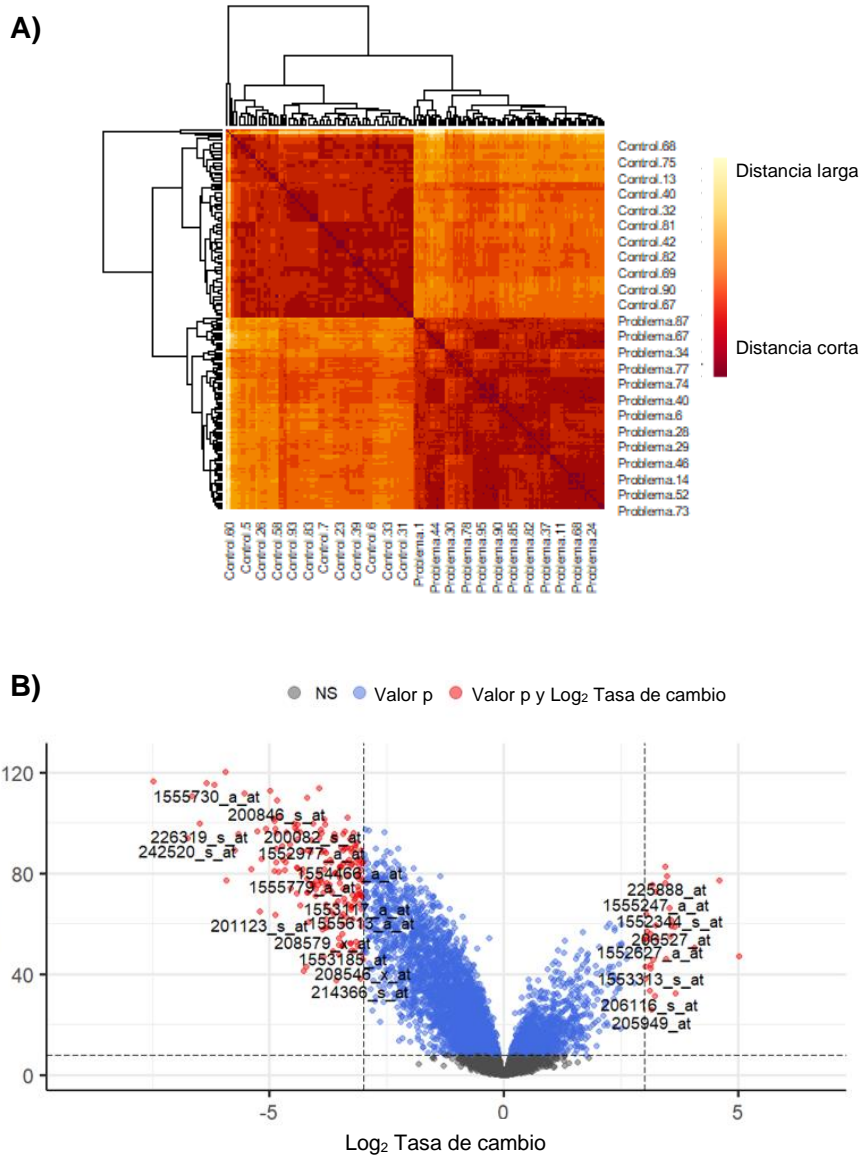


Figura 19. Análisis de expresión diferencial en la recaída de LLA-B pediátrica. A) Mapa de calor donde se observa la agrupación de las condiciones diagnóstico y recaída. B) Gráfico de volcán, los genes diferencialmente expresados en recaída de LLA-B se muestran en color rojo ($3 \geq FC \leq -3$, $FDR < 0.0001$).

Siguiendo con el análisis, se realizó la anotación de los transcritos que se expresan de forma diferencial en la recaída de LLA-B pediátrica ($3 \geq FC \leq -3$ y $FDR < 0.0001$), generando un gráfico de volcán (Figura 19B) en el cual se observa que el perfil de expresión tiene más transcritos suprimidos que sobre-expresados. Entre los genes expresados diferencialmente (DEGs) filtrados con los criterios antes señalados, *HMMR* no se incluyó, puesto que su valor de tasa de cambio fue de 1.63 con un

FDR=1.9X10⁻¹⁹, lo cual indica HMMR incrementa su expresión de forma significativa en la recaída de LLA-B en niños, aunque, por el punto de corte definido ($3 \geq FC \leq -3$ y FDR <0.0001) HMMR no alcanzó el umbral de selección.

Continuando con el análisis, los DEGs filtrados se anotaron funcionalmente usando la herramienta WEB-Gestalt (*WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit*, <http://www.webgestalt.org/>) con base en la ontología génica aplicando el método ORA (*Over-Representation Analysis*) y las bases de datos *Biological Process* y *Pathway Reactome*, obteniendo las vías enriquecidas de forma significativa (FDR<0.05) (Tabla 5).

Tabla 5. Anotación funcional de los DEGs en la recaída de LLA-B infantil.

Vía enriquecida	No. de genes anotados	Razón de enriquecimiento	FDR	Valor de p	Ontología
Empalme de mRNA	24	4.699	3.99x10 ⁻⁷	2.31X10 ⁻¹⁰	<i>Pathway Reactome</i>
Señalización por miembros de la familia TGFβ	12	4.215	3.98x10 ⁻³	2.53x10 ⁻⁵	<i>Pathway Reactome</i>
Señalización por receptores nucleares	15	2.843	2.35 x10 ⁻²	2.59x10 ⁻⁴	<i>Pathway Reactome</i>
Enfermedades infecciosas	24	2.275	1.81 x10 ⁻²	1.4 x10 ⁻⁴	<i>Pathway Reactome</i>
Metabolismo de RNA	41	2.199	2.8 x10 ⁻⁴	1.30 x10 ⁻⁶	<i>Pathway Reactome</i>
	51	2.65	4.05 x10 ⁻⁹	2.68 x10 ⁻¹²	<i>Biological Process</i>
Enfermedades de señales de transducción	22	2.096	4.95 x10 ⁻²	8.32 x10 ⁻⁵	<i>Pathway Reactome</i>
Sistema inmune	93	1.70	7.44 x10 ⁻⁶	2.15 x10 ⁻⁸	<i>Pathway Reactome</i>
	87	2.05	3.02 x10 ⁻⁸	2.33x10 ⁻⁶	<i>Biological Process</i>
Respuesta a citocinas	68	2.773	7.83 x10 ⁻¹¹	8.65 x10 ⁻¹⁵	<i>Biological process</i>
Activación celular	75	2.513	1.48x10 ⁻¹⁰	4.90 x10 ⁻¹⁴	<i>Biological process</i>
Respuesta a estrés celular	85	2.023	6.90 x10 ⁻⁸	9.92 x10 ⁻¹¹	<i>Biological process</i>
Ensamble de complejos proteicos	81	1.977	3.45 x10 ⁻⁷	9.55 x10 ⁻¹⁰	<i>Biological process</i>
Muerte celular programada	87	1.947	1.58 x10 ⁻⁷	4.02 x10 ⁻¹⁰	<i>Biological process</i>
Ciclo celular	74	1.90	5.70 x10 ⁻⁶	2.70 x10 ⁻⁸	<i>Biological process</i>
Transporte intracelular	76	1.87	6.72 x10 ⁻⁶	3.48 x10 ⁻⁸	<i>Biological process</i>
Regulación positiva de procesos biosintéticos	80	1.84	6.47 x10 ⁻⁶	3.21 x10 ⁻⁸	<i>Biological process</i>

Entre las vías anotadas con mayor razón de enriquecimiento destacan: empalme de mRNA, señalización por miembros de la familia TGF β y señalización por receptores nucleares, estos eventos se encuentran ampliamente descritos en los mecanismos oncogénicos tales como el empalme aberrante y la activación de cascadas que promueven el ciclo celular. Los DEGs anotados en estas tres vías se ingresaron en el programa STRING para la construcción de redes de interacción (Figura 20).

La interacción entre los genes anotados en la categoría de empalme de mRNA (Figura 20A) resulta bastante compleja, lo que destaca es que todos ellos se encuentran suprimidos. Por otra parte, de los 12 DEGs anotados en la señalización de miembros de la familia TGF β , siete de ellos interactúan entre sí (Figura 20B), de éstos, el receptor de TGF β y la proteína con el dominio dedos de zinc FYVE están sobre-expresados, mientras que TGF β , la fosfatasa PP1, isomerasa FKBP1A y la proteína transformante RhoA se encuentran suprimidos.

Finalmente, 13 de los 15 DEGs anotados en la vía de señalización por receptores nucleares forman una red de interacción molecular, estos genes tienen un perfil de supresión y participan en mecanismos de transcripción, reparación del DNA, conformación de la cromatina y control del ciclo celular.

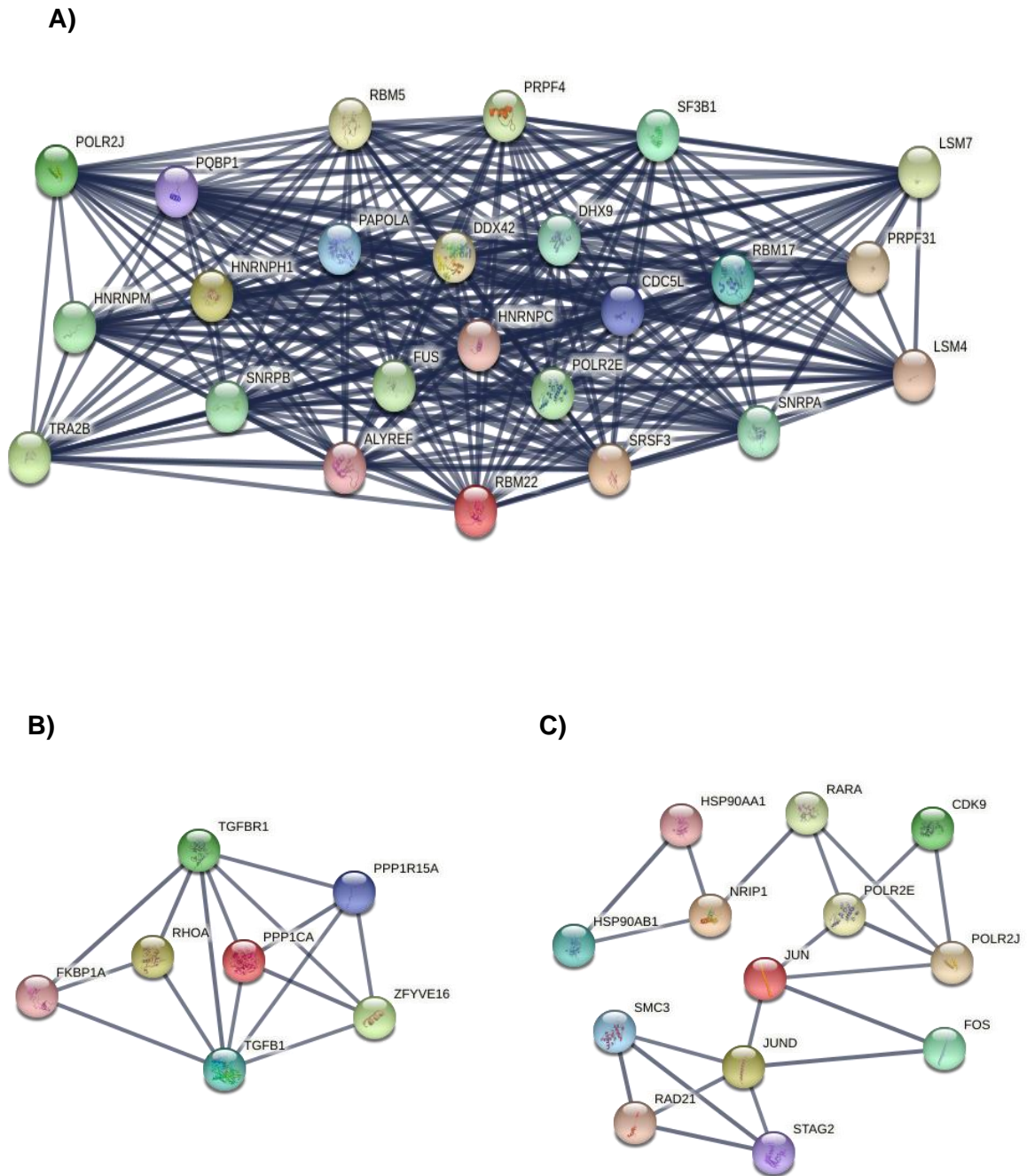


Figura 20. Redes de interacción de DEGs anotados funcionalmente en recaída de LLA-B. Para la construcción de redes se usó STRING con el score de confianza más alto (0.9). **A)** DEGs enriquecidos en *splicing* mRNA, **B)** DEGs enriquecidos en señalización por miembros de la familia TGF β y **C)** DEGs enriquecidos en señalización por receptores nucleares.

8.2 Evaluación del DNA complementario sintetizado a partir de muestras de LLA-B pediátrica y controles.

112 muestras de RNA originarias de médula ósea de niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda B y 82 de sangre periférica de niños sin neoplasias malignas ni desórdenes hematológicos fueron utilizadas para la síntesis de DNA complementario, posteriormente, la calidad del cDNA sintetizado se evaluó cualitativamente observando la expresión del gen constitutivo RPS18 por PCR en punto final (Figura 21).

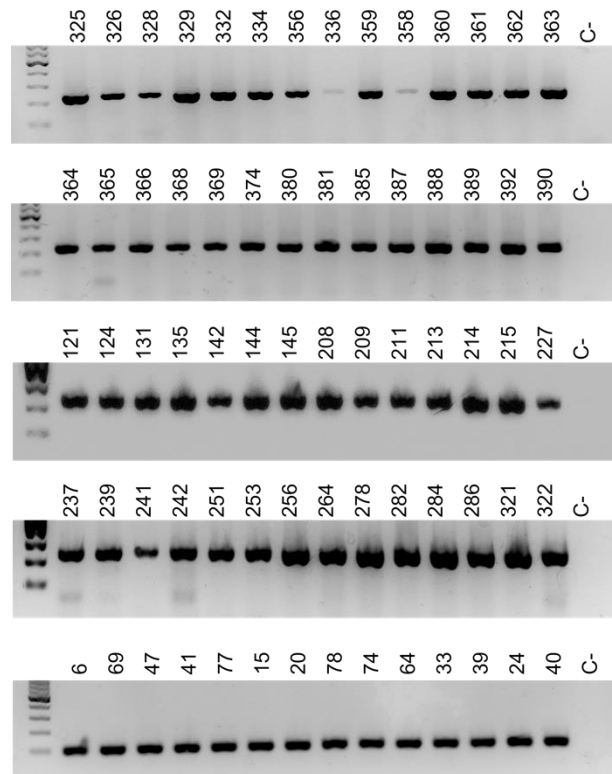


Figura 21. Evaluación del DNA complementario sintetizado a partir de muestras de LLA-B pediátrica e individuos control. Se comprobó la expresión del gen constitutivo *RPS18* en muestras de cDNA de ambos grupos: sanos y pacientes con LLA-B, los productos esperados fueron de 240pb y 82pb, ambos indican la expresión del mismo gen, se muestran geles representativos de las muestras, los cuatro primeros geles corresponden a las muestras de LLA-B y el último a las muestras control.

De las 112 muestras de LLA-B, 108 tuvieron una expresión similar de RPS18, y 81 de las 82 muestras de individuos control. De este conjunto se seleccionaron 56 muestras de pacientes con LLA-B y 30 muestras de individuos control para la cuantificación de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2*, *HMMRV3* y *HMMRV4* por PCR en tiempo real.

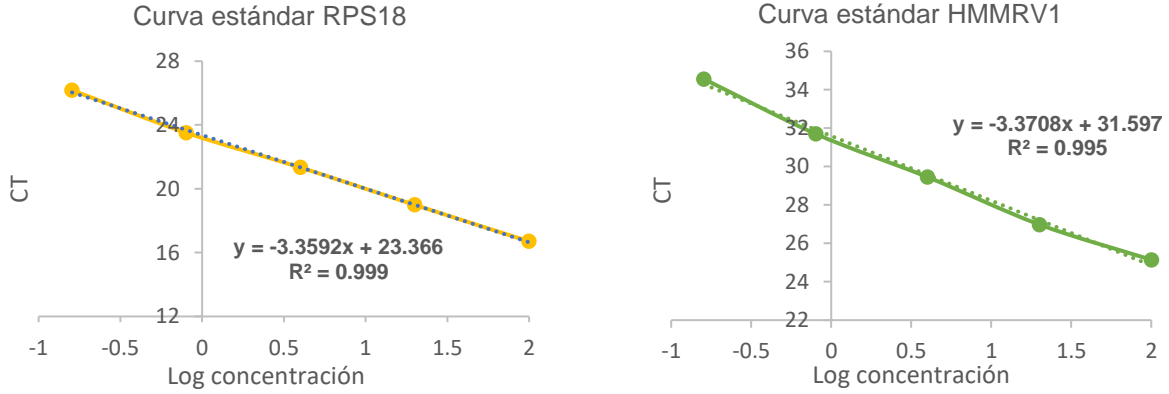
8.3 Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la cuantificación relativa por PCR en tiempo real para las variantes de *HMMR*.

Para la cuantificación de las variantes 1, 2, 3 y 4 de *HMMR*, primero se validó que el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta CT}$ fuera aplicable; para ello se construyeron curvas estándar con cDNA de la línea celular SUP-B15, un modelo de LLA previamente evaluado con el gen constitutivo RPL4 (Anexo 1). Las curvas incluyeron 5 puntos de concentración usando un factor de dilución de 5.

En la figura 22A se muestran las curvas estándar construidas para la validación de la variante *HMMRV1*. El coeficiente de correlación y los valores de pendiente, de cada curva, cumplieron con los criterios de linealidad y eficiencia de amplificación, por lo que, los valores de CT se usaron para la validación. En la figura 22D se muestra el gráfico correspondiente, el valor de la pendiente ($m = -0.016$) está dentro del intervalo (-0.1 a 0.1) que asegura eficiencias de amplificación equivalentes para ambos genes (blanco y de referencia).

Similarmente, en la figura 23 se muestran los gráficos de estandarización y validación para la medición de expresión de la variante *HMMRV2*, lo mismo que para la variante 3 (Figura 24). Los gráficos de amplificación y disociación para cada uno de los genes se encuentran en el Anexo 2.

A)



B)

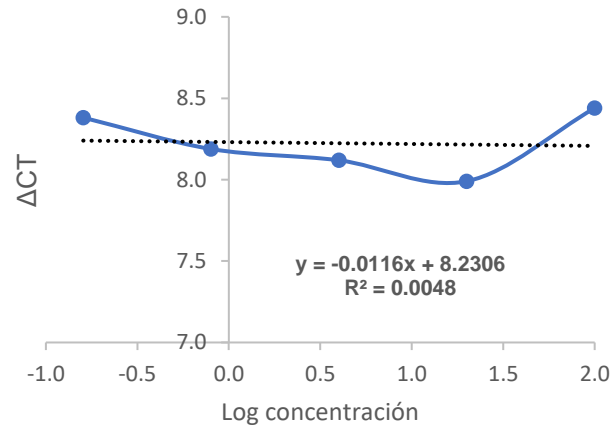
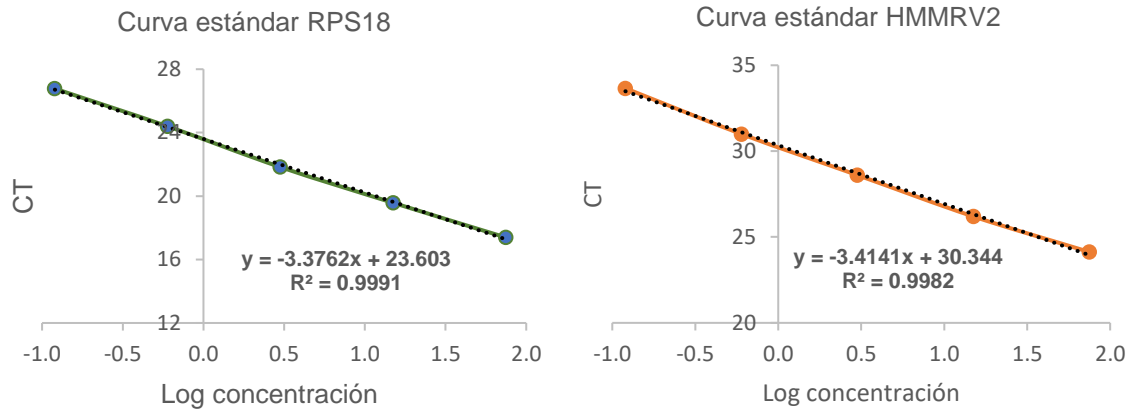


Figura 22. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la cuantificación de *HMMRV1* por PCR en tiempo real. En **A) se muestran las curvas de estandarización para el gen de referencia *RPS18* y la variante *HMMRV1* con las ecuaciones de regresión lineal, ambas curvas cumplen con los criterios de linealidad ($R^2 > 0.99$) y eficiencia de amplificación ($m = 3.32 \pm 10\%$). En **B)** se presenta la curva de validación (LogC vs ΔCT) y el valor de la pendiente, que cumple con el criterio ($m = -0.1$ a 0.1) para considerar eficiencias de amplificación similares entre los genes blanco y de referencia.**

A)



B)

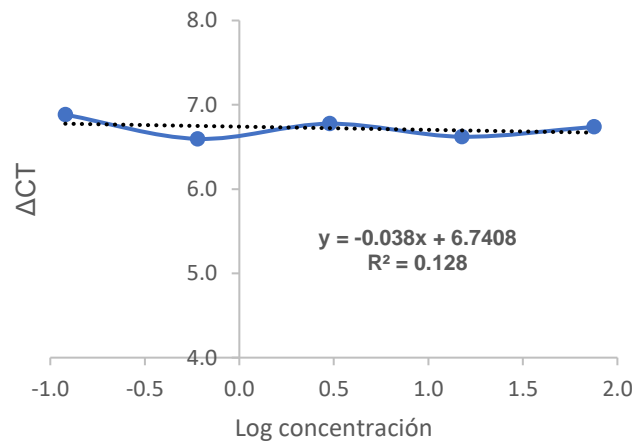
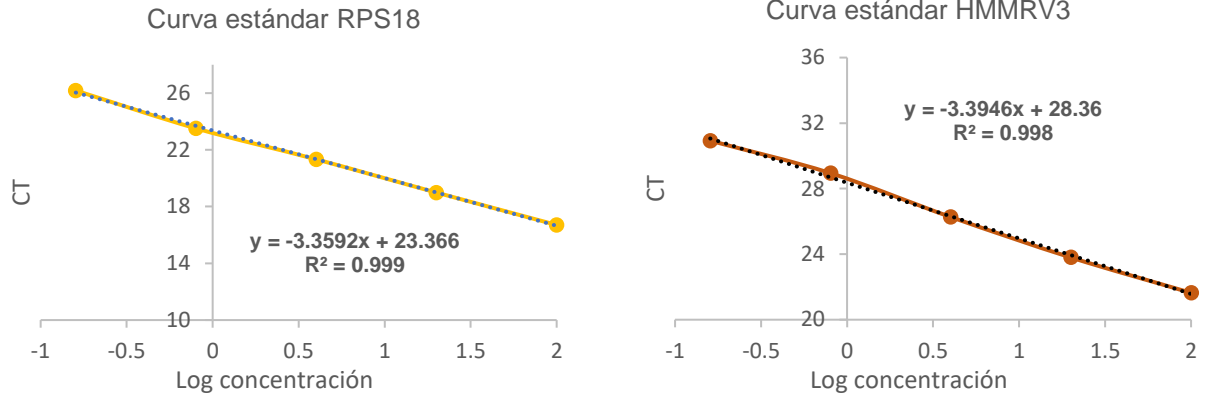


Figura 23. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la cuantificación de *HMMRV2* por PCR en tiempo real. En **A)** muestran las curvas de estandarización y las ecuaciones de regresión lineal, ambas curvas cumplen con los criterios de linealidad ($R^2 > 0.99$) y eficiencia de amplificación ($m = 3.32 \pm 10\%$). En **B)** el valor de la pendiente de la curva de validación (LogC vs ΔCT) cumple con el criterio ($m = -0.1$ a 0.1) para considerar eficiencias de amplificación similares entre los genes blanco y de referencia.

A)



B)

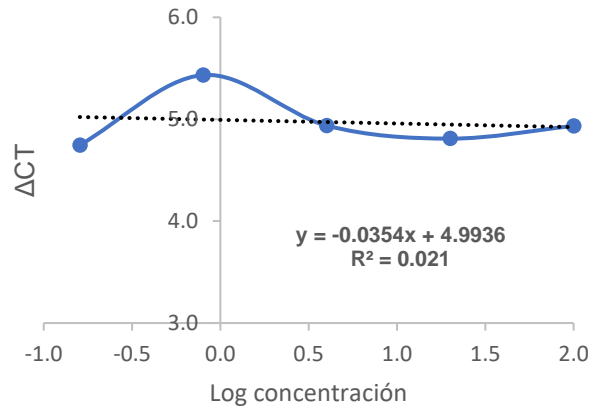


Figura 24. Validación para aplicar el método en la cuantificación de *HMMRV3* por PCR en tiempo real. En **A)** se muestran las curvas de estandarización con su respectiva ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación, ambas curvas cumplen con los criterios de eficiencia ($m = 3.32 \pm 10\%$) y linealidad ($R^2 > 0.99$). Asimismo, en **B)** se muestra el gráfico LogC vs ΔCT y el valor de la pendiente, que cumple con el criterio ($m = -0.1$ a 0.1) para considerar eficiencias de amplificación similares para ambos genes.

En el caso de la validación para la variante 4 de *HMMR* se construyeron varias curvas estándar e incluso se diseñaron oligos distintos para amplificar este transcrito, sin embargo, los valores de pendiente (m) no demostraron eficiencias de amplificación similar entre *HMMRV4* y el gen de referencia (Figura 25), esto debido a que la expresión de *HMMRV4* es muy baja en el modelo de LLA-B usado (línea celular SUP-B15), comprobando que esta variante no es relevante para la enfermedad, por lo que se excluyó de los análisis posteriores.

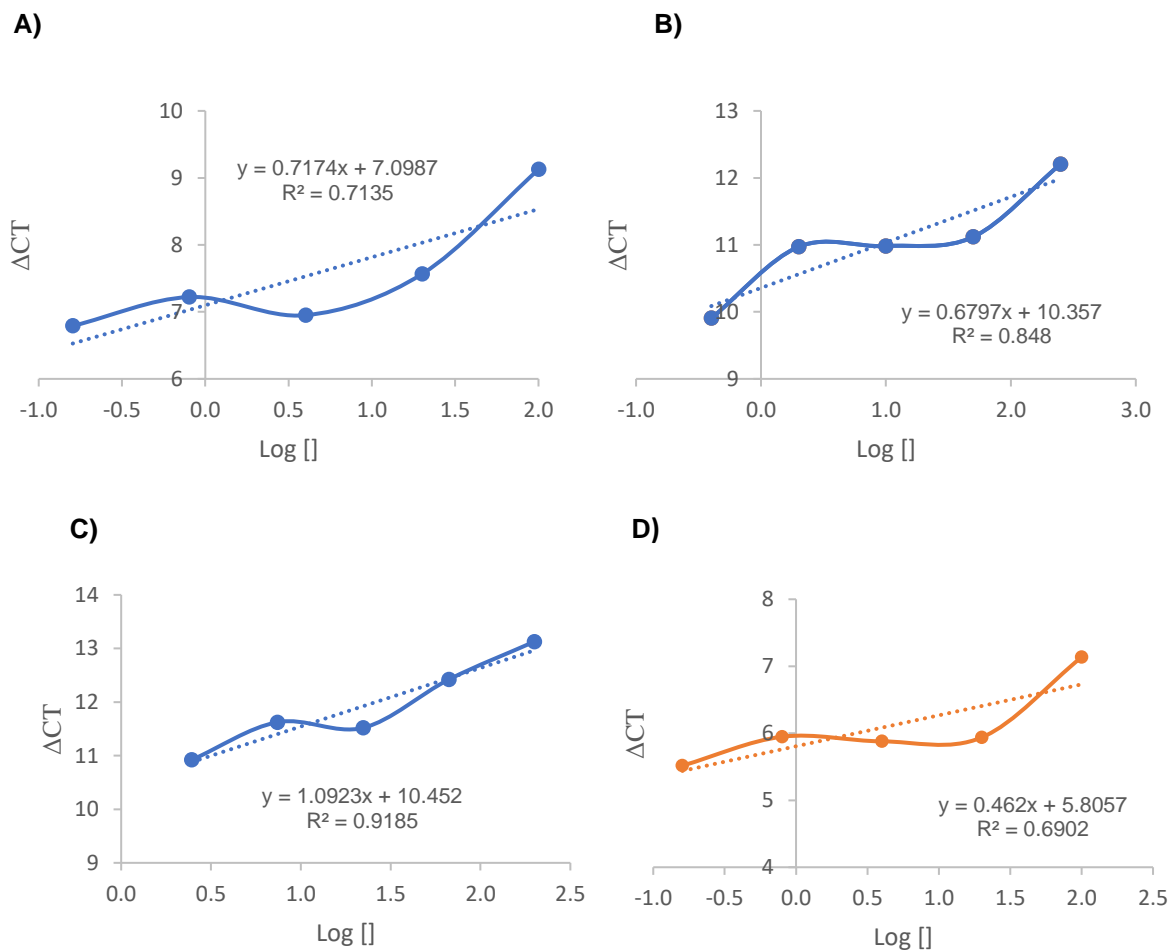


Figura 25. Curvas de validación para la cuantificación de *HMMRV4* por PCR en tiempo real. Se muestran curvas de validación construidas a partir de curvas estándar con 5 puntos, de concentración inicial (Ci) 100ng/uL y factor de dilución (FD) 5 en A), Ci=250ng/uL y FD=5 en B), y Ci=200ng/uL y FD=3 en C). En D), el gráfico corresponde a la curva de validación generada de curvas estándar con Ci=100ng/uL y FD=5 utilizando un par de primers para *HMMRV4* distintos que en el resto de las curvas. En todos los casos el valor de la pendiente está por fuera del intervalo ($m = -0.1$ a 0.1), por lo que las eficiencias de amplificación son distintas entre el gen de referencia (*RPS18*) y el transcrito de interés *HMMRV4*.

8.4 Las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* se sobre-expresan en LLA-B

Una vez que se demostró la validez del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para la cuantificación de las variantes del gen *HMMR*, se analizaron 56 pacientes con LLA-B y 30 controles. Como se observa en la figura 26, las tres variantes del gen se sobre-expresan en la enfermedad, siendo la variante 3 la de mayor expresión ($M_e=14.65$) seguida de *HMMRV2* ($M_e =7.663$) y *HMMRV1* ($M_e = 5.056$).

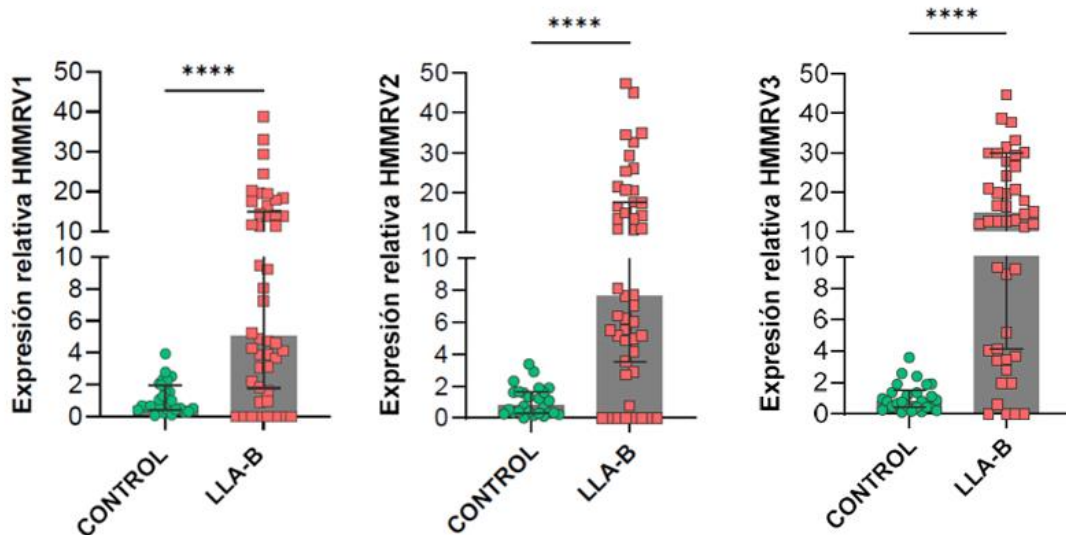


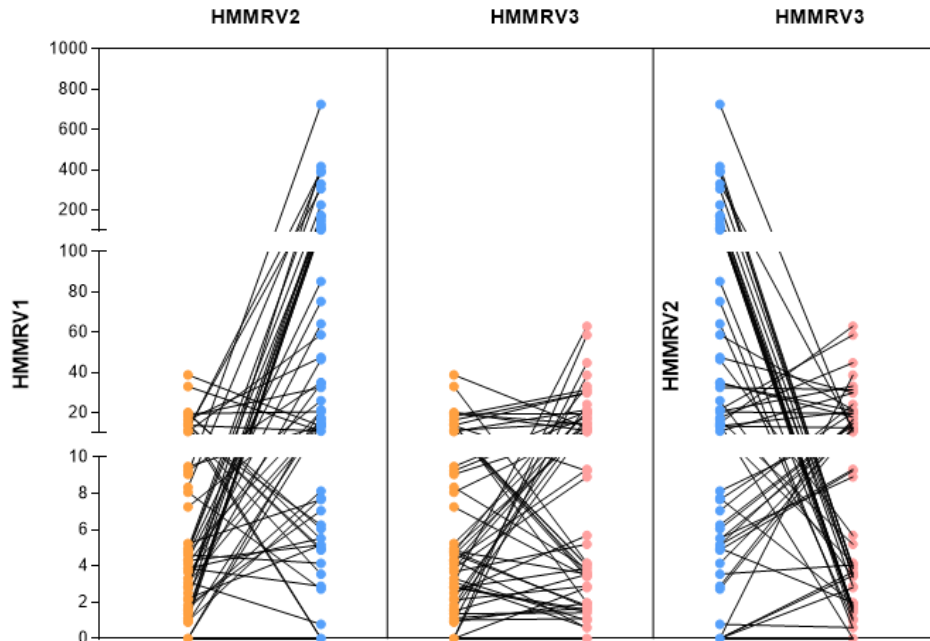
Figura 26. Expresión relativa de las variantes uno, dos y tres de *HMMR* en muestras de pacientes con LLA-B y controles. En los gráficos se presentan los valores individuales de expresión relativa para cada variante, la mediana y los rangos intercuantiles. Los grupos se compararon usando la prueba U-Mann Whitney a dos colas. *** $p < 0.0001$

Es importante mencionar que se observó que el nivel de expresión para las tres variantes muestra mayor distribución respecto al grupo control, donde el nivel de expresión es homogéneo, además, la mediana de expresión para las tres variantes en el grupo control, son menor a uno (*HMMRV1* $M_e= 0.678$, *HMMRV2* $M_e=0.783$, *HMMRV3* $M_e=0.810$), lo que nos estaría indicando que la expresión en las células hematopoyéticas normales es baja.

Para analizar si existe relación entre los niveles de expresión de las tres variantes de *HMMR* se realizó una prueba de correlación de Spearman ($p < 0.05$) (Figura 27B), obteniendo que, la expresión de *HMMRV1* y *HMMRV3* tienen correlación baja ($r=0.33$) y la expresión de *HMMRV1* y *HMMRV2* ($r=0.55$), así como la de *HMMRV2*

y *HMMRV3* ($r=0.62$) tienen correlación moderada, esto nos indica que cuando la expresión de una variante aumenta, la expresión de las demás variantes también se incrementan, patrón que se puede observar en el gráfico de la figura 27A donde la mayoría de las muestras tiene este comportamiento de expresión.

A)



B)

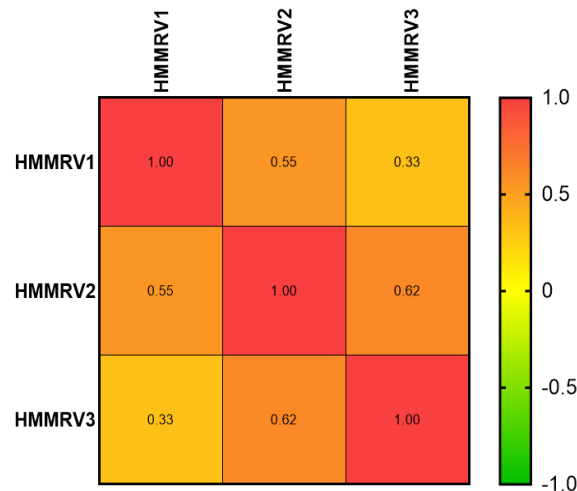


Figura 27. Análisis de correlación para la expresión de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en muestras de pacientes con LLA-B. En A) se muestran los patrones de relación entre la expresión de las variantes para cada muestra de LLA-B. En B) el mapa de calor resume los resultados de la prueba de Spearman ($p<0.05$) para analizar la correlación entre los datos de expresión de las tres variantes analizadas, se expresan los valores del coeficiente de correlación (r) para cada combinatoria.

8.5 La expresión de la variante *HMMRV1* se relaciona con la mortalidad en la LLA-B mientras que, la expresión de *HMMRV3* se relaciona con la recaída.

Al analizar los niveles de expresión con las características clínicas de los pacientes: recaída y muerte, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la alta expresión de *HMMRV1* y la muerte ($p=0.0273$) (Figura 28A). Además, observamos una tendencia similar con la expresión de *HMMRV3* (Figura 28C), sin embargo, no se observaron diferencias significativas. Por otra parte, es interesante mencionar que la expresión de la variante dos tiende a disminuir su expresión en este mismo grupo de análisis (Figura 28B).

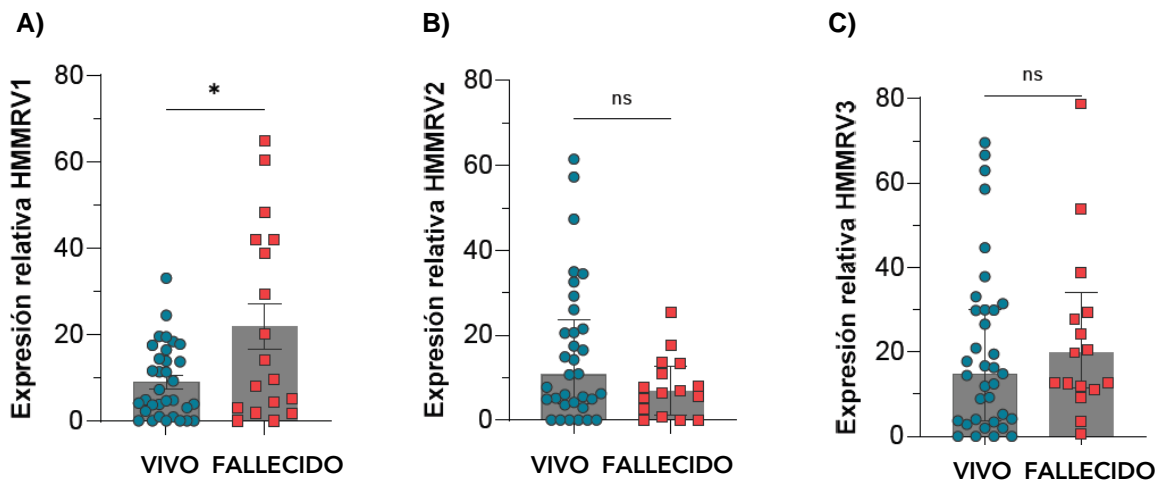


Figura 28. Expresión relativa *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en muestras de pacientes con LLA-B vivos y fallecidos. Se muestran datos individuales de expresión, así como la media (*HMMRV1*) y la mediana (*HMMRV2* y *HMMRV3*). Los grupos se compararon con la prueba t-student (*HMMRV1*, $p=0.0273$) y U-Mann Whitney (*HMMRV2* y *HMMRV3*) a dos colas, $p<0.05$.

Después, se analizó la expresión de las variantes de *HMMR* en muestras de pacientes con y sin recaída (Figura 29). En este análisis observamos que la disminución de la expresión de *HMMRV3*, se relaciona con la recaída ($p= 0.023$), a diferencia de la variante *HMMRV1* donde se observa una tendencia al incremento de expresión. Mientras que, la expresión de *HMMRV2* se observa expresión similar en la recaída y sin recaída.

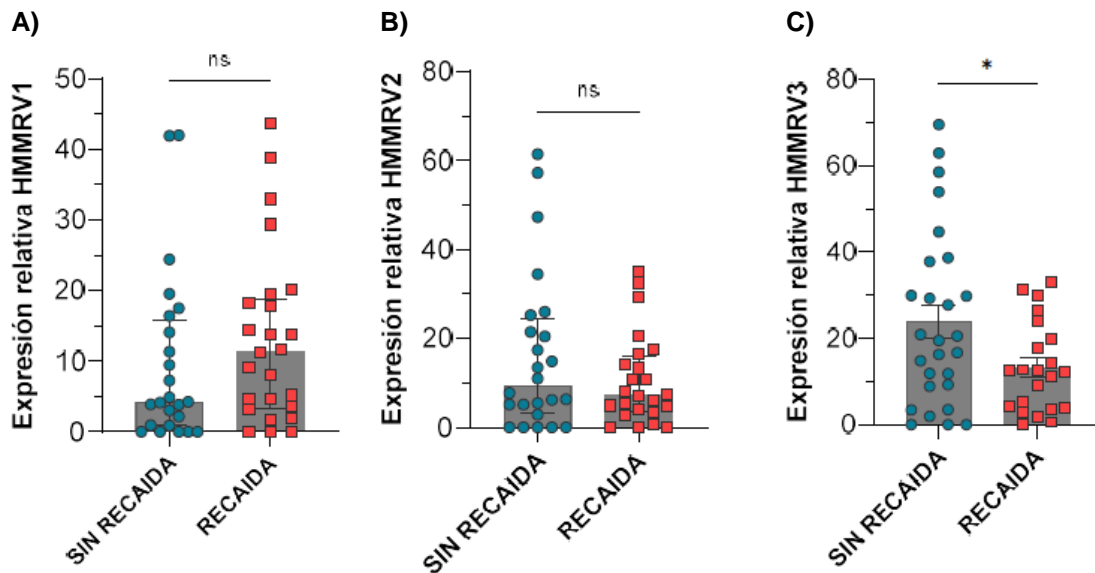


Figura 29. Expresión relativa de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en muestras de pacientes con LLA-B con y sin recaída. Los datos de expresión se agruparon acorde con la presencia de recaída, se muestran los datos individuales, así como la media y la mediana. Los grupos se compararon con la prueba t-student (*HMMRV3*, $p=0.023$) y U-Mann Whitney (*HMMRV2* y *HMMRV3*) a dos colas, $p<0.05$.

8.6 La baja expresión de *HMMRV2* y alta expresión de *HMMRV3* se relacionan con una menor supervivencia en la LLA-B.

Posteriormente, se construyeron curvas ROC para recaída y mortalidad, se calculó el índice de Youden para definir el punto de corte de la expresión de cada variante, y después se trazaron gráficos de Kaplan Meier. Con estos análisis se encontró relación estadísticamente significativa entre la baja expresión de *HMMRV2* (<13.86 , sensibilidad $S=87.5\%$, especificidad $E=45.45\%$), la alta expresión de *HMMRV3* (>9.284 , $S=88.24\%$, $E=40\%$), con una menor supervivencia de los pacientes con LLA-B (figura 30). De acuerdo con el HR, el riesgo relativo calculado fue de 2.9 veces para la baja expresión de *HMMRV2* y de 2.68 para la alta expresión de *HMMRV3* en relación con la mortalidad.

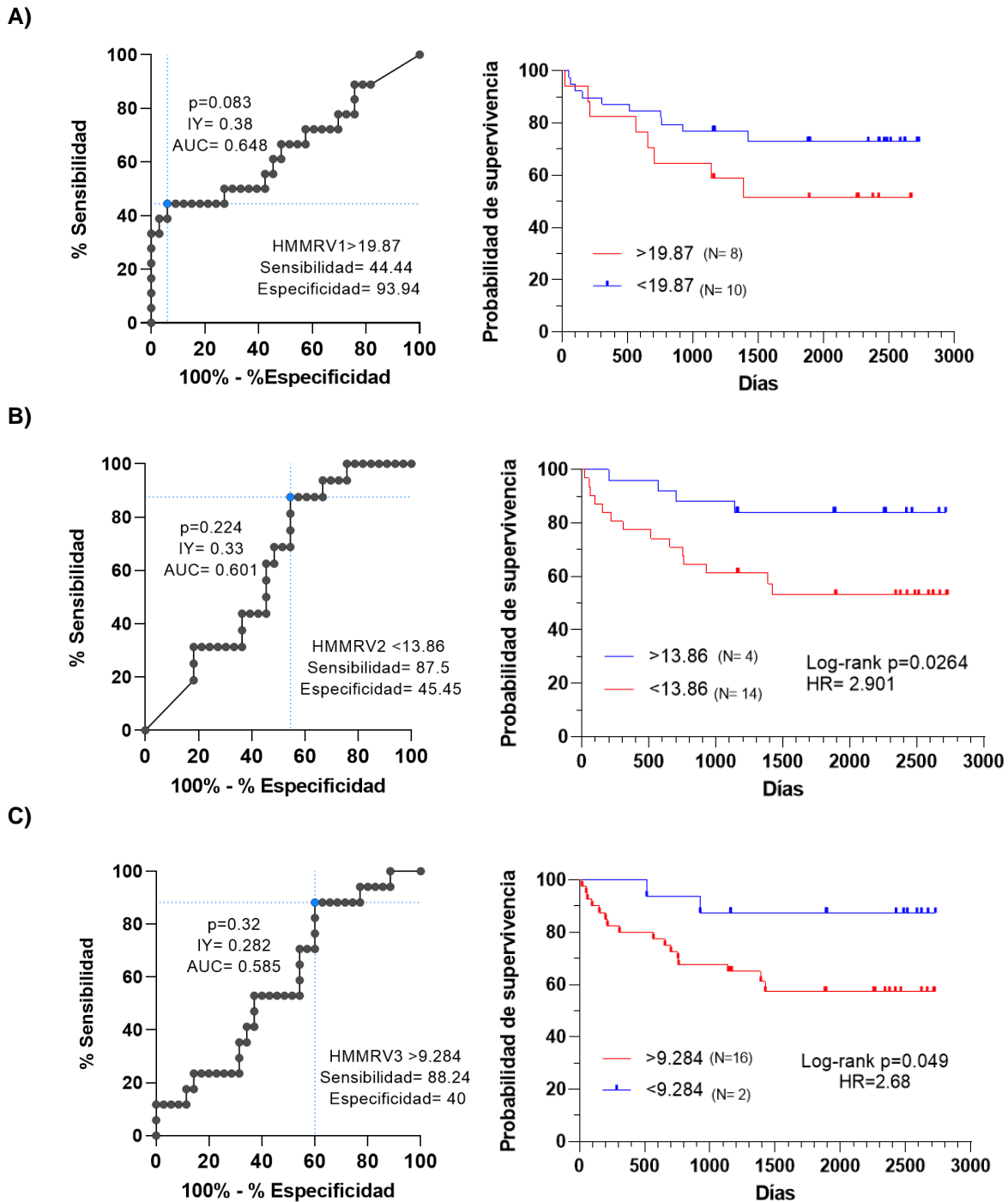
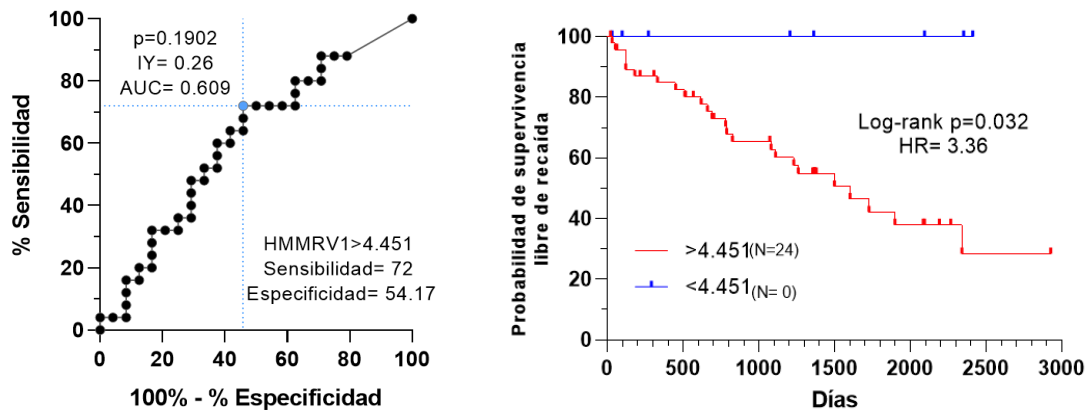


Figura 30. Curvas ROC y Kaplan Meier para la expresión de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en muestras de LLA-B. En A) se muestran los gráficos correspondientes a *HMMRV1*, en B) para la variante 2 y en C) para *HMMRV3*. En los tres casos, con la curva ROC se calculó el índice de Youden (IY) para definir el punto de corte y trazar las curvas KM que fueron comparadas con la prueba Log-rank ($p < 0.05$), se muestra el Hazard Ratio (HR) para las curvas que tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Seguendo el mismo flujo de análisis, se estudió la relación entre los niveles de expresión de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* con la recaída en la LLA-B, encontrando relación estadísticamente significativa entre la alta expresión de *HMMRV1* (>4.451, S=72%, E=54.2%) y la menor probabilidad de supervivencia libre de la enfermedad, con un HR de 3.36 (Figura 31A).

A)



B)

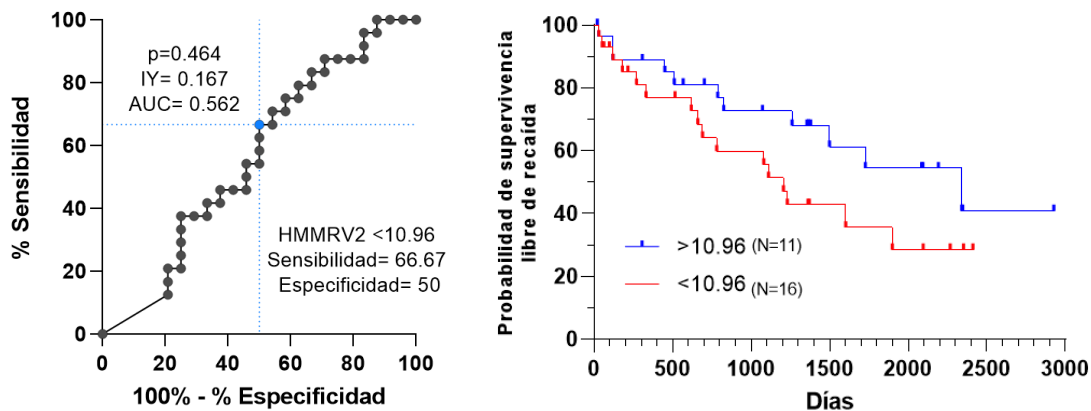


Figura 31. Curvas ROC y Kaplan Meier para la expresión de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en la recaída de LLA-B. En A) se muestran los gráficos correspondientes a *HMMRV1*, en B) para la variante 2 y en C) para *HMMRV3*. En los tres casos, con la curva ROC se calculó el índice de Youden (IY) para definir el punto de corte y trazar las curvas KM que fueron comparadas con la prueba Log-rank ($p < 0.05$), se muestra el Hazard Ratio (HR) para las curvas que tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

C)

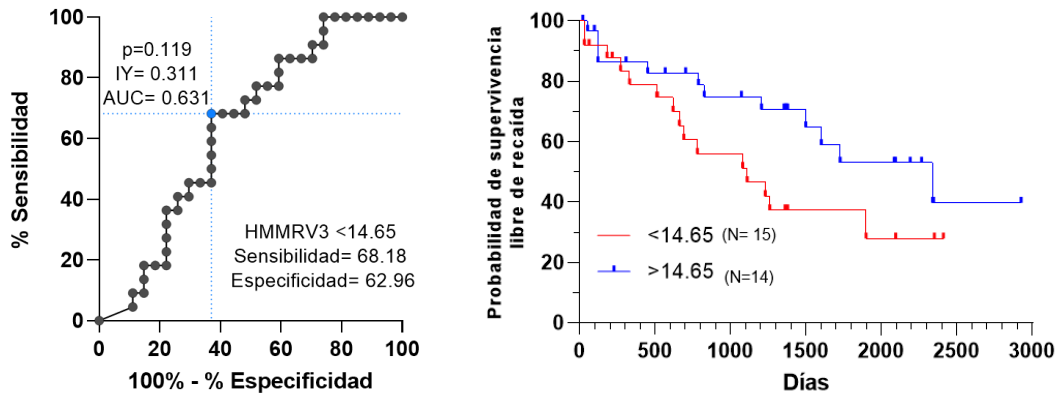


Figura 31. Curvas ROC y Kaplan Meier para la expresión de *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* en la recaída de LLA-B. En A) se muestran los gráficos correspondientes a *HMMRV1*, en B) para la variante 2 y en C) para *HMMRV3*. En los tres casos, con la curva ROC se calculó el índice de Youden (IY) para definir el punto de corte y trazar las curvas KM que fueron comparadas con la prueba Log-rank ($p<0.05$), se muestra el Hazard Ratio (HR) para las curvas que tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cáncer representa un problema de salud mundial (Ferlay et al. 2021), durante la infancia el tipo de neoplasia maligna más frecuente es la leucemia (IARC 2020). En la población mexicana esta enfermedad tiene altos índices de recaída y mortalidad, además, un estudio retrospectivo evidenció que en México la tasa de supervivencia se ha mantenido constante (Muñoz-Aguirre et al. 2021) a diferencia de otros países como Estados Unidos donde la tasa de supervivencia ha incrementado con el paso del tiempo (Hunger and Mullighan 2015).

De los subtipos de leucemia, la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) es la más común, se sabe que el 25% de los pacientes mexicanos con LLA-B tienen recaída y que sólo el 65% sobrevive 5 años (Jiménez-Hernández et al. 2015) (Muñoz-Aguirre et al. 2021), en comparación con países desarrollados donde la supervivencia rebasa el 90% (Juárez-Avendaño et al. 2020). Entre los factores influyentes están la estratificación de los pacientes con base en el riesgo y el monitoreo de la enfermedad mínima residual (Juárez-Avendaño et al. 2020) (Namayandeh et al. 2020).

Por tratarse de una enfermedad cuyo origen es multifactorial, diversas investigaciones se han enfocado en identificar alteraciones a nivel de DNA y RNA que se asocien con el desarrollo y la progresión de este tipo de cáncer. Entre los hallazgos se han evidenciado alteraciones en la expresión de isoformas, por ejemplo el transcrito alternativo del gen CD19, caracterizado por la delección del exón 2, resulta en una proteína que impide la unión del fármaco a su sitio diana, participando en la resistencia al tratamiento, por lo que dicha isoforma resulta ser un potencial blanco terapéutico (Sotillo et al. 2015).

Aproximadamente el 90% de los genes humanos tienen transcritos alternativos (E. T. Wang et al. 2008), por lo que el transcriptoma resulta diverso y dinámico, de aquí que su estudio sea relevante para comprender los procesos celulares que se gestan en el inicio y la progresión de una enfermedad. Los análisis transcriptómicos y genómicos permiten identificar las vías de señalización asociadas con distintas condiciones celulares, además que señalan genes con potencial como

biomarcadores ya sea diagnóstico, pronóstico o predictivos.

En este trabajo se analizó el perfil de expresión diferencial en la recaída de LLA-B con la finalidad de conocer el nivel de expresión del gen *HMMR* e identificar los procesos o cascadas de señalización celular implicadas en el retorno de la enfermedad. Entre las vías que se anotaron con los genes expresados diferencialmente en la recaída de LLA-B destaca el procesamiento del RNAm por *splicing*, resulta interesante que los genes anotados en esta categoría, correspondientes a factores de ensamble del complejo catalítico y proteínas accesorias, están suprimidos, lo cual implica que la expresión de transcritos alternativos esté desregulada, modificando las funciones celulares normales, fenómeno que se ha descrito en distintas enfermedades y neoplasias malignas bajo la denominación de empalme aberrante (Singh and Eyras 2017). Un análisis que permita definir el perfil de expresión a nivel de transcritos alternativos en la recaída de LLA-B resultaría útil para identificar las isoformas que contribuyen al retorno de la enfermedad.

Existen numerosas investigaciones que evidencian la sobre-expresión de *HMMR* en distintos tipos de cáncer, tanto a nivel de RNAm como de proteína, asimismo se ha demostrado la relación que existe entre altos niveles de expresión con fenotipos agresivos de la enfermedad, por ejemplo, en cáncer de vejiga invasivo la expresión de *HMMR* es mayor en comparación con el tipo no invasivo (Niedworok et al. 2013). Sin embargo, actualmente no hay reportes sobre el nivel de expresión de *HMMR* en la LLA-B, ni ninguna asociación con el pronóstico de la enfermedad. En este sentido, el análisis *in silico* realizado aportó información relevante, pues se encontró que la expresión de *HMMR* incrementa cuando se presenta una recaída en la LLA-B, con un nivel de cambio del 1.63 (FDR=1.9X10⁻¹⁹), este resultado sugirió que la participación de *HMMR* está relacionada con la recurrencia de la enfermedad, en conjunto con evidencia previa en el grupo de trabajo, donde se encontró que la alta expresión de *HMMR* se relaciona con una menor supervivencia en la LLA-B (Juárez M., 2018, datos no publicados) y que, el abatimiento de *HMMR* reduce la movilidad y viabilidad en un modelo celular, se piensa que la contribución de *HMMR* en la

progresión de la enfermedad resulta crucial (comunicación pernal en preparación).

HMMR es procesado por empalme alternativo generando cuatro transcritos que codifican para proteínas independientes, existen pocas publicaciones de las variantes de *HMMR* en cáncer y ninguna en LLA-B, de modo que, la estrategia seguida para estudiar si las variantes alternativas del gen *HMMR* contribuyen de forma independiente en la progresión de la LLA-B fue medir la expresión de cada transcrito alternativo codificante, en pacientes e individuos sanos. Encontramos que las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* se sobre-expresan cuando existe la enfermedad, y contrario a lo reportado en algunos artículos donde muestran alta expresión de *HMMR* en sangre periférica de individuos sanos (Tang et al. 2017) (Snauwaert et al. 2012), la expresión de las cuatro variantes fue mínima en controles.

La variante *HMMRV3* fue la de mayor expresión en los pacientes con LLA-B. Resultados similares se obtuvieron en investigaciones de adenocarcinoma pulmonar (D. Wang et al. 2016), tumor pancreático neuroendócrino (Choi et al. 2019) y leucemia linfoblástica crónica de células B (Giannopoulos et al. 2009), donde los mayores niveles de expresión correspondieron a *HMMRV3* por lo que se hipotetiza que esta variante podría asociarse con características clínicas adversas y ser un potencial biomarcador pronóstico.

Interesantemente, la expresión de *HMMRV4* fue muy baja en células SUP-B15, las cuales, fueron utilizadas como modelo de LLA-B, razón por la que en muestras de pacientes y controles no fue posible realizar la cuantificación, esto nos hizo pensar que la participación de la variante *HMMRV4* en la enfermedad no resulta crucial. Resultados similares se encontraron en cáncer de vejiga donde la expresión de *HMMRV4* es baja tanto en muestras neoplásicas como sanas (D. Yang et al. 2019), sin embargo, en tumores de endometrio la variante 4 de *HMMR* es la que tiene mayor nivel de sobre-expresión (Schatz-Siemers et al. 2020), lo que sugiere que esta variante pudiera estar regulada de manera distinta de acuerdo al contexto biológico tal como la estirpe celular.

Las variantes *HMMRV3* y *HMMRV4* se caracterizan porque ambas carecen del exón 4, razón por la que algunos autores hipotetizan que la ausencia de esta región confiere capacidades oncogénicas a las proteínas resultantes, esto en cáncer de mama donde se ha visto que la alta expresión de las variantes 3 y 4 de *HMMR* no influye en el efecto apoptótico de la radiación a diferencia de las variantes *HMMRV1* y *HMMRV2* (Schütze et al. 2016), y en tumores de endometrio donde se evidenció que las variantes 3 y 4 son las de mayor expresión en un fenotipo invasivo (Schatz-Siemers et al. 2020).

Algunas investigaciones señalan que *HMMRV3* confiere mayor potencial oncogénico a las células, por ejemplo, en mieloma múltiple la expresión de *HMMRV3* contribuye a la inestabilidad genética y anormalidades mitóticas (Maxwell et al. 2004), mientras que, en un modelo murino de cáncer pancreático la expresión de *HMMRV3* a diferencia de la variante canónica (*HMMRV1*) es capaz de promover metástasis a hígado (Choi et al. 2019). Debido a que *HMMRV3* se expresa de forma diferencial en diferentes tipos de neoplasias, incluido el cáncer pancreático, Chen y colaboradores eligieron a esta variante de *HMMR* como target para dirigir nanopartículas con RNAs de interferencia contra el transcrito alternativo pro-apoptótico Bcl-xL, suprimiendo el crecimiento del tumor (X. Chen et al. 2021).

Nosotros encontramos que la alta expresión de *HMMRV3* se asocia con una menor supervivencia de los pacientes con LLA-B e interesantemente, en los pacientes con recaída la expresión de *HMMRV3* es significativamente menor que en los pacientes sin recaída, esto puede explicarse porque las recaídas no evolucionan directamente a la muerte, es decir que, no todos los pacientes que fallecieron presentaron recaída. En este sentido la alta expresión de *HMMRV3* confiere un peor pronóstico para los pacientes, que podría ser resultado de la activación de la cascada EGFR, asociada con la proliferación y migración celular, previamente reportado en adenocarcinoma ductal pancreático (D. Wang et al. 2016). Por otro lado, nuestros resultados indican que los pacientes con recaída de LLA-B y pacientes fallecidos tienen sobre-expresión de *HMMRV1* y expresión baja de *HMMRV2*, es decir que, *HMMRV1* actúa como factor de riesgo mientras que *HMMRV2* como factor

protector. Un comportamiento similar se ha encontrado en cáncer de endometrio donde *HMMRV1* está *sobre-expresado* pero *HMMRV2* no (Schatz-Siemers et al. 2020). Es posible que las variantes *HMMRV1* y *HMMRV2* activen diferentes vías de señalización pues aunque tienen gran similitud en su secuencia, dado que *HMMRV2* sólo carece de 3 bases que se traducen en una lisina menos que la proteína canónica (*HMMRV1*), este cambio podría influir en la estabilidad y el reconocimiento molecular debido al carácter anfipático del aminoácido que permite distintas interacciones químicas, como los puentes salinos y de hidrógeno (Betts and Russell 2003), además que la lisina es susceptible a modificaciones postraduccionales como la metilación y acetilación (Luo 2018) por lo que su carencia podría influir directamente en la regulación de proteínas asociadas a esta variante.

En la tabla 6 se comparan los resultados de evaluar *HMMR* total y las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* de forma independiente; el resultado que destaca es que cuando se evalúa *HMMR* total no se encuentra asociación entre el valor de expresión y la presencia de recaída, sin embargo, al evaluar de forma independiente las variantes, vemos que la alta expresión de *HMMRV1* se relaciona con un mayor riesgo del retorno de la enfermedad. Y con respecto a la mortalidad la alta expresión de *HMMR* total se relaciona con una mayor probabilidad de muerte, lo mismo que una baja expresión de *HMMRV2* y alta expresión de *HMMRV3*.

Tabla 6. Comparación entre los resultados estadísticos obtenidos con la evaluación de HMMR total y las variantes.

		Cuantificación de cada variante de HMMR (N=56 pacientes con LLA-B)		
Asociación con características clínicas adversas	HMMR total*	HMMRV1	HMMRV2	HMMRV3
RECAÍDA	Valor de p>0.05	Punto de corte 4.45 Sensibilidad 72% Especificidad 54% Valor de p=0.032 Hazard ratio= 3.36	Valor de p>0.05	Valor de p>0.05
MORTALIDAD	Punto de corte 0.37 Sensibilidad 75% Especificidad 71% Valor de p=0.007 Hazard ratio= 5.037	Valor de p>0.05	Punto de corte <13.86 Sensibilidad 87.5% Especificidad 45.5% Valor de p= 0.026 Hazard ratio= 2.9	Punto de corte >9.28 Sensibilidad 88% Especificidad 40% Valor de p= 0.049 Hazard ratio= 2.68

*N=68 pacientes con LLA-B

Con base en la asociación entre los niveles de expresión y las características clínicas de los pacientes con LLA-B así como lo reportado en otras investigaciones referentes a HMMR y el cáncer, se propone un esquema con las posibles funciones de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* (Figura 32). La vía de Erk 1/2 se ha relacionado extensamente con la carcinogénesis, nuestros resultados podrían estar sugiriendo que en la leucemia aguda linfoblástica de células B, esta vía se encuentra activada por *HMMRV3* tanto extracelular como intracelularmente, puesto que esta variante es la que se ha visto tiene mayor potencial oncogénico. Por otro lado, se ha reportado que *HMMRV1* incrementa su expresión durante la mitosis a diferencia de *HMMRV3* (Maxwell et al. 2004), lo que nos hace pensar que podría estar activando la señalización de la vía aurora cinasa A (AURKA) y por lo tanto, promoviendo la progresión del ciclo celular. Finalmente, al observar que la baja expresión de HMMRV2 se relaciona con un pobre pronóstico de los pacientes con

LLA-B, especulamos que esta isoforma se une a los filamentos de actina y que su supresión podría relacionarse con cambios en la estructura y la motilidad celular, sin embargo, el presente análisis no aporta evidencia funcional concreta por lo que más estudios son necesarios para demostrar las funciones celulares propuestas para cada una de las isoformas de *HMMR*.

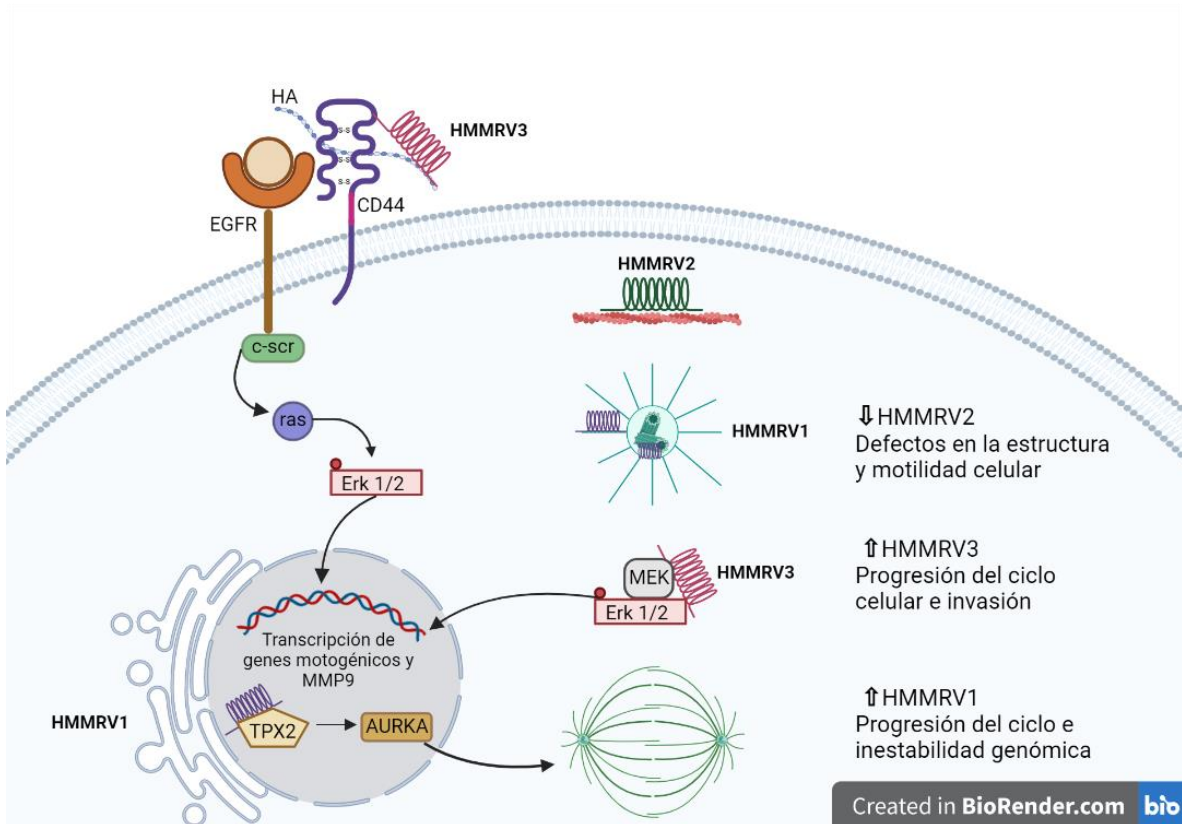


Figura 32. Potenciales funciones de las variantes HMMRV1, HMMRV2 y HMMRV3 en la LLA-B.

10 CONCLUSIONES

1. De acuerdo con el análisis *in silico* se encontró que el gen *HMMR* se sobre-expresa en pacientes de LLA-B con recaída con un nivel de cambio de 1.63 (FDR=1.9X10⁻¹⁹).
2. Las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3* se sobre-expresan en pacientes con LLA-B.
3. *HMMRV1* se sobre-expresa en muestras de pacientes con LLA-B fallecidos, mientras que en los pacientes que presentaron recaída *HMMRV3* se suprime.
4. La baja expresión de *HMMRV2* (<13.86, S=87.5 y E=45.5) y la alta expresión de *HMMRV3* (>9.82, S=88.2 y E=40) se asocian con una menor probabilidad de sobrevida.
5. La alta expresión de *HMMRV1* (>4.451, S=72 y E=54.1) se relaciona con una menor probabilidad de supervivencia libre de recaída.

11 PERSPECTIVAS

1. Realizar experimentos de funcionalidad celular para evaluar la migración, proliferación y viabilidad celular en un modelo de LLA-B donde se abata y/o se sobre-expresen las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3*, para analizar el efecto y los posibles mecanismos celulares asociados.
2. Realizar microarreglos a partir de los modelos antes propuestos, con la finalidad de encontrar las cascadas de señalización que activan o apagan cada una de las variantes de *HMMR*.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, Adam S., Mark L. McClelland, Sharon Yee, Murat Yaylaoglu, Sofia Hussain, Ely Cosino, Gabriel Quinones, et al. 2014. "An Integrative Analysis of Colon Cancer Identifies an Essential Function for PRPF6 in Tumor Growth." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.237206.113>.
- American Cancer Society. 2018. "What Is Chronic Myeloid Leukemia? What Is Leukemia?" American Cancer Society. 2018.
- Anczuków, Olga, Avi Z. Rosenberg, Martin Akerman, Shipra Das, Lixing Zhan, Rotem Karni, Senthil K. Muthuswamy, and Adrian R. Krainer. 2012. "The Splicing Factor SRSF1 Regulates Apoptosis and Proliferation to Promote Mammary Epithelial Cell Transformation." *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2207>.
- Assmann, Volker, David Jenkinson, John F. Marshall, and Ian R. Hart. 1999. "The Intracellular Hyaluronan Receptor RHAMM/IHABP Interacts with Microtubules and Actin Filaments." *Journal of Cell Science*.
- Bates, David O., Tai Gen Cui, Joanne M. Doughty, Matthias Winkler, Marto Sugiono, Jacqueline D. Shields, Danielle Peat, David Gillatt, and Steven J. Harper. 2002. "VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is down-Regulated in Renal Cell Carcinoma." *Cancer Research*.
- Betts, Matthew J., and Robert B. Russell. 2003. "Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions." *Bioinformatics for Geneticists*, May, 289–316. <https://doi.org/10.1002/0470867302.CH14>.
- Black, Kathryn L., Ammar S. Naqvi, Mukta Asnani, Katharina E. Hayer, Scarlett Y. Yang, Elisabeth Gillespie, Asen Bagashev, et al. 2018. "Aberrant Splicing in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky946>.
- Boise, Lawrence H., Maribel González-García, Christina E. Postema, Liyun Ding, Tullia Lindsten, Laurence A. Turka, Xiaohong Mao, Gabriel Nuñez, and Craig B. Thompson. 1993. "Bcl-x, a Bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death." *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90508-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90508-N).
- Brooks, Angela N., Peter S. Choi, Luc De Waal, Tanaz Sharifnia, Marcin Imielinski, Gordon Saksena, Pedamallu Chandra Sekhar, et al. 2014. "A Pan-Cancer Analysis of Transcriptome Changes Associated with Somatic Mutations in U2AF1 Reveals Commonly Altered Splicing Events." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087361>.
- Buttermore, Stephanie T., Mitchel S. Hoffman, Ambuj Kumar, Anne Champeaux, Santo V. Nicosia, and Patricia A. Kruk. 2017. "Increased RHAMM Expression Relates to Ovarian Cancer Progression." *Journal of Ovarian Research*. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0360-1>.
- Cazzola, Mario, Marianna Rossi, and Luca Malcovati. 2013. "Biologic and Clinical Significance of Somatic Mutations of SF3B1 in Myeloid and Lymphoid Neoplasms." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-399725>.
- Chen, Helen, Pooja Mohan, Jihong Jiang, Oksana Nemirovsky, Daniel He, Markus C. Fleisch, Dieter Niederacher, Linda M. Pilarski, C. James Lim, and Christopher A. Maxwell. 2014. "Spatial Regulation of Aurora A Activity during Mitotic Spindle Assembly Requires RHAMM to Correctly Localize TPX2." *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.29270>.
- Chen, J., and W. A. Weiss. 2015. "Alternative Splicing in Cancer: Implications for Biology and Therapy." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.570>.
- Chen, Xiang, Seung Koo Lee, Mei Song, Tiantian Zhang, Myung Shin Han, Yao Tseng Chen, Zhengming Chen, Xiaojing Ma, Ching Hsuan Tung, and Yi Chieh Nancy Du. 2021. "RHAMMB-

- Mediated Bifunctional Nanotherapy Targeting Bcl-XL and Mitochondria for Pancreatic Neuroendocrine Tumor Treatment.” *Molecular Therapy - Oncolytics* 23 (December): 277–87. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2021.10.002>.
- Chi, Andrew, Samir P. Shirodkar, Diogo O. Escudero, Obi O. Ekwenna, Travis J. Yates, Rajinikanth Ayyathurai, Michael Garcia-Roig, et al. 2012. “Molecular Characterization of Kidney Cancer: Association of Hyaluronic Acid Family with Histological Subtypes and Metastasis.” *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.26520>.
- Choi, Soyoung, Dunrui Wang, Xiang Chen, Laura H. Tang, Akanksha Verma, Zhengming Chen, Bu Jung Kim, et al. 2019. “Function and Clinical Relevance of RHAMM Isoforms in Pancreatic Tumor Progression.” *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1018-y>.
- Cohen-Eliav, Michal, Regina Golan-Gerstl, Zahava Siegfried, Claus L. Andersen, Kasper Thorsen, Torben F. Ørntoft, David Mu, and Rotem Karni. 2013. “The Splicing Factor SRSF6 Is Amplified and Is an Oncoprotein in Lung and Colon Cancers.” *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.4129>.
- David, Charles J., and James L. Manley. 2010. “Alternative Pre-mRNA Splicing Regulation in Cancer: Pathways and Programs Unhinged.” *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1973010>.
- Dhir, Ashish, Emanuele Buratti, Maria A. Van Santen, Reinhard Lührmann, and Francisco E. Baralle. 2010. “The Intronic Splicing Code: Multiple Factors Involved in ATM Pseudoexon Definition.” *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.397>.
- Feinberg, Andrew P., Michael A. Koldobskiy, and Anita Göndör. 2016. “Epigenetic Modulators, Modifiers and Mediators in Cancer Aetiology and Progression.” *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.13>.
- Ferlay, Jacques, Murielle Colombet, Isabelle Soerjomataram, Donald M. Parkin, Marion Piñeros, Ariana Znaor, and Freddie Bray. 2021. “Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview.” *International Journal of Cancer* 149 (4): 778–89. <https://doi.org/10.1002/IJC.33588>.
- Fu, Xiang Dong, and Manuel Ares. 2014. “Context-Dependent Control of Alternative Splicing by RNA-Binding Proteins.” *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3778>.
- Ghigna, Claudia, Silvia Giordano, Haihong Shen, Federica Benvenuto, Fabio Castiglioni, Paolo Maria Comoglio, Michael R. Green, Silvano Riva, and Giuseppe Biamonti. 2005. “Cell Motility Is Controlled by SF2/ASF through Alternative Splicing of the Ron Protooncogene.” *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.026>.
- Giannopoulos, K., D. Mertens, A. Bühler, T. F.E. Barth, I. Idler, P. Möller, A. Kröber, et al. 2009. “The Candidate Immunotherapeutic Target, the Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility, Is Associated with Proliferation and Shows Prognostic Value in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia.” *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.338>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- He, Huiling, Sandya Liyanarachchi, Keiko Akagi, Rebecca Nagy, Jingfeng Li, Rosemary C. Dietrich, Wei Li, et al. 2011. “Mutations in U4atac SnRNA, a Component of the Minor Spliceosome, in the Developmental Disorder MOPD I.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1200587>.
- He, X., M. Pool, K. M. Darcy, S. B. Lim, N. Auersperg, J. S. Coon, and W. T. Beck. 2007. “Knockdown of Polypyrimidine Tract-Binding Protein Suppresses Ovarian Tumor Cell Growth and Invasiveness in Vitro.” *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210307>.
- Hogan, Laura E., Julia A. Meyer, Jun Yang, Jinhua Wang, Nicholas Wong, Wenjian Yang, Gregory Condos, et al. 2011. “Integrated Genomic Analysis of Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic

- Leukemia Reveals Therapeutic Strategies.” *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-345595>.
- Hunger, Stephen P. 1996. “Chromosomal Translocations Involving the E2A Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Features and Molecular Pathogenesis.” *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.4.1211.bloodjournal8741211>.
- Hunger, Stephen P., and Charles G. Mullighan. 2015. “Acute Lymphoblastic Leukemia in Children.” *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1400972>.
- Iacobucci, Ilaria, and Charles G. Mullighan. 2017. “Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836>.
- IARC. 2020. “The Global Cancer Observatory (Globocan) 2020 Database.” *International Agency for Research Cancer*.
- Ishigami, Sumiya, Shinichi Ueno, Yuka Nishizono, Masataka Matsumoto, Hiroshi Kurahara, Takaaki Arigami, Yasuto Uchikado, et al. 2011. “Prognostic Impact of CD168 Expression in Gastric Cancer.” *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-106>.
- Jiménez-Hernández, Elva, Ethel Zulie Jaimes-Reyes, José Arellano-Galindo, Xochiketzalli García-Jiménez, Héctor Manuel Tiznado-García, María Teresa Dueñas-González, Octavio Martínez Villegas, et al. 2015. “Survival of Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia under Treatment with the Protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00-01.” *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/576950>.
- Juárez-Avendaño, Gerardo, Nuria Citlalli Luna-Silva, Euler Chargoy-Vivaldo, Laura Alicia Juárez-Martínez, Mayra Noemí Martínez-Rangel, Noemí Zárate-Ortiz, Edith Martínez-Valencia, Briceida López-Martínez, Rosana Pelayo, and Juan Carlos Balandrán. 2020. “Poor Prognosis Biomolecular Factors Are Highly Frequent in Childhood Acute Leukemias From Oaxaca, Mexico.” *Technology in Cancer Research & Treatment*. <https://doi.org/10.1177/1533033820928436>.
- Kaplan, Joel A. 2019. “Leukemia in Children.” *Pediatrics in Review*. <https://doi.org/10.1542/pir.2018-0192>.
- Klewes, L, E A Turley, and P Prehm. 2015. “The Hyaluronate Synthase from a Eukaryotic Cell Line.” *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj2900791>.
- Korkes, Fernando, Marilia Germanos De Castro, Stenio De Cassio Zequi, Livia Nardi, Auro Del Giglio, and Antonio Carlos De Lima Pompeo. 2014. “Hyaluronan-Mediated Motility Receptor (RHAMM) Immunohistochemical Expression and Androgen Deprivation in Normal Peritumoral, Hyperplastic and Neoplastic Prostate Tissue.” *BJU International*. <https://doi.org/10.1111/bju.12339>.
- Lu, Donglan, Xue Bai, Qiyuan Zou, Zuhuan Gan, and Yufeng Lv. 2020. “Identification of the Association between HMMR Expression and Progression of Hepatocellular Carcinoma via Construction of a Co-Expression Network.” *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11844>.
- Luo, Minkui. 2018. “Chemical and Biochemical Perspectives of Protein Lysine Methylation.” *Chemical Reviews* 118 (14): 6656. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.8B00008>.
- Malard, Florent, and Mohamad Mohty. 2020. “Acute Lymphoblastic Leukaemia.” *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1).
- Matera, A. Gregory, and Zefeng Wang. 2014. “A Day in the Life of the Spliceosome.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>.
- Matos, Paulo, and Peter Jordan. 2008. “Increased Rac1b Expression Sustains Colorectal Tumor Cell Survival.” *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0008>.

- Maxwell, Christopher A., Jonathan J. Keats, Mary Crainie, Xuejun Sun, Tim Yen, Ellen Shibuya, Michael Hendzel, Gordon Chan, and Linda M. Pilarski. 2003. "RHAMM Is a Centrosomal Protein That Interacts with Dynein and Maintains Spindle Pole Stability." *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0377>.
- Maxwell, Christopher A., Erik Rasmussen, Fenghuang Zhan, Jonathan J. Keats, Sophia Adamia, Erin Strachan, Mary Crainie, et al. 2004. "RHAMM Expression and Isoform Balance Predict Aggressive Disease and Poor Survival in Multiple Myeloma." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4079>.
- Mehner, Christine, Erin Miller, Aziza Nassar, William R. Bamlet, Evette S. Radisky, and Derek C. Radisky. 2015. "Tumor Cell Expression of MMP3 as a Prognostic Factor for Poor Survival in Pancreatic, Pulmonary, and Mammary Carcinoma." *Genes & Cancer*. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.90>.
- Mele, Valentina, Lena Sokol, Viktor Hendrik Kölzer, Dennis Pfaff, Manuele Giuseppe Muraro, Irene Keller, Zahnd Stefan, et al. 2017. "The Hyaluronan-Mediated Motility Receptor RHAMM Promotes Growth, Invasiveness and Dissemination of Colorectal Cancer." *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19904>.
- Messam, Britney J., Cornelia Tolg, James B. McCarthy, Andrew C. Nelson, and Eva A. Turley. 2021. "RHAMM Is a Multifunctional Protein That Regulates Cancer Progression." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19). <https://doi.org/10.3390/IJMS221910313>.
- Misra, Suniti, Vincent C. Hascall, Roger R. Markwald, and Shibnath Ghatak. 2015. "Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>.
- Moon, Heegyum, Sunghye Cho, Tiing Jen Loh, Jianhua Zhou, Claudia Ghigna, Giuseppe Biamonti, Michael R. Green, Xuexiu Zheng, and Haihong Shen. 2014. "A 2-Nt RNA Enhancer on Exon 11 Promotes Exon 11 Inclusion of the Ron Proto-Oncogene." *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2835>.
- Moran-Jones, Kim, Joan Grindlay, Marc Jones, Ross Smith, and Jim C. Norman. 2009. "HnRNP A2 Regulates Alternative mRNA Splicing of TP53INP2 to Control Invasive Cell Migration." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1852>.
- Mullighan, Charles, and James Downing. 2008. "Ikaros and Acute Leukemia." *Leukemia and Lymphoma*. <https://doi.org/10.1080/10428190801947500>.
- Mullighan, Charles G. 2012a. "Molecular Genetics of B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia." *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI61203>.
- . 2012b. "The Molecular Genetic Makeup of Acute Lymphoblastic Leukemia." *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. <https://doi.org/10.1182/asheducation.v2012.1.389.3798360>.
- . 2013. "Genomic Characterization of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Seminars in Hematology* 50 (4): 314–24. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINHEMATOL.2013.10.001>.
- Muñoz-Aguirre, Paloma, Rodrigo Huerta-Gutierrez, Salvador Zamora, Alejandro Mohar, Lourdes Vega-Vega, Juan Eugenio Hernández-Ávila, Evangelina Morales-Carmona, et al. 2021. "Acute Lymphoblastic Leukaemia Survival in Children Covered by Seguro Popular in Mexico: A National Comprehensive Analysis 2005-2017." *Health Systems and Reform* 7 (1). <https://doi.org/10.1080/23288604.2021.1914897>.
- Namayandeh, Seyedeh Mahdieh, Zaher Khazaei, Moslem Lari Najafi, Elham Goodarzi, and Alireza Moslem. 2020. "GLOBAL Leukemia in Children 0-14 Statistics 2018, Incidence and Mortality and Human Development Index (HDI): GLOBOCAN Sources and Methods." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.5.1487>.

- National Cancer Institute. 2015. "¿Qué Es El Cáncer? - Instituto Nacional Del Cáncer." 9 De Febrero. 2015.
- Niedworok, Christian, Inga Kretschmer, Katharina Röck, Frank Vom Dorp, Tibor Szarvas, Jochen Heß, Till Freudenberger, Ariane Melchior-Becker, Herbert Rübber, and Jens W. Fischer. 2013. "The Impact of the Receptor of Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM) on Human Urothelial Transitional Cell Cancer of the Bladder." *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075681>.
- Niu, Yu Na, Qing Qing Liu, Su Ping Zhang, Na Yuan, Yan Cao, Jin Yang Cai, Wei Wei Lin, et al. 2014. "Alternative Messenger RNA Splicing of Autophagic Gene Beclin 1 in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.5.2153>.
- Okamoto, Isamu, Yoshiaki Kawano, Hiromasa Tsuiki, Ji Ichiro Sasaki, Mitsuyoshi Nakao, Mitsuhiro Matsumoto, Moritaka Suga, Masayuki Ando, Motowo Nakajima, and Hideyuki Saya. 1999. "CD44 Cleavage Induced by a Membrane-Associated Metalloprotease Plays a Critical Role in Tumor Cell Migration." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202447>.
- Oltean, S., and D. O. Bates. 2014. "Hallmarks of Alternative Splicing in Cancer." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.533>.
- Park, Deokbum, Youngmi Kim, Hyunah Kim, Kyungjong Kim, Yun Sil Lee, Jongseon Choe, Jang Hee Hahn, et al. 2012. "Hyaluronic Acid Promotes Angiogenesis by Inducing RHAMM-TGFβ Receptor Interaction via CD44-PKCδ." *Molecules and Cells*. <https://doi.org/10.1007/s10059-012-2294-1>.
- PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. 2002. *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries*.
- Pon, Julia R., and Marco A. Marra. 2015. "Driver and Passenger Mutations in Cancer." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312>.
- Poulikakos, Poulikos I., Yogindra Persaud, Manickam Janakiraman, Xiangju Kong, Charles Ng, Gaten Moriceau, Hubing Shi, et al. 2011. "RAF Inhibitor Resistance Is Mediated by Dimerization of Aberrantly Spliced BRAF(V600E)." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10662>.
- Rein, D. T., K. Roehrig, T. Schöndorf, A. Lazar, M. Fleisch, D. Niederacher, H. G. Bender, and P. Dall. 2003. "Expression of the Hyaluronan Receptor RHAMM in Endometrial Carcinomas Suggests a Role in Tumour Progression and Metastasis." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s00432-003-0415-0>.
- Ribeiro, R. C., M. Abromowitch, S. C. Raimondi, S. B. Murphy, F. Behm, and D. L. Williams. 1987. "Clinical and Biologic Hallmarks of the Philadelphia Chromosome in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v70.4.948.bloodjournal704948>.
- Roy, Bishakha, Larisa M. Haupt, and Lyn R. Griffiths. 2013. "Review: Alternative Splicing (AS) of Genes As An Approach for Generating Protein Complexity." *Current Genomics*. <https://doi.org/10.2174/1389202911314030004>.
- Sahu, Vishal, Abhishek Gupta, Rahul Kumar, Tarang Gupta, Anant Mohan, and Sharmistha Dey. 2016. "Quantification of Rac1 and Rac1b in Serum of Non Small Cell Lung Cancer by Label Free Real Time Assay." *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.07.009>.
- Savani, Rashmin C., Gaoyuan Cao, Patricia M. Pooler, Aisha Zaman, Zhao Zhou, and Horace M. DeLisser. 2001. "Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-Mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102273200>.
- Schatz-Siemers, Nina, Yao Tseng Chen, Zhengming Chen, Dunrui Wang, Lora H. Ellenson, and Yi

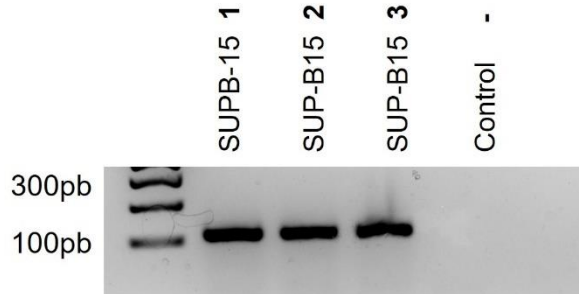
- Chieh Nancy Du. 2020. "Expression of the Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility (RHAMM) in Endometrial Cancer Is Associated with Adverse Histologic Parameters and Tumor Progression." *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 28 (6): 453–59. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000763>.
- Schütze, Alexandra, Christian Vogeley, Tobias Gorges, Sören Twarock, Jonas Butschan, Anna Babayan, Diana Klein, et al. 2016. "RHAMM Splice Variants Confer Radiosensitivity in Human Breast Cancer Cell Lines." *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7258>.
- Sebestyén, Endre, Babita Singh, Belén Miñana, Amadís Pagès, Francesca Mateo, Miguel Angel Pujana, Juan Valcárcel, and Eduardo Eyra. 2016. "Large-Scale Analysis of Genome and Transcriptome Alterations in Multiple Tumors Unveils Novel Cancer-Relevant Splicing Networks." *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.199935.115>.
- Shurtleff, S. A., A. Buijs, F. G. Behm, J. E. Rubnitz, S. C. Raimondi, M. L. Hancock, G. C.F. Chan, C. H. Pui, G. Grosveld, and J. R. Downing. 1995. "TEL/AML1 Fusion Resulting from a Cryptic t(12;21) Is the Most Common Genetic Lesion in Pediatric ALL and Defines a Subgroup of Patients with an Excellent Prognosis." *Leukemia*.
- Singh, Babita, and Eduardo Eyra. 2017. "The Role of Alternative Splicing in Cancer." *Transcription*. <https://doi.org/10.1080/21541264.2016.1268245>.
- Snauwaert, Sylvia, Stijn Vanhee, Glenn Goetgeluk, Greet Verstichel, Yasmine van Caeneghem, Imke Velghe, Jan Philippé, et al. 2012. "RHAMM/HMMR (CD168) Is Not an Ideal Target Antigen for Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia." *Haematologica* 97 (10): 1539–47. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.065581>.
- Sotillo, Elena, David M. Barrett, Kathryn L. Black, Asen Bagashev, Derek Oldridge, Glendon Wu, Robyn Sussman, et al. 2015. "Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy." *Cancer Discovery*. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1020>.
- Staal, F. J.T., D. De Ridder, T. Szczepanski, T. Schonewille, E. C.E. Van Der Linden, E. R. Van Wering, V. H.J. Van Der Velden, and J. J.M. Van Dongen. 2010. "Genome-Wide Expression Analysis of Paired Diagnosis-Relapse Samples in ALL Indicates Involvement of Pathways Related to DNA Replication, Cell Cycle and DNA Repair, Independent of Immune Phenotype." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.286>.
- Stangeland, Biljana, Awais A. Mughal, Zanina Grieg, Cecilie Jonsgar Sandberg, Mrinal Joel, Ståle Nygård, Torstein Meling, Wayne Murrell, Einar O. Vik Mo, and Iver A. Langmoen. 2015. "Combined Expressional Analysis, Bioinformatics and Targeted Proteomics Identify New Potential Therapeutic Targets in Glioblastoma Stem Cells." *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4613>.
- Supek, Fran, Belén Miñana, Juan Valcárcel, Toni Gabaldón, and Ben Lehner. 2014. "Synonymous Mutations Frequently Act as Driver Mutations in Human Cancers." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.051>.
- Sveen, A., S. Kilpinen, A. Ruusulehto, R. A. Lothe, and R. I. Skotheim. 2016. "Aberrant RNA Splicing in Cancer; Expression Changes and Driver Mutations of Splicing Factor Genes." *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.318>.
- Tang, Zefang, Chenwei Li, Boxi Kang, Ge Gao, Cheng Li, and Zemin Zhang. 2017. "GEPIA: A Web Server for Cancer and Normal Gene Expression Profiling and Interactive Analyses." *Web Server Issue Published Online* 45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>.
- Taylor, Brian J., Eva Baigorri, Mary Hay, Tony Reiman, Andrew R. Belch, and Linda M. Pilarski. 2006. "Genomic Instability in Multiple Myeloma: Inducible Transfectants Provide a Model To Define the Role of RHAMM and Centrosome/Mitotic Spindle Stability in Myelomagenesis." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v108.11.5037.5037>.

- Terwilliger, T., and M. Abdul-Hay. 2017. "Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Review and 2017 Update." *Blood Cancer Journal*. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>.
- Tilghman, Jessica, Hao Wu, Yingying Sang, Xiaohai Shi, Hugo Guerrero-Cazares, Alfredo Quinones-Hinojosa, Charles G. Eberhart, John Lathera, and Mingyao Ying. 2014. "HMMR Maintains the Stemness and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2103>.
- Tolg, Cornelia, Sara R. Hamilton, Kerry Ann Nakrieko, Fatemeh Kooshesh, Paul Walton, James B. McCarthy, Mina J. Bissell, and Eva A. Turley. 2006. "Rhamm-/- Fibroblasts Are Defective in CD44-Mediated ERK1,2 Motogenic Signaling, Leading to Defective Skin Wound Repair." *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511027>.
- Tolg, Cornelia, Muhan Liu, Katelyn Cousteils, Patrick Telmer, Khandakar Alam, Jenny Ma, Leslie Mendina, James B. McCarthy, Vincent L. Morris, and Eva A. Turley. 2020. "Cell-Specific Expression of the Transcriptional Regulator RHAMM Provides a Timing Mechanism That Controls Appropriate Wound Re-Epithelialization." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010002>.
- Tolg, Cornelia, James B. McCarthy, Arjang Yazdani, and Eva A. Turley. 2014. "Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the 'Cancerization' of Stromal Tissues." *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/103923>.
- Tomizawa, Daisuke, Takako Miyamura, Katsuyoshi Koh, and Eiichi Ishii. 2022. "Acute Lymphoblastic Leukemia in Infants: A Quarter Century of Nationwide Efforts in Japan." *Pediatrics International* 64 (1): e14935. <https://doi.org/10.1111/PED.14935>.
- Toole, B. P. 1990. "Hyaluronan and Its Binding Proteins, the Hyaladherins." *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90081-O](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90081-O).
- Toole, Bryan P. 2001. "Hyaluronan in Morphogenesis." *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0244>.
- Turley, E. A. 1982. "Purification of a Hyaluronate-Binding Protein Fraction That Modifies Cell Social Behavior." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)92101-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)92101-5).
- Turley, Eva A., Paul W. Noble, and Lilly Y. W. Bourguignon. 2002. "Signaling Properties of Hyaluronan Receptors." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.r100038200>.
- Velden, Vincent H.J. van der, Daphne de Launaij, Jeltje F. de Vries, Valerie de Haas, Edwin Sonneveld, Jane S.A. Voerman, Maaïke de Bie, et al. 2016. "New Cellular Markers at Diagnosis Are Associated with Isolated Central Nervous System Relapse in Paediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukaemia." *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.13887>.
- Wang, Dunrui, Navneet Narula, Stephanie Azzopardi, Roger S. Smith, Abu Nasar, Nasser K. Altorki, Vivek Mittal, Romel Somwar, Brendon M. Stiles, and Yi-Chieh Nancy Du. 2016. "Expression of the Receptor for Hyaluronic Acid Mediated Motility (RHAMM) Is Associated with Poor Prognosis and Metastasis in Non-Small Cell Lung Carcinoma." *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9554>.
- Wang, Eric T., Rickard Sandberg, Shujun Luo, Irina Khrebtukova, Lu Zhang, Christine Mayr, Stephen F. Kingsmore, Gary P. Schroth, and Christopher B. Burge. 2008. "Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07509>.
- Wang, Hai, Min Zhou, Bizhi Shi, Qingli Zhang, Hua Jiang, Yinghao Sun, Jianhua Liu, et al. 2011. "Identification of an Exon 4-Deletion Variant of Epidermal Growth Factor Receptor with Increased Metastasis-Promoting Capacity." *Neoplasia*. <https://doi.org/10.1593/neo.101744>.

- Will, Cindy L., and Reinhard Lührmann. 2011. "Spliceosome Structure and Function." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>.
- Woo, Jennifer S., Michael O. Alberti, and Carlos A. Tirado. 2014. "Childhood B-Acute Lymphoblastic Leukemia: A Genetic Update." *Experimental Hematology and Oncology*. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-3-16>.
- Yang, Chu Wen, Jin Yuan Su, Ann Ping Tsou, Gar Yang Chau, Hui Lin Liu, Chang Han Chen, Chia Yi Chien, and Chen Kung Chou. 2005. "Integrative Genomics Based Identification of Potential Human Hepatocarcinogenesis-Associated Cell Cycle Regulators: RHAMM as an Example." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.005>.
- Yang, Dong, Yan Ma, Pengcheng Zhao, Jing Ma, and Chaohong He. 2019. "Systematic Screening of Protein-Coding Gene Expression Identified HMMR as a Potential Independent Indicator of Unfavorable Survival in Patients with Papillary Muscle-Invasive Bladder Cancer." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 120 (December). <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109433>.
- Yoshida, Kenichi, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Daniel Nowak, Yasunobu Nagata, Ryo Yamamoto, Yusuke Sato, et al. 2011. "Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10496>.
- Zhang, Huizhong, Liangliang Ren, Ya Ding, Fengyan Li, Xiangfu Chen, Ying Ouyang, Yan Zhang, and Dongsheng Zhang. 2019. "Hyaluronan-Mediated Motility Receptor Confers Resistance to Chemotherapy via TGF β /Smad2-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer." *FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.201802186R>.

ANEXO DE EXPERIMENTOS

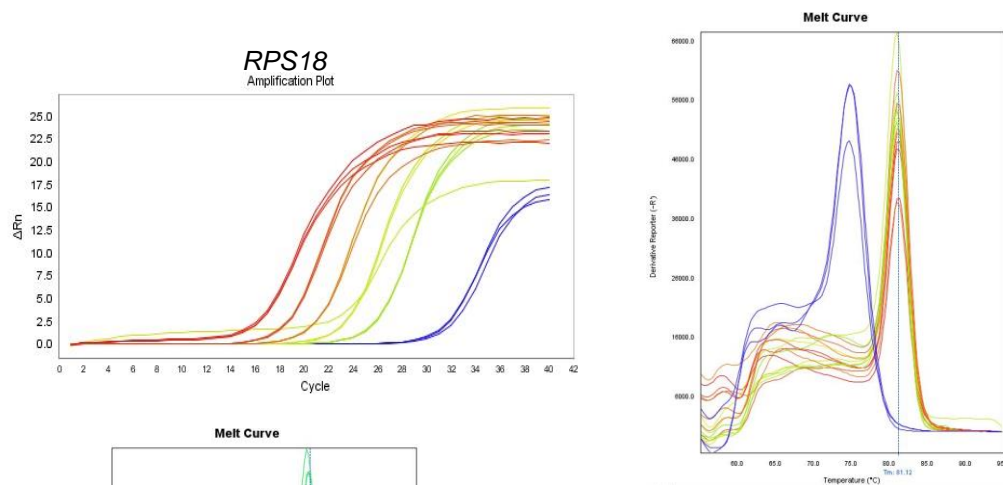
Anexo 1. Evaluación de cDNA SUP-B15



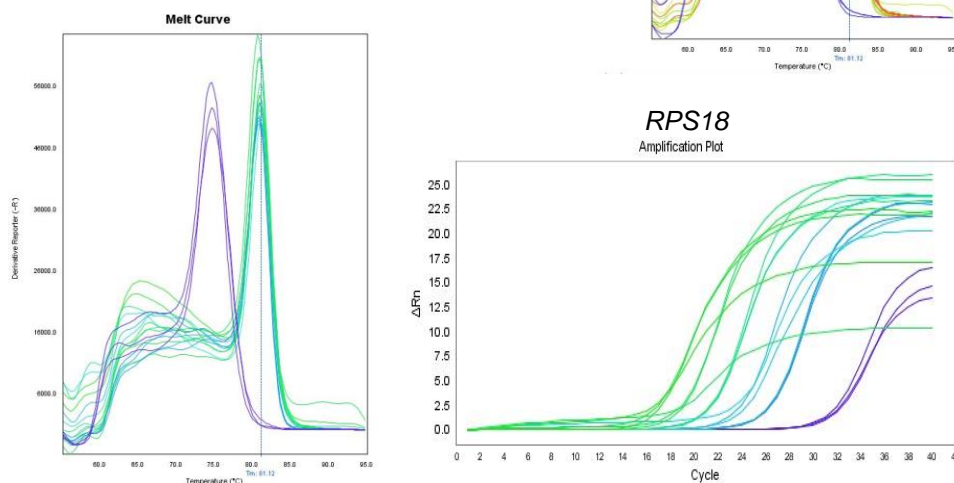
Anexo 1. Expresión del gen constitutivo RPL4 en tres muestras de cDNA de SUP-B15. RNA total de la línea celular SUP-B15, correspondiente a leucemia linfoblástica aguda, se usó para sintetizar cDNA, el templado utilizado para la validación de aplicación del método de cuantificación relativa por PCR en tiempo real. Se observan bandas en el peso esperado (112pb) para el gen HK RPL4, en las tres muestras.

Anexo 2. Curvas de amplificación y disociación para los genes cuantificados por PCR en tiempo real.

A)



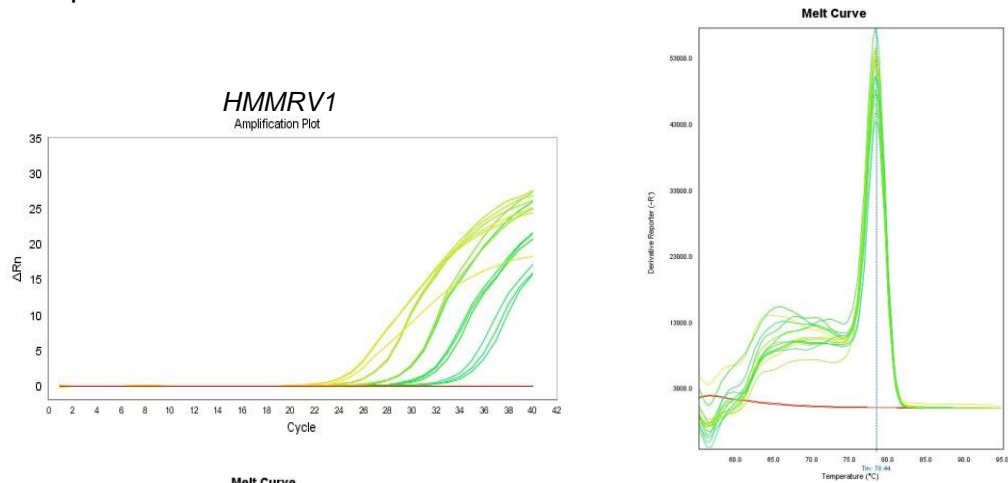
B)



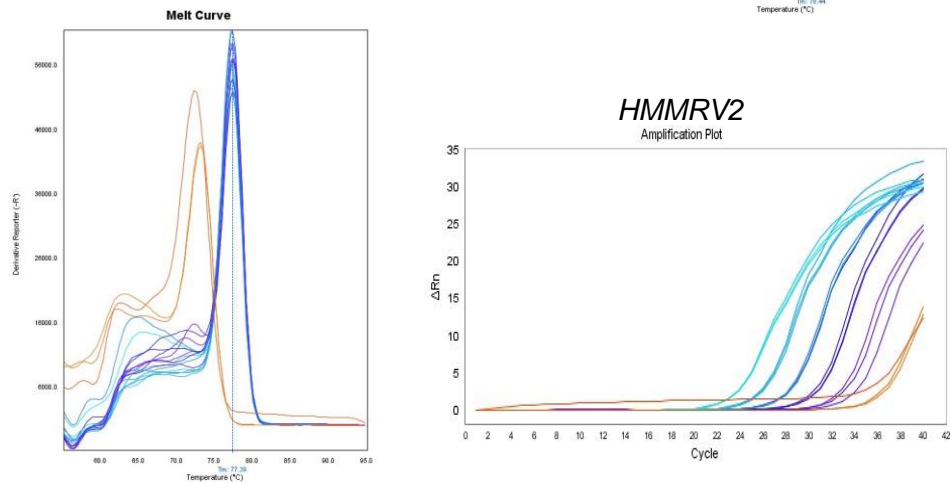
Anexo 2. Curvas de amplificación y disociación del gen de referencia RPS18. Se muestran las gráficas de amplificación y disociación de dos curvas estándar usando cDNA de la línea celular SUP-B15, las concentraciones iniciales fueron A) 100ng/ul y B) 75ng/ul con un FD= 5, los primers de RPS18 forman dímeros.

Anexo 2. Curvas de amplificación y disociación para los genes cuantificados por PCR en tiempo real.

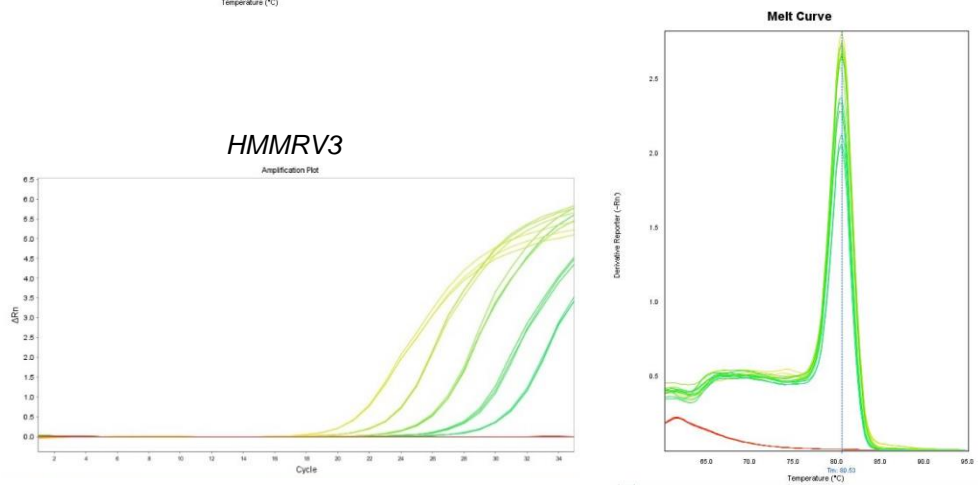
C)



D)



E)



Anexo 2. Curvas de amplificación y disociación de las variantes *HMMRV1*, *HMMRV2* y *HMMRV3*. Se muestran las gráficas de amplificación y disociación de las curvas estándar usando cDNA de la línea celular SUP-B15, las concentraciones iniciales fueron C) y E) 100ng/ul y D) 75ng/ul con un FD= 5, los primers de *HMMRV2* formaron dímeros.