



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“Análisis de la expresión de los genes *MAGE A3*,
A4, *B2*, *C1*; *BAGE-1*; *GAGE*; *LAGE-1* y *NY-ESO-1*
en pacientes con Leucemia Aguda”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A :

Carmen Socorro Mendoza Vásquez

Directores de Tesis:

Dr. Enrique I. Miranda Peralta
Director de Tesis

Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Asesor interno de Tesis

México D.F., 2011



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.

Este trabajo fue realizado en el Hospital General de México, O. D. en la Unidad 204 del servicio de Hematología en el área de Biología Molecular, bajo la dirección del Dr. Enrique Miranda Peralta.

INDICE

Abreviaturas.....	i
INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Sistema Hematopoyético</i>	1
a) <i>Homeostasis (citocinas)</i>	2
2. <i>Cáncer</i>	3
a) <i>Incidencia</i>	3
3. <i>Leucemia</i>	6
a) <i>Clasificación</i>	8
b) <i>Marcadores moleculares de las leucemias agudas</i>	8
c) <i>Tratamiento y pronóstico</i>	9
d) <i>Inmunoterapia con antígenos</i>	10
4. <i>Antígenos testiculares de cáncer</i>	11
a) <i>Definición</i>	11
b) <i>Clasificación de los CTAs</i>	11
c) <i>Familia MAGE</i>	11
i. <i>Definición</i>	11
ii. <i>Clasificación</i>	12
iii. <i>Estructura a nivel genético del mensajero y de la proteína, de los CTAs.</i>	12
iv. <i>Detección de CTAs en Cáncer.</i>	13
v. <i>Función</i>	14
vi. <i>Importancia clínica</i>	15
JUSTIFICACION.....	16
HIPOTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	17
METODOLOGIA.....	18
1. <i>Diseño experimental</i>	18
<i>Tamaño de muestra</i>	18

<i>Criterios de Inclusión</i>	18
<i>Criterios de exclusión</i>	18
2. <i>Cultivo de líneas celulares</i>	19
3. <i>Aislamiento de células mononucleares de controles negativos y pacientes.</i>	20
4. <i>Extracción de RNA</i>	20
5. <i>Cuantificación de RNA.</i>	22
6. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	23
7. <i>Síntesis de cDNA (Reverso Transcripción)</i>	23
8. <i>Amplificación de CTAs por PCR.</i>	24
9. <i>Secuenciación de los CTAs.</i>	25
RESULTADOS	26
1. <i>Análisis de la expresión de los CTAs en individuos sanos.</i>	26
2. <i>Análisis de la expresión de los CTAs en tejido testicular.</i>	27
3. <i>Análisis de la expresión de los CTAs en líneas celulares.</i>	28
4. <i>Análisis de la expresión de los CTAs en pacientes con Leucemia Aguda.</i>	30
4.1 <i>Características de los pacientes incluidos en el estudio.</i>	30
4.2 <i>Integridad de RNA en pacientes</i>	32
4.3 <i>Análisis de expresión de los CTAs en pacientes</i>	33
4.4 <i>Secuenciación de genes de los CTAs</i>	36
4.5 <i>Frecuencia de los CTAs en LAL y LAM</i>	38
4.6 <i>Análisis de la sobrevida en LAM y LAL de los genes <i>MAGE-A4</i> y <i>NY-ESO-1</i>.</i>	40
DISCUSION	42
CONCLUSION	47
PERSPECTIVAS.....	48
BIBLIOGRAFIA	49

ABREVIATURAS

MO – Médula Osea.
HSC- Células Troncales Hematoyeticas.
CFU – Unidades Formadoras de Colonias.
CMP – Progenitor Mieloide Común.
IL – Interleucina.
EPO – Eritropoyetina.
G-CSF –Factor estimulante de Colonias de Granulocitos.
M-CSF –Factor Estimulante de Colonias de Monocitos.
GMP – Progenitor Granulocito Macrófago.
MEP – Progenitor Megacariocito Eritrocito.
CLP – Progenitor Linfoide Común.
CFC- Célula Formadora de Colonias.
GM-CFC-Célula Formadora de Colonias Granulocitó- Macrófago.
SP- Sangre Periférica.
DNA- Acido Desoxirribonucleico.
RNA- Acido Ribonucleico.
LAL- Leucemia Aguda Linfoblástica.
LAM- Leucemia Aguda Mieloblástica.
LLC- Leucemia Linfoide Crónica.
LA- Leucemia(s) Aguda(s).
LC- Leucemia Crónica.
LGC- Leucemia Granulocítica Crónica.
CTAs- Antígenos Testiculares de Cáncer
MAGE- Antígeno asociados a Melanoma.
BAGE- Antígenos de Melanoma B.
NY-ESO-Antígeno asociado a carcinoma de células escamosas de Esófago, de New York.
CD- Grupos de Diferenciación.
PBS- Solución Buffer de Fosfatos.
PCR- Reacción en Cadena de Polimerasa.
RT-PCR- Reacción en Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa.

INTRODUCCION

1. Sistema Hematopoyético

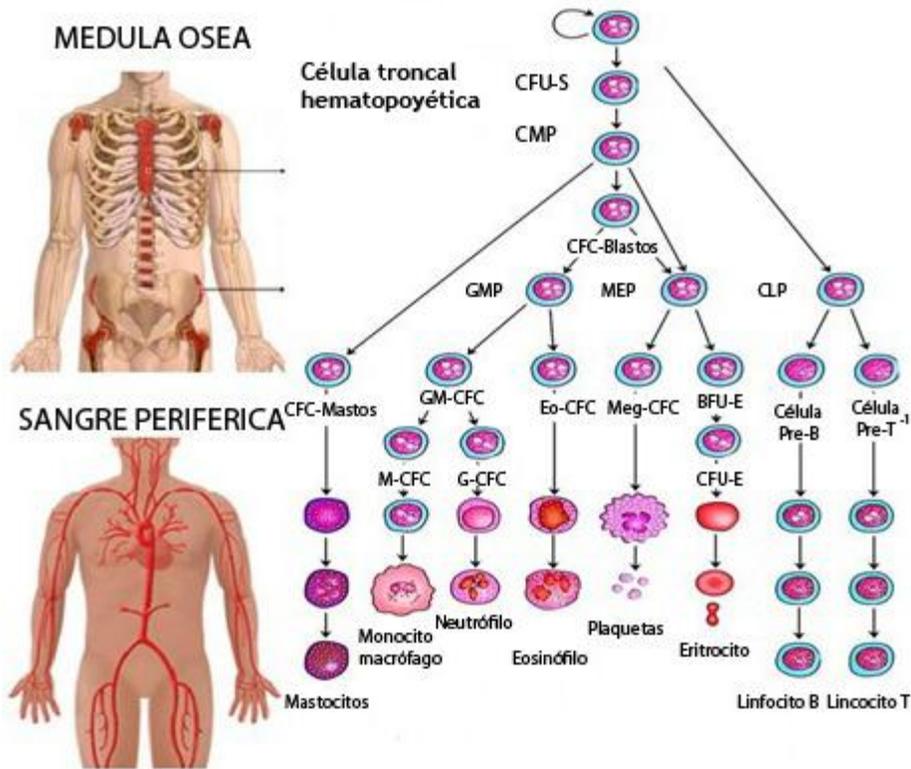
Las células sanguíneas maduras presentes en la circulación, desempeñan una gran variedad de funciones para el organismo, así de esta forma los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra los agentes patógenos, cumplen con su función y mueren, por lo que existe la necesidad de una constante renovación celular ^(1,2).

Cerca de 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas, 7×10^{10} granulocitos y 10×10^{10} leucocitos deben ser reemplazados cada día para mantener las defensas del cuerpo y una oxigenación adecuada en el ser humano. Lo anterior compensa la pérdida diaria de las células de tal manera que, en condiciones normales, los niveles en circulación de eritrocitos, leucocitos y plaquetas se mantienen constantes ^(1,2).

En la figura 1 se observa el proceso de la Hematopoyesis, que se define como la generación de células sanguíneas en medula ósea (MO) a partir de la célula troncal hematopoyética (HSC). La HSC tiene tres características principales ⁽¹⁾:

- 1.- Capacidad de proliferación; reconstituyen a largo plazo la MO.
- 2.- Multipotencialidad; generan unidades formadoras de colonias (CFU), que darán origen a el progenitor mieloide común (CMP), progenitor granulocito-macrofago (GMP), al progenitor megacariocito-eritrocito (MEP), y al progenitor linfoide común (CLP), originando células sanguíneas, mieloide, eritroide y linfoide respectivamente.
- 3.- Apoptosis; mecanismo de autodestrucción o muerte celular programada ^(3,4).

CASCADA HEMATOPOYETICA.



FUENTE: Tomado de aurorahealthcare.org, lifeethics.org y modificado.

Figura 1. Cascada de células hematopoyéticas. En MO las células HSC generan; unidades CFU, que darán origen al CMP; GMP; a los MEP y al CLP. Así las células logran su diferenciación hacia un linaje en la SP.

a) *Homeostasis (citocinas)*

En la hematopoyesis actúan varias citocinas como las interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6), eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias-granulocito (G-CSF), factor estimulante de colonias-monocito (M-CSF), etc., que controlan la diferenciación y proliferación hacia células sanguíneas maduras, las citocinas son sintetizadas por casi todas las células y también participan en la homeostasis del organismo (mantiene en equilibrio los mecanismos del organismo en forma constante), en la remodelación ósea y en el

desarrollo embrionario fetal. La administración o el bloqueo de citocinas se han convertido en un blanco terapéutico para deficiencias inmunes, hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer, entre otras patologías ⁽⁵⁾.

2. **Cáncer**

Las células en su proceso de maduración pueden sufrir ciertas alteraciones modificando su propio DNA dando lugar al desencadenamiento de enfermedades tales como el cáncer ⁽⁶⁾.

El cáncer se considera como una enfermedad genética, producto de la proliferación anómala de un clon celular, causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumor y genes con microRNA. A menudo los tumores tienen clones diferentes citogenéticamente que surgen de la transformación inicial celular a través de una alteración secundaria y terciaria ⁽⁶⁾.

Los oncogenes pueden ser clasificados en seis grupos: factores de transcripción (*v-myc, v-myb, v-fos, v-rel, v-ets-1, v-ets-2, v-erbA1, v-erbA2*, etc.), reguladores de la cromatina (*ALL1* o *MLL*), factores de crecimiento (*v-sis, int, KS3, HST*, etc.), receptores del factor de crecimiento (*EGFR, v-fms, v-KIT, v-ros, MET, TRK, NE, RE*, etc.), transductores de señales (*SRC, v-yes, v-fgr, v-fes, ABL, K-RAS, N-RAS, Dbl, Vav, v-mos, v-raf, pim-1, v-crkl*, etc.) y reguladores de la apoptosis (*BCL2, MDM2*, etc.) ⁽⁶⁾.

a) **Incidencia**

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial; se le atribuyen 7.9 millones (13%) de defunciones ⁽⁷⁾.

En las América la tasa de mortalidad por neoplasias malignas estimada es de 132.5 (100.000 hab.), con la excepción de los accidentes y/o todas las causas combinadas de muerte, además de las enfermedades cardiacas, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte, debido a las diferencias biológicas, así como el grado de exposición a factores de riesgo hacen que algunos tipos de cáncer se desarrollen de forma diferenciada entre mujeres y hombres, presentando mayor incidencia de cáncer a partir de los 40 a 70 años en el sexo masculino y en el sexo femenino entre 19 a 39 años ⁽⁸⁾, ver la tabla 1.

Tabla 1. Principales causas de muerte en América durante el año 2005.

Rango	Causa de muerte	Núm. de muerte
	Todas las causas	2,448,017
1	Enfermedades del corazón	652,091
2	Cáncer	550,312
3	Enfermedades cerebrovasculares	143,579
4	Enfermedades respiratorias crónicas	130,933
5	Accidentes	117,809
6	Diabetes miellitus	75,119
7	Enfermedades de Alzheimer	71,599
8	Influencia & neumonía	63,001
9	Nefritis & nefrosis	43,901
10	Septicemia	34,136
11	Suicidios	32,637
12	Enfermedades del riñón crónicas	27,530
13	Hipertensión	24,902
14	Enfermedades de Parkinson	19,544
15	Homicidios	18,124
	Otras causas	433,800

FUENTE: American Cancer Society, 2005.

La incidencia de mortalidad por sexo en las últimas dos décadas en los Estados Unidos para el año 2005 se encontró en los hombre, que el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar (90,141 muertes al año), seguido del cáncer de próstata (28,905 muertes al año) y en tercer lugar el cáncer de colon (26,783 muertes al año) ⁽⁹⁾.

En las mujeres, el orden es similar, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar (69,079 de muertes por año), siendo el cáncer de mama el segundo (41,116 de muertes al año), seguido del cáncer de colon (26,224 muertes al año)⁽⁹⁾ (Tabla 2).

Tabla 2. Mortalidad en E.U. para el año 2005.

Diagnóstico	Hombres	Diagnóstico	Mujeres
Cáncer de próstata	28,905	Cáncer de mama	41,116
Cáncer de colon	26,783	Cáncer de colon	26,224
Cáncer de pulmón	90,141	Cáncer de pulmón	69,079
Otros sitios	290,422	Otros sitios	268,890

FUENTE: American Cancer Society, 2005.

La tasa de mortalidad ajustada por edad aumento entre los 40 y los 70 años en ambos sexos. En México, cerca de cada diez defunciones en el 2007 se debieron a tres causas principales: la diabetes mellitus es la principal causa de muerte (en mujeres representa 16.2% y hombres 11.7%), le siguen los tumores malignos (14.6% defunciones femeninas y 11.1% masculinas) y las enfermedades isquémicas del corazón (10.7% muertes de mujeres y 11% muertes de hombres)^(10, 11).

En el Hospital General de México O. D. (HGM) la tasa de mortalidad para el año 2007 fue de 4.42 por mil egresos. Dentro de las principales neoplasias, las hematológicas ocupan el 6,56 %. Las neoplasias de mayor frecuencia en el servicio de Hematología reportan a la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) y la Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM)⁽¹²⁾.

El número de defunciones en el 2007 por diagnóstico en pacientes femeninas se encuentra en primer lugar en LAL, seguido de la LAM, Mieloma Múltiple, Septicemia, Linfoma no Hodgkin de células pequeñas, Mielofibrosis aguda, enfermedad mieloproliferativa crónica⁽¹²⁾.

En tanto que el número de defunciones en pacientes masculinos mostraron los siguientes datos: en primer lugar se encuentra en LAL, en segundo lugar Linfoma no Hodgkin Mixto, el Linfoma no Hodgkin de células grandes, seguido de LAM, después la Leucemia Linfoide Crónica (LLC) y las lesiones en sitios contiguos de los bronquios y de pulmones, otros tipo de enfermedades de Hodgkin y Linfoma no Hodgkin de células pequeñas ⁽¹²⁾ (Tabla 3).

Tabla 3. Incidencias y Defunciones para el año 2007 por el servicio de Hematología del HGM

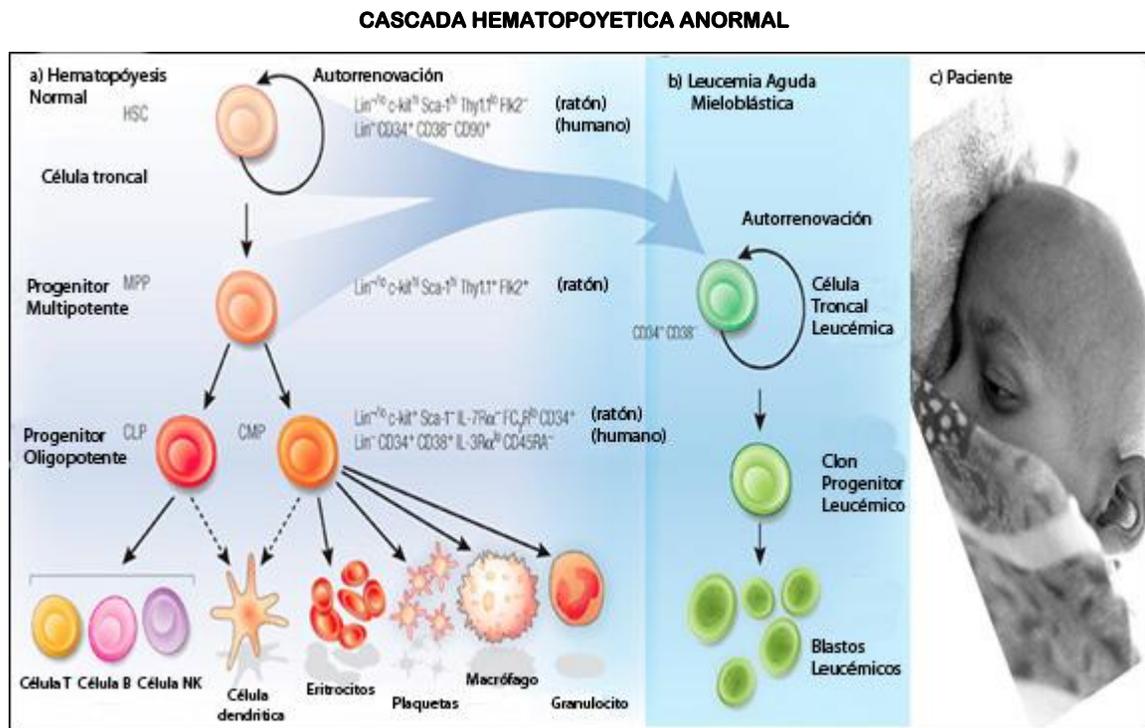
DIAGNOSTICO	TOTAL FEMENINOS	DIAGNOSTICO	TOTAL MASCULINOS
LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA	21	LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA	12
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	3	LINFOMA NO HODGKIN MIXTO	10
MIELOMA MULTIPLE	2	LINFOMA NO HODGKIN DE CELULAS GRANDE	5
SINDROME MIELODISPLASICO	1	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	4
SEPTICEMIA	1	LEUCEMIA LINFOIDE CRONICA	2
LINFOMA NO HODGKIN DE CELULAS PEQUEÑAS	1	INSUFICIENCIA RENAL TERMINAL	2
LINFOMA NO HODGKIN MIXTO	1	LESIONES DE SITIOS CONTIGUOS DE LOS BRONQUIOS Y DE PULMON	1
MIELOFIBROSIS AGUDA	1	OTROS TIPOS DE ENFERMEDADES DE HODGKIN	1
ENFERMEDAD MIELOPROLIFERATIVA CRONICA	1	LINFOMA NO HODGKIN DE CELULAS PEQUEÑAS	1
		OTROS TIPOS DE LINFOMA NO HODGKIN FOLICULAR	1
OTROS	7	OTROS	10
TOTAL	41		49

FUENTE: Tomado del Boletín Estadístico HGM, 2009.

3. Leucemia

Las leucemias como el cáncer se caracteriza por el incremento de células mieloides y linfoides en la medula ósea, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos que carecen de función e invaden otros órganos y tejidos del cuerpo presentando insuficiencia hematopoyética, provocando la muerte por anemia, sangrado o infecciones, entre otras ^(13, 14).

La leucemia se caracteriza por tener una hematopoyesis inusual (Figura 2a), llamada hematopoyesis leucémica; la cual se desarrolla con la HSC, originando a un progenitor de clones leucémicos y quedando la célula en senescencia (blasto leucémico) (Figura 2b). Al no completarse la diferenciación celular y se causa complicaciones en la célula y en el paciente (Figura 2c) ⁽⁴⁾.



FUENTE: Breton T., 2006

Figura 2. Hematopoyesis normal y leucémica. **a)** Hematopoyesis normal; la HSC reconstituyen a largo plazo; CMP; MEP y CLP. **b)** Hematopoyesis en LA; la célula stem leucémica, da origen a un progenitor de clones leucémicos, y este a una célula indiferenciada, blasto leucémico. **c)** Pacientes con diagnóstico de leucemia.

Las posibles causas de la leucemia pueden ser producidas por infecciones con virus, oncogenes que se pueden activar por la acción de algunos agentes tóxicos (benceno, cloranfenicol, fenilbutazona, antineoplásicos del tipo de alquilantes, etc.), por daño cromosómico previo (Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, anemia tipo Fanconi) y por inmunodeficiencias, que aparentemente predispone al desarrollo posterior a la leucemia ⁽¹⁵⁾.

a) Clasificación

Las leucemias para su estudio suelen clasificarse en Aguda y Crónica. La Leucemia Aguda (LA) es de rápido desarrollo, con una proliferación autónoma clonal anormal, incapacidad para la diferenciación y maduración normal, interfieren con el crecimiento de los precursores hematopoyéticos normales o lo suprimen. En la Leucemia Crónica (LC), hay células que parecen ser maduras pero no son completamente normales, estas viven demasiado tiempo y causan una acumulación de ciertos tipos de glóbulos blancos. ⁽¹⁴⁾.

b) Marcadores moleculares de las leucemias agudas

En la actualidad para la detección y/o diagnóstico de leucemias se ha recurrido al uso de los marcadores moleculares específicos. En la LAL se ocupan los transcritos de fusión *tel-aml1* producto de la *t(12; 21)*, se considera de buen pronóstico este reordenamiento, el cual afecta aproximadamente al 25% de los niños con leucemia. De pronóstico menos favorable se consideran las alteraciones moleculares *e2a-pbx1* producto de la *t(1;19)* y *myc-Igh t(8;14)*. Dos alteraciones moleculares de muy mal pronóstico son *bcr-abl* y mutaciones en el gen *mll*. La primera de ellas producto de la *t(9; 22)* cromosoma *Philadelphia*, la cual se observa en 30% de adultos y 5% niños. Las translocaciones que abarcan el gen *mll* se presentan en 5% de niños y adultos ⁽¹⁴⁾.

En LAM se utiliza la identificación de proteínas de fusión PML-RAR α , AML1-ETO y CBF- β -MYH11. Se han encontrado marcadores moleculares en leucemia, en diferentes estudios, tal es el caso del análisis del marcador molecular WT1, encontrando su expresión como de mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer y en LA ⁽¹⁶⁾.

c) Tratamiento y pronóstico

Antes de un tratamiento, la mayoría de los enfermos que tienen LA mueren en los 4 meses seguidos al diagnóstico.

En LAL, en más del 90% de los pacientes en el primer ciclo de quimioterapia se controla la enfermedad. El 50% de los niños no presenta recidiva después del tratamiento. Los niños entre 3 y 7 años son los que tienen el mejor pronóstico; en los mayores de 20 años no es tan bueno. Los niños o adultos cuyos glóbulos blancos iniciales son inferiores a 25 000 por microlitro de sangre tienen mejor pronóstico que aquellos cuyos glóbulos blancos iniciales son más elevados ⁽¹⁷⁾.

Unas semanas o meses después del tratamiento inicial intensivo dirigido a la destrucción de las células leucémicas, se administra un tratamiento adicional (quimioterapia de consolidación) a fin de destruir cualquier célula leucémica residual, el tratamiento puede durar de 2 a 3 años.

El trasplante de la MO ofrece mejor oportunidad de recuperación, pero este procedimiento sólo puede realizarse si es posible obtener la MO de una persona que tenga un tipo de tejido compatible (HLA-compatible).

En LAM el 50% a 85% mantienen la enfermedad, el 20% a 40 % de las personas no manifiesta ningún signo de la enfermedad después de 5 años de tratamiento. El trasplante de MO incrementa la probabilidad de éxito al 40% a 50 %. Las personas de más de 50 años que contraen LAL después de recibir quimioterapia y radiación como tratamiento de otras enfermedades son las que presentan el peor pronóstico, responden a menos fármacos que otros tipos de leucemia y el tratamiento suele empeorar su estado, debido a que el tratamiento suprime la actividad de la MO.

Para el tratamiento de la Leucemia Promielocítica Aguda (M3) con la translocación $t(15; 17)$ y reordenamiento PML-RAR α , se utilizan protocolos que incluyen agentes quimioterapéuticos, como el ácido retinoico (ATRA), que actúa a través de la inducción de la diferenciación de promielocitos y blastos a células mieloides maduras, facilitando su apoptosis e induciendo la remisión completa en un 80 al 90% de los casos en pacientes de novo o en recaída. Sin embargo el tratamiento con ATRA cuenta con dos limitaciones: el desarrollo de resistencias a corto plazo y el Síndrome del ATRA, en el que no se logra erradicar el clon leucémico; razón por la cual se utiliza junto a quimioterapia. En LAM todos los pacientes con resultados positivos al gen PML-RAR α respondieron al tratamiento con ATRA, considerándolo de buen pronóstico. Por lo que han sido útiles en el diagnóstico rápido y en la detección de la enfermedad mínima residual durante el tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

En los tratamientos con quimioterapia el primer paso incluye citarabina durante 7 días y daunorubicina durante 3 días. En ambos casos, se prescriben fármacos adicionales como vincristina y prednisona. Entre otros tratamientos empleados esta la radioterapia, el trasplante de MO, la leucoferesis y la esplenectomía entre otros ⁽¹⁰⁾.

d) Inmunoterapia con antígenos

La continua búsqueda de tratamientos convencionales de las enfermedades neoplásicas junto con el conocimiento sobre el sistema inmunitario ha sido llevada en los últimos años al desarrollo de la inmunoterapia, pretendiendo activarlo e inducirlo a una respuesta específica contra los antígenos tumorales. Los antígenos específicos de tumor se expresan en la membrana celular, tal es el caso los genes de la familia *MAGE* que se expresan en las células tumorales. También se han realizado protocolos de vacunación empleando células dendríticas pulsadas con péptidos *MAGE* y una vez en su etapa de maduración son introducidas al paciente para activar a los linfocitos T ⁽¹⁸⁾.

4. Antígenos testiculares de cáncer

a) Definición

Los antígenos de tumor se les puede nombrar dependiendo del lugar de expresión, tal es el caso de los Antígenos Testiculares de Cáncer (CTAs por sus siglas en inglés cancer/testis antigens) cuya expresión se da en células testiculares. Estos genes no son expresados en tejido normal, excepto en testículo y en la placenta.

b) Clasificación de los CTAs

Los CTAs comprenden cerca de 44 distintas familias y 89 miembros son expresados solo en células de líneas germinales de testículo en adulto y en diferentes tipos de cáncer ⁽¹⁹⁾.

Los CTAs se localizan en el cromosoma X como se muestran en la Figura 3, cuyos genes pueden ser agrupados en familias de miembros homólogos (ej. *MAGE, BAGE, GAGE* y *LAGE*), los cuales se expresan en la espermatogonia y espermatozoides primarios, donde un pequeño número de CTAs puede ser identificado en el estado de diferenciación de la espermatogénesis ⁽²⁰⁾.

c) Familia *MAGE*

i. Definición

Los genes de la familia *MAGE* llevan este nombre porque son antígenos que se asocian a Melanoma, pertenecen a la familia de los CTAs ⁽²¹⁾.

ii. Clasificación

La familia *MAGE* está compuesta de 19 miembros, localizados en el cromosoma X. Los 19 genes *MAGE* son divididos en cuatro subfamilias (A a D), en la ubicación cromosómica y tiene similitud en la codificación de proteínas. La subfamilia *MAGE-A* comprende 12 genes donde son fuertemente agrupados dentro de 3.5 Mb en el cromosoma Xq28. Cuatro genes *MAGE-B* son localizados en Xp21.3 y un gen *MAGE-C1* es localizado en Xq26-27 (Figura 3). Varios genes *MAGE-A*, dos genes *MAGE-B*, y el gen *MAGE-C1* son expresados y codificados en proteínas en una gran proporción de tumores de varios tipos de tejidos histológicos⁽²²⁾.

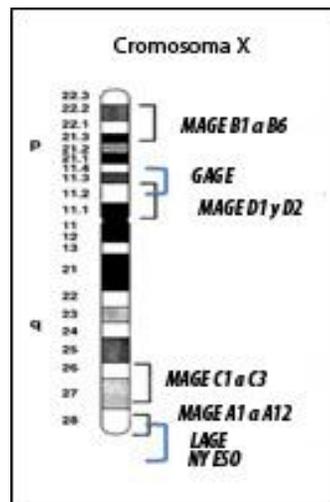


Figura 3. Localización de los CTAs en el cromosoma X. *MAGE-A3* y *MAGE-A4* (Xq28), *MAGE-B2* (Xp21.3) y *MAGE-C1* (Xq26-27); *GAGE* (Xp11.2-11.4); *LAGE-1* y *NY-ESO-1* (Xq28). Tomado de Lucas S, 2000 y modificado.

iii. Estructura a nivel genético del mensajero y de la proteína, de los CTAs.

Los genes *MAGE* son activados y la proteína correspondiente es expresada. La activación del gen *MAGE* se relaciona con la desmetilación del promotor. Los promotores del gen *MAGE-A1* contienen varias secuencias cis-reguladoras, localizadas del nucleótido -792 a +45. Los dominios B y B' son críticos para la expresión del gen *MAGE*. Cada dominio contiene sitios unidos a los factores de transcripción Ets, incluyendo a los sitios CpG, donde estos CpG son metilados, los factores de transcripción Ets pueden ser unidos a los dominios B y B'⁽²³⁾(Figura 4).

La mayoría de las proteínas *MAGE* tienen una longitud de 309 a 319 aminoácidos. Estas proteínas son desprovistas de señal de secuencia, contienen un dominio potencial transmembranal y puede funcionar solamente en asociación con el dominio transmembranal de otra proteína. Los miembros de la familia *MAGE* (*A1-A4*) interactúan con las proteínas nucleares SKIP e histona deacetilasa 1, para inhibir la activación transcripción mediada por Notch-IC ⁽²⁴⁾.

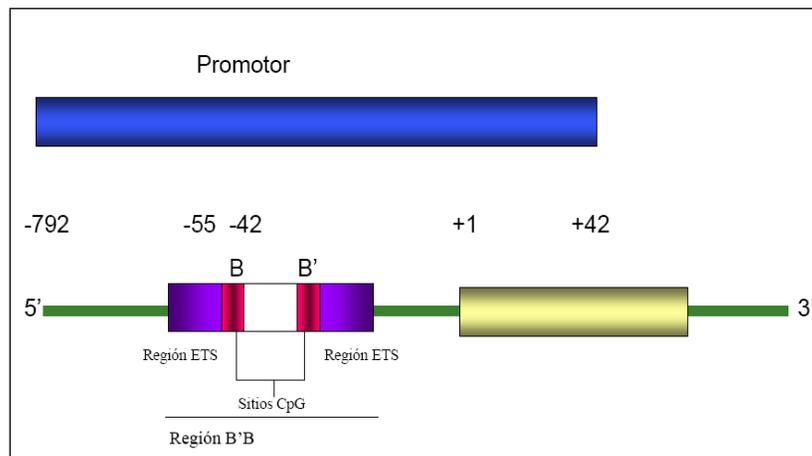


Figura 4. Expresión de *MAGE*, en las Secuencia cis-reguladoras. Localización de los nucleótidos -792 a +42, los dominios B y B', con sitios unidos a los factores de transcripción Ets. Tomado de Xiao J 2004.

Los antígenos de melanoma *B* (*BAGE*) son una familia de genes y genes truncados localizados en las regiones en la heterocromatina en varios cromosomas humanos. En el loci del gen *BAGE* son hipermetilado en tejido normal e hipometilados en un 98% en canceres humanos ⁽²⁵⁾.

iv. Detección de CTAs en Cáncer.

Los CTAs se expresan en melanomas, mieloma en células escamosas de esófago en carcinomas ⁽²⁶⁾, mieloma ⁽²⁷⁾ en carcinoma de cabeza y cuello ⁽²⁸⁾, en células de carcinoma

de pulmón ⁽²⁹⁾, también se expresa en carcinoma de vejiga ⁽³⁰⁾, carcinoma gástrico ^(31, 32, 33), de ovario ⁽³⁴⁾, carcinoma de endometrio ⁽³⁵⁾, cáncer mamario ⁽³⁶⁾ seminomas, neuroblastomas, carcinoma hepatocelular, carcinoma colorectal ^(32, 37), osteosarcoma ⁽³⁸⁾ y se expresa a nivel de RNAm en una proporción de leucemias humanas ⁽³⁹⁾.

v. *Función*

Los CTAs juegan un papel biológico importante durante la embriogénesis y en la apoptosis principalmente. Sin embargo, la función de los CTAs es poco conocida. El gen *MAGE-b4* de ratón, altamente homólogo con el gen *MAGE-B* en humano, en un estudio se encontró que la proteína *MAGE-b4* se localiza en el citoplasma de la célula y no en el núcleo. Se encontró la expresión del gen *MAGE-b4* en testículo y en células germinales (gonocitos), en continua proliferación en estadio G0/G1, diferenciándose en células de los cordones espermáticos, después los gonocitos se diferenciaron a espermatogonias, que a su vez durante la adolescencia las células de espermas se diferencian en la meiosis. Esto es razonable por los genes *MAGE* del subgrupo I, que juega un rol importante en la embriogénesis y son desactivados por el mecanismo genético de metilación. En el caso de las formaciones de tumor, estos genes son reactivados y las proteínas pueden ser reconocidas por el sistema inmune ⁽²³⁾.

El gen *NY-ESO* (también CTA), es probablemente el miembro más inmunogénico del grupo y también capaz de inducir respuesta humoral en los linfocitos T citotóxicos y células T CD4⁺. Recientemente se determinó una alta homología con *LAGE-1* y este es reportado como inductor en la regulación específica CD25⁺/CD4⁺ en tumores de melanoma por linfocitos infiltrados. *NY-ESO-1* se expresa >60 % de mal pronóstico en diagnósticos de mieloma. ⁽⁴⁰⁾.

vi. Importancia clínica

La búsqueda de antígenos específicos de tumor es una de las mayores líneas de investigación en cáncer, tal es el caso del cáncer de colon, vejiga y ovario, analizando a los CTAs y a las células T CD8⁺ obteniendo alta significancia en pronósticos positivos ⁽⁴¹⁾.

Para mejorar el pronóstico en carcinoma de pulmón, se han realizado análisis de los CTAs *MAGE-A4* y *NY-ESO-1*, encontrando una correlación inversa entre *MAGE-A4* y en la sobrevida del paciente, combinada con la infiltración de células T CD4⁺ y CD8⁺ predisponiendo a una mejor sobrevida ⁽²⁹⁾.

Experiencia de pacientes que son sometidos a trasplante alogénico de células troncales, especialmente trasplantes no mieloablativos, sugieren que las células tumorales son susceptibles a efectos de los linfocitos T citotóxicos, por lo tanto proporciona antígenos blanco en el marco clínico. Siendo los CTAs moléculas apropiadas para vacunas en enfermedades hematológicas, por su alta inmunogenicidad *in vivo* y la falta de expresión de los CTAs en tejido normal hace que pueda ser usada para reconocer enfermedades malignas y recaídas o para monitorear la respuesta al tratamiento y/o determinar la progresión de la enfermedad, relacionada como mal pronóstico en cáncer. También puede sinergizarse con la quimioterapia, con la probabilidad de ser menos tóxicos y más específicos que la quimioterapia e inducir memoria inmune que pueden prevenir recaídas de la enfermedad ^(42, 43, 44).

JUSTIFICACION

Dentro de las principales causas de muerte, la leucemia ocupa el séptimo lugar y de las neoplasias hematológicas, la Leucemia Aguda tiene mayor incidencia. En la actualidad en muchos casos de pacientes con padecimientos hematológicos, existe una limitada eficacia de las estrategias terapéuticas convencionales (quimioterapia, radioterapia, etc.), además de una toxicidad para el paciente así como un bajo porcentaje de remisión completa en adultos. Esto ha provocado la búsqueda de tratamientos alternativos. Tal es el caso de la inmunoterapia adoptiva, que consiste en la manipulación, activación o estimulación del sistema inmune para lograr una respuesta inmunológica contra las células neoplasias. Se sabe que los CTAs se expresan en cánceres sólidos, a nivel de mensajero y de proteína, pero en padecimientos hematológicos han sido poco explorados. Por lo que nos lleva a la siguiente pregunta de investigación, ¿Los genes *MAGE-A3, A4, B2* y *C1; BAGE-1; GAGE; LAGE-1* y *NY-ESO-1* se expresan en Leucemia Aguda?

HIPOTESIS

Se espera que los genes *MAGE-A3, A4, B2* y *C1; BAGE-1; GAGE; LAGE-1* y *NY-ESO-1* se expresen en las células de los pacientes con Leucemia Aguda.

OBJETIVOS

General:

- ♦ Analizar la expresión a nivel de mRNA de los genes *MAGE-A3, A4, B2* y *C1; BAGE-1; GAGE; LAGE-1* y *NY-ESO-1* en pacientes con leucemia aguda.

Particulares:

- ♦ Estudiar la expresión de *MAGE-A3* para ampliar el estudio previo de Martínez A. 2003.
- ♦ Determinar la expresión a nivel de mRNA de los genes *MAGE-A4, B2* y *C1; BAGE-1; GAGE; LAGE-1* y *NY-ESO-1* en células de pacientes con leucemias agudas.
- ♦ Conocer la frecuencia de expresión de los CTAs a nivel de mRNA en pacientes con leucemias agudas.
- ♦ Conocer la frecuencia de los CTAs según el tipo de la leucemia aguda mieloblástica y linfoblástica.
- ♦ Determinar si existe correlación entre la expresión de los genes CTAs de mayor frecuencia y la sobrevida del paciente.

METODOLOGIA

1. Diseño experimental

El presente trabajo tiene un diseño transversal, experimental y prospectivo. Los datos se analizan por Chi-cuadrada y porcentaje de frecuencia, mediante el paquete estadístico SPSS.

Tamaño de muestra

Se incluyeron en el estudio 71 pacientes con diagnóstico de Leucemias Agudas sin tratamiento de (Novo), del servicio de Hematología del Hospital General de México durante los meses de marzo del 2009 a enero del 2010.

Criterios de Inclusión

Pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica y Mieloblástica, sin tratamiento, hombres o mujeres, mayores de 18 años, a quienes se les realizó toma de muestra de medula ósea, con hoja de conocimiento aprobado del servicio de Hematología.

Criterios de exclusión

Pacientes sin diagnóstico de Leucemia Aguda, subsecuentes, menores de 18 años y sin hoja de conocimiento aprobado.

2. Cultivo de líneas celulares

Para este trabajo además de tener como control positivo al tejido testicular, se determinó nuestro control positivo en enfermedades Hematológicas, utilizando las siguientes líneas celulares indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Líneas celulares de enfermedades hematológicas.

<i>Línea celular</i>	<i>DX del paciente</i>
HL-60	LAM M3
REH	LAL, indiferenciada, no T no B
MOLT-4	LAL, linfoblasto T
Jurkat	LAL, linfocito T
K562	LGC, eritroleucemia
U-937	Linfoma no Hodgkin
Raji	Linfoma de Burkitt (B), etnicidad negra
Ramos	Linfoma de Burkitt (B), etnicidad caucásica

Reportado por el ATCC.

Todas las líneas fueron obtenidas del banco de líneas celulares del Laboratorio de Biología Molecular de Hematología (U-204 del HGM). Se cultivaron en condiciones estériles con medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY), L-glutamina 2µM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratorios, Logan, UT), adicionando 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomocina y 2-mercaptoetanol 50 µM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y se mantuvieron en incubación a temperatura de 37 °C y a una atmosfera de 5% de CO₂. Manteniendo una densidad entre 1 x 10⁵ y 1 x 10⁶ de células viables por mililitro, cultivadas cada 48 horas.

3. Aislamiento de células mononucleares de controles negativos y pacientes.

Se colectaron muestras de SP (sangre periférica) de donadores normales y MO de pacientes con LA, usando una jeringa previamente heparinizada o con EDTA para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras obtenidas, se diluyeron con PBS 1X en una porción de 1:1 homogenizado por inversión, después se pipeteó cuidadosamente sobre un tercio del volumen total de la sangre en Ficoll-Hystopaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma) a una densidad de 1.077 g/mL, evitando que la sangre y el Ficoll de separación se mezclen. Posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos a 4°C, pasado el tiempo se observaron las interfaces de sangre, Ficoll, células mononucleadas y plasma; se recogió la fracción mononuclear y se diluyó con PBS 1X para ser lavada y centrifugada a 2500rpm por 10 minutos a 4°C; se decantó o aspiró el sobrenadante (rico en plaquetas) y finalmente se resuspendió el pellet (rico en células mononucleadas) en PBS 1X, almacenando las muestras a -80°C hasta su uso.

4. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA de las células mononucleadas de *donadores sanos* así como de las *líneas celulares* (K562, MOLT-4, HL-60, Jurkat, Reh, Raji, U-937 y Ramos) se usaron los reactivos de Trizol, cloroformo y alcohol isoamílico. Se agregaron 1000 µL de agente Trizol (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) directamente en el microtubo y se incubó el homogenizado por 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de Trizol, se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó de 2 a 3 minutos. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos en una centrifuga (Hettich universal 32 R) a 4°C. Después de centrifugar se observaron tres fases: la parte inferior (Trizol), la intermedia (DNA y proteínas) y la superior (RNA). Se colectó la última fase y se agregaron 500 µL de isopropanol por cada mL de Trizol, para precipitar

el RNA mezclándose ligeramente y se dejó incubando toda la noche. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y entonces se agregaron 500 µL de etanol al 75 %, se agitó y se centrifugó a 6,500 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente por 5 o 10 minutos. Finalmente se disolvió el RNA en agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsa (Gibco USA) de 10 a 40 µL. Para linearizar el RNA se incubó a 70°C por 10 minutos. Se cuantificó y se determinó su pureza. Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C.

En las células de pacientes con leucemia, se extrajo el RNA por medio de la técnica de Chomczynski⁽⁴⁵⁾. Agregando 500 µl de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, sarcosyl al 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1 M), mezclando con vortex hasta homogenizar por periodos cortos no más de 30 segundos cada uno. Después se adicionaron 100 µL de acetato de sodio 2M, pH 4, directamente en el microtubo, se agitó vigorosamente 5 segundos dos veces. Luego se agregaron 500 µL de fenol saturado homogenizado por inversión, posteriormente se adicionaron 100 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1, v/v) y se agitó vigorosamente hasta homogenizar por completo. Se dejó incubar a 4°C durante 15 minutos. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se observaron tres fases: la parte inferior (acetato de sodio y fenol saturado), la intermedia (DNA y proteínas) y la superior (RNA). Se colectó la última fase y se agregaron 1000 µL de etanol absoluto (99.9%) frío para precipitar el RNA mezclándose ligeramente por inversión y se colocó a -20°C incubando toda la noche. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado agregando 500 µL de etanol al 75 %, se agitó y se centrifugó a 6,500 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se dejó secar ligeramente a temperatura ambiente por 5 o 10 minutos. Finalmente, se disolvió el RNA en agua inyectable de 10 a 40 µL. Para linearizar el RNA se incubó a 70°C por 10 minutos. Se cuantificó y se determinó su pureza. Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C.

Para la extracción de RNA de *tejido de biopsias de testículo* utilizado como control positivo, las cuales fueron colectadas del servicio de Urología (U-105A del HGM), se colocaron en una solución de PBS 1X, posteriormente se transfirió a uno tubo falcon de 50 mL con 1 mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) por cada 50 a 100 mg de tejido y fueron disgregadas con ayuda del politron (POLYTRON dispersing and mixing, Technology kinematica, Switzerland), manteniendo las muestras en hielo. Luego se transfirió a un microtubo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se agregaron 200 μ L de cloroformo por cada mL de Trizol, se agito vigorosamente por 15 segundos y se incubó de 2 a 3 minutos. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos en una centrifuga (Hettich universal 32 R) a 4°C (con la finalidad de eliminar el exceso de grasa, proteínas y otro material extracelular). Se colectó la última fase (de cloroformo) en un tubo limpio y se agregaron 1000 μ L de etanol absoluto (99.9%) para precipitar el RNA mezclándose ligeramente y se dejo incubando toda la noche. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4°C, se decantó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μ L de etanol al 75%, se agitó y se centrifugó a 6,500 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se resuspendió y alineó a 70°C por 10 minutos. Se cuantificó, se determinó su pureza, y las muestras de RNA se almacenaron a -80°C.

5. Cuantificación de RNA.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de RNA total por espectrofotometría mediante la lectura de su absorbancia en un Espectrofotómetro (JENWAY 6105) con luz UV y se leyó la absorbancia a longitud de onda de 260 y 280 nm, respectivamente, después se calculó la concentración (μ g/ μ L de RNA = $A_{260} \times$ Factor de dilución \times 0.04) y se calculó la pureza comparando la relación entre las absorbancias ($A_{260/280}$) del RNA.

6. Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de la calidad del RNA se corroboró por electroforesis de gel al 1% de agarosa (GIBCO, BRL) y para el análisis de productos de PCR se utilizó una concentración al 2% de agarosa, teñido el gel con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se utilizó como solución amortiguadora TAE 1X pH 7.6 (Tris-HCl 40 mM, ácido acético y Na₂EDTA 2 mM). Se colocaron en los pozos del gel 2 µg de muestra de RNA y 2 µl de colorante (Loading Buffer al 1%), efectuando la electroforesis en una cámara (Electroforetic gel system, VWR) por 35 minutos a 60 volts. Para los productos de PCR se colocaron 10 µl en el pozo del gel, utilizando 60 volts por 45 minutos. El gel fue visualizado por transiluminador (Foto/UV21, Fotodyne) y se tomó fotografía con cámara Fotodyne 1060 y película polaroid.

7. Síntesis de cDNA (Reverso Transcripción)

Se utilizaron 5 µg/µL de RNA para la reacción, se efectuó en un volumen final de 20 µl. El RNA se mezcló con 0.8 µl (0.5 µg/µl) de oligo (dT)₁₅ (PROMEGA, Madison WI, USA), luego se incubó a 70°C por 10 minutos y se puso en hielo. Se adicionaron 5 µl, de Buffer 5X (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCL, 3 mM MgCl₂ 10 mM DTT) (PROMEGA, Madison WI, USA), 3 µL de dNTPs 10 µM (INVITROGEN, Canada) y el volumen correspondiente H₂O inyectable y se incubó a 37°C por 2 minutos, posteriormente se adicionó 1 µl de M-MLV RT (200 U/µl) (PROMEGA, Madison WI, USA) y se incubó 37°C por 50 minutos. Se inactivó la enzima incubando a 70°C por 15 minutos.

8. Amplificación de CTAs por PCR.

Los primers fueron utilizados para la detección de los genes *MAGE-A3, B2* y $\beta 2$ -*microglobulina* por Martínez A. y cols. en el 2006 y los genes *MAGE-A4, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE, LAGE-1* y *NY-ESO-1* fueron previamente utilizados por Andrade V. y cols. en el 2008. La secuencia de cada primer, el tamaño del producto y el exón, se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Primers para amplificar los genes de CTAs y el control del gen constitutivo.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia de primer</i>	<i>Tamaño de producto (pb)</i>	<i>Exón</i>	<i>T° de amplificación</i>
<i>MAGE-A3</i>	5'-TGGAGGACCAGAGGCCCCC-3'(F) 5'-GGACGATTATCAGGAGGCTGC-3'(R)	725	2 y 3	67
<i>MAGE-A4</i>	5'-GAGCTGCTCTGTCTGAC-3'(F) 5'-AAGGACTCTGCGTCAGGC-3'(R)	523	5 y 6	64
<i>MAGE-B2</i>	5'-CTGACTTCCGCTTTGAGGC-3'(F) 5'-GCACCCCAGAAACAGAAGAGGAACA-3'(R)	230	3 y 4	67
<i>MAGE-C1</i>	5'-GACGAGGATCGTCTCAGGTCAGC-3'(F) 5'-CCTGCCCATCAGGACCATC-3'(R)	632	1 y 4	67
<i>BAGE-1</i>	5'-TGGCTCGTCTCACTCTGG-3'(F) 5'-TCCTGTTGAGCTGCCGTCT-3'(R)	275	6	58
<i>GAGE</i>	5'-TATGCGGCCCGAGCAGTT-3'(F) 5'-CCTGCCCATCAGGACCATC-3'(R)	209	1 y 4	64
<i>NY-ESO-1</i>	5'-CCCCACCGCTTCCCGTC-3'(F) 5'-CTGGCCACTCGTGCTGGGA-3'(R)	275	1 y 3	67
<i>LAGE-1</i>	5'-CTCCCCACCATCCAACCTCCCC-3'(F) 5'-GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGC-3'(R)	332/561	2c	69
$\beta 2$ - <i>microglobulina</i>	5'-CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC-3'(F) 5'-ATGTCTCGTCCGTGGCCTTAGCT-3'(R)	394	2 y 3	55

En la amplificación se usó el 7% de reacción de la primera hebra (0.35 μ g/ 0.7 μ l de la reacción de cDNA) para la PCR. Adicionando los siguientes reactivos en un microtubo, en un volumen de reacción final de 10 μ l, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Reactivos para PCR.

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Concentración</i>
Flexi Buffer Green GoTaq (Tris-HCl 2.5 mM, NaCl 62.5 mM) (PROMEGA, Madison WI, USA)	2.5µl	1X
MgCl₂ (PROMEGA, Madison WI, USA)	0.7 µl	1.75 µM
dNTP Mix (INVITROGEN, Canada)	0.7 µl	0.7 µM
primer 5' (INVITROGEN, Canada)	0.7 µl	0.7 µM
primer 3' (INVITROGEN, Canada)	0.7 µl	0.7 µM
cDNA	0.7 µl	0.35µg
Taq Flexi DNA polimerasa (PROMEGA, Madison WI, USA)	0.1 µl	0.5 U
H₂O inyectable	3.9 µl	

Para la reacción se usó el termociclador (Axigen Maxigene), programado a diferentes temperaturas durante tiempos determinados, indicados en la tabla 7.

Tabla 7. Ciclos de RT-PCR.

Desnaturalización, 94°C, 2 minuto	1 ciclo
94°C, 45 segundos	
Tm de c/gen, 45 segundos	30 ciclos
72°C, 1 minuto	
Elongación, 72°C, 10 minutos	1 ciclo

Tm=temperatura de amplificación.

9. Secuenciación de los CTAs.

Se realizó la amplificación de los genes por RT-PCR de las muestras con controles positivos. Posteriormente se efectuó la electroforesis en gel de agarosa (GIBCO, BRL) con bajo punto de fusión al 2%. Después se colectaron los amplificados en microtubos, para ser purificados y secuenciados con el kit (ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing). La secuencia fue alineada en el programa BLAST del Gene-Bank.

RESULTADOS

1. Análisis de la expresión de los CTAs en individuos sanos.

Con la finalidad de corroborar la ausencia de la expresión de los CTAs en tejido normal, se obtuvieron células mononucleadas de SP de 8 individuos sanos, se les aisló el RNA y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 5 se observan las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S, lo que nos permitió corroborar la calidad de la muestra (figura 5a), después se sintetizó cDNA, se realizó RT-PCR para amplificar el gen de expresión constitutiva *β2-microglobulina*, mostrando un fragmento de 394 pb para cada individuo sano (figura 5b).

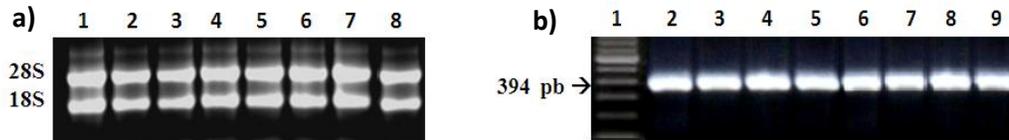


Figura 5. Análisis de la calidad del RNA obtenido de células mononucleares de SP de 8 individuos sanos. **a)** Se observan en los carriles del 1 al 8 a los individuos sanos, mostrando las bandas 28S y 18S. **b)** Se muestra el gen control *β2-microglobulina*, en el carril 1 el marcador de peso y del carril 2 al 9 los individuos sanos, mostrando una banda de 394 pb.

Comprobada la calidad del RNA mediante *β2-microglobulina*, se realizó RT-PCR empleando oligonucleótidos previamente reportados^(38, 45), se utilizó la línea celular K562 como control positivo y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se observa en la figura 6 la expresión de los CTAs; *MAGE-A3* (figura 6a), *MAGE-A4* (figura 6b), *MAGE-B2* (figura 6c), *MAGE-C1* (figura 6d), *BAGE-1* (figura 6e), *GAGE* (figura 6f), *LAGE-1* (figura 6g) y *NY-ESO-1* (figura 6h), mostrando en la tabla 8 el fragmento amplificado para cada gen. Se comprobó que en los individuos sanos está ausente la expresión de los CTAs, como se reporta en la literatura⁽¹⁹⁾.

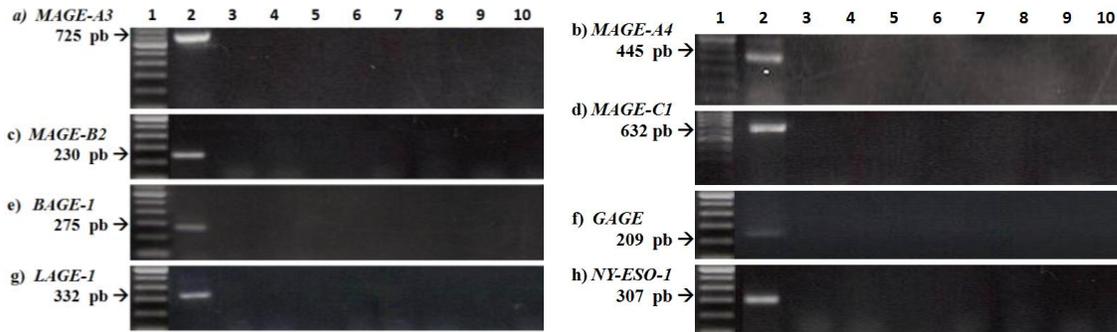


Figura 6. Análisis de la expresión de los CTAs en individuos sanos. En el carril 1 se muestra el marcador de peso, en el carril 2 a K562, en el carril 3 el blanco de reacción y del carril 4 al 10 los individuos sanos. a) *MAGE-A3* (725 pb), b) *MAGE-A4* (445 pb), c) *MAGE-B2* (230 pb), d) *MAGE-C1* (632 pb), e) *BAGE-1* (275 pb), f) *GAGE* (209 pb), g) *LAGE-1* (332 pb) y h) *NY-ESO-1* (307 pb).

2. Análisis de la expresión de los CTAs en tejido testicular.

Se aisló RNA del Tejido testicular, se sintetizó cDNA y se realizó RT-PCR, analizando al gen constitutivo *β2-microglobulina* y los genes CTAs, utilizando oligonucleótidos previamente reportados ^(39; 46). En la figura 7 se observa la expresión de los CTAs, mostrando en la tabla 8 el fragmento esperado para cada gen; *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1*, *BAGE-1*, *GAGE*, *LAGE-1* y *NY-ESO-1*, corroborando la expresión de los CTAs en tejido testicular, previamente reportado en literatura ⁽¹⁹⁾.

Tabla 8. Fragmentos esperados de los CTAs.

CTAs	Fragmento (pb)
<i>MAGE-A3</i>	725
<i>MAGE-A4</i>	445
<i>MAGE-B2</i>	230
<i>MAGE-C1</i>	632
<i>BAGE-1</i>	275
<i>GAGE</i>	209
<i>LAGE-1</i>	332
<i>NY-ESO-1</i>	307

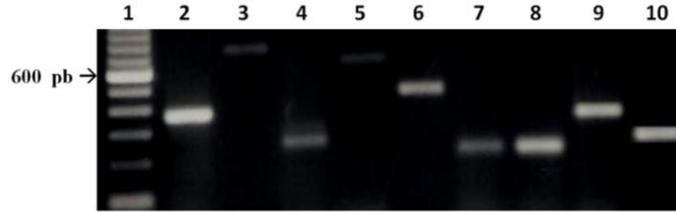


Figura 7. Análisis de los CTAs en tejido testicular. Se observa en el carril **1** al marcador de peso, en el **2** a $\beta 2$ -microglobulina (394 pb), en el **3** *MAGE-A3* (725 pb), en el **4** a *MAGE-B2* (230 pb), en el **5** *MAGE-C1* (632 pb), en el **6** a *MAGE-A4* (445 pb), en el **7** a *BAGE-1* (275 pb), en el **8** *GAGE* (209 pb), en el **9** a *LAGE-1* (332 pb) y en el **10** a *NY-ESO-1* (307 pb).

3. Análisis de la expresión de los CTAs en líneas celulares.

Con el fin de analizar la expresión de los genes CTAs; *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1*, *BAGE-1*, *GAGE*, *LAGE-1* y *NY-ESO-1* en enfermedades Hematológicas, se utilizaron 8 líneas celulares; HL-60 (LAM), REH (LAL), MOLT-4 (LAL), Jurkat (LAL), K562 (LGC), U-937 (Linfoma no Hodgkin), Raji (Linfoma de Burkitt) y Ramos (Linfoma de Burkitt), como se muestra en la figura 8. Se aisló el RNA y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S (figura 8a).

Se realizó la síntesis de cDNA amplificando el gen constitutivo $\beta 2$ -microglobulina, dando un fragmento 394 pb (figura 8b) en cada una de ellas.

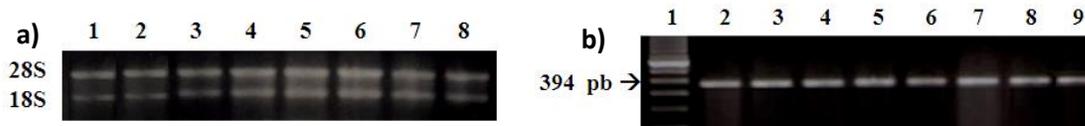


Figura 8. Análisis de la calidad del RNA obtenido de líneas celulares Hematológicas. **a)** Se observa en los carriles del 1 al 8; HL-60, REH, MOLT-4, Jurkat, K562, U-937, Raji y Ramos, respectivamente, mostrando las bandas 28S y 18S. **b)** expresión del gen control $\beta 2$ -microglobulina (394 pb), del carril 2 a 9 las líneas celulares antes mencionadas.

En la figura 9 se observa el análisis de los genes *MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE, LAGE-1* y *NY-ESO-1* en líneas celulares de enfermedades Hematológicas: HL-60 (LAM M3), REH (LAL), MOLT-4 (LAL), Jurkat (LAL), K562 (LGC), U-937 (Linfoma no Hodgkin), Raji (Linfoma de Burkitt) y Ramos (Linfoma de Burkitt). Para la RT-PCR se emplearon oligonucleótidos previamente utilizados en tejido testicular. Se obtuvo para el gen *MAGE-A3* una banda de 725 pb, en las líneas HL-60 y K562 (figura 9a); para *MAGE-A4* se obtuvo un tamaño de 445 pb, para las líneas celulares HL-60, REH, Jurkat, K562, Raji y Ramos (figura 9b); para el gen *MAGE-B2* un tamaño de 230 pb en HL-60 y K562 (figura 9c); en *MAGE-C1* un tamaño de 632 pb, para K562 (figura 9d); en *BAGE-1* un tamaño de banda de 275 pb, para K562 (figura 9e); para el gen *GAGE* amplificando un tamaño de 209 pb, en las líneas celulares HL-60 y K562 (figura 9f); en *LAGE-1* dando un tamaño de 332 pb en K562 (figura 9g) y para gen *NY-ESO-1* amplificando un tamaño de 307 pb en K562 (figura 9h).

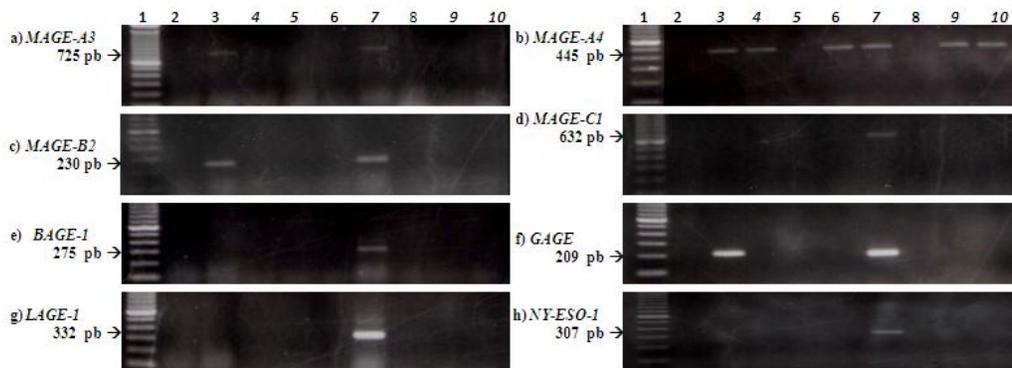


Figura 9. Análisis de la expresión de los CTAs en líneas celulares. Se muestra en el primer carril al marcador de peso, en el segundo al blanco de reacción, del carril 3 al 10 las líneas celulares; HL-60, REH, MOLT-4, Jurkat, K562, U-937, Raji y Ramos, respectivamente. **a)** *MAGE-A3* (725 pb), **b)** *MAGE-A4* (445 pb), **c)** *MAGE-B2* (230 pb), **d)** *MAGE-C1* (632 pb), **e)** *BAGE-1* (275 pb), **f)** *GAGE* (209 pb), **g)** *LAGE-1* (332 pb), **h)** *NY-ESO-1*(307 pb).

En resumen, la tabla 9 muestra las líneas celulares de enfermedades hematológicas, donde se puede observar en K562 la expresión de los 8 genes CTAs; seguida de la línea celular HL-60 siendo positiva en *MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2* y *GAGE*; en las líneas celulares REH, JURKAT, Raji y Ramos, se expresaron únicamente en el gen *MAGE-A4*; por último las líneas celulares MOLT-4 y U-937 fueron negativas para los genes CTAs.

Tabla 9. Expresión de CTAs en líneas celulares de enfermedades hematológicas.

LINEAS/CTAs	<i>MAGE-A3</i>	<i>MAGE-A4</i>	<i>MAGE-B2</i>	<i>MAGE-C1</i>	<i>BAGE-1</i>	<i>GAGE</i>	<i>LAGE-1</i>	<i>NY-ESO-1</i>
HL-60(LAM)	+	+	+	-	-	+	-	-
REH (LAL)	-	+	-	-	-	-	-	-
MOLT-4(LAL)	-	-	-	-	-	-	-	-
JURKAT (LAL)	-	+	-	-	-	-	-	-
K562(LMC)	+	+	+	+	+	+	+	+
U-937(L no H)	-	-	-	-	-	-	-	-
RAJI(LB)	-	+	-	-	-	-	-	-
RAMOS(LB)	-	+	-	-	-	-	-	-

Linfoma no Hodgkin (L no B), Linfoma de Burkitt (LB), positivo (+) y negativo (-).

4. Análisis de la expresión de los CTAs en pacientes con Leucemia Aguda.

4.1 Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Se colectaron un total de 71 pacientes con diagnóstico de LA sin tratamiento, que ingresaron al servicio de Hematología del Hospital General de México. La frecuencia de los pacientes con leucemia de origen mieloide fue de 49.3% (35/71), de los cuales para la leucemia de tipo M0 (indiferenciada) la frecuencia es de 1/71 (1.4%), para M1 (mieloide muy poco diferenciada) fue de 1/71 (1.4%), en la M2 (mieloide) fue de 11/71 (15.5%), para la leucemia de tipo M3 (promielocítica) la frecuencia es de 13/71 (16.9%), para M4 (mielomonocítica) fue de 8/71 (11.3%), en la M5 (monocítica) fue de 1/71 (1.4%) y en el tipo M6 (eritroide) fue de 1/71 (1.4%). Los pacientes con leucemia de origen linfoide

tuvieron una frecuencia de 50.7% (36/71), de los cuales para la leucemia de tipo L1 (microlinfoblasto) fue de 2/71(2.8%) y en el tipo L2 (población heterogénea) fue de 34/71 (47.9%) de estos pacientes (tabla 10).

Tabla 10. Pacientes con Leucemia Aguda de las diferentes estirpes

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje (%)
M0	1/71	1.4
M1	1/71	1.4
M2	11/75	15.5
M3	12/71	16.9
M4	8/71	11.3
M5	1/71	11.3
M6	1/71	1.4
L1	2/71	2.8
L2	34/71	47.9

Indiferenciada (M0), Mieloide muy poco diferenciada (M1), Mieloide (M2), Promielocítica (M3), Mielomonocítica (M4), Monocítica (M5), Eritroide (M6), Microlinfoblastica (L1) y Población heterogénea (L2).

En la figura 10, se analizó la frecuencia de los pacientes por sexo y edad, mostrando para el sexo masculino una frecuencia de 59.2% (42/71) y para el sexo femenino un 40.8% (29/71), siendo mayor en el género masculino. En la figura 11 se muestra el rango de edad acumulada de la población, de 18 a 40 años el 67.6% (48/71), de 41 a 60 años el 19.71% (14/71) y de 61 a 100 años solo 12.67% (9/71), con una mayor tendencia en la población de edad joven.

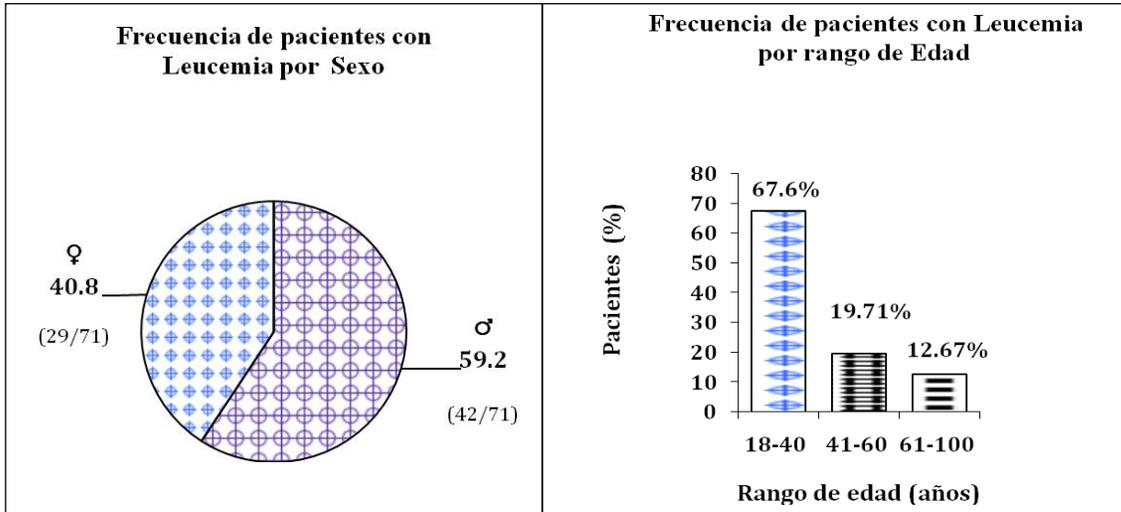


Figura 10. Frecuencia de pacientes con LA reclutados por sexo. Se muestran el sexo ♀ un 40.8% (29/71) y el sexo ♂ un 59.2% (42/71).

Figura 11. Frecuencia de pacientes con LA reclutados por edad. Se muestra un rango de 18-40 años (67.6%), de 41-60 años (19.71%) y de 61-100 (12.67%). Siendo mayor la frecuencia en el sexo ♂ y en un rango de edad de 18-40 años.

4.2 Integridad de RNA en pacientes

En la figura 12 se observa la calidad de las muestras de pacientes con leucemia, obtenidas de M.O., fueron aisladas las células mononucleares, se extrajo el RNA por medio de la técnica de Chomczynski (tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo) y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, observando para cada uno de los pacientes las dos bandas de RNA ribosomal 18S y 28S (figura 12a). Se determinó el gen constitutivo $\beta 2$ -*microglobulina*, amplificado un fragmento de 394 pb en todos los pacientes (figura 12b).

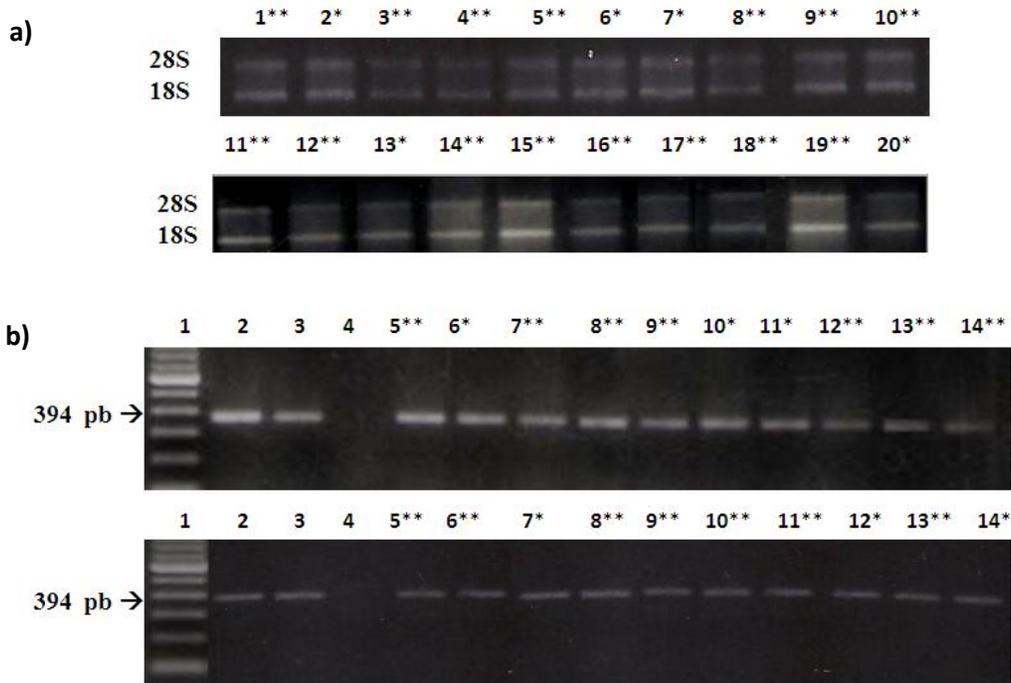


Figura 12. Análisis de la integridad del RNA en pacientes con leucemia aguda. **a)** Se observan en los carriles del 1 al 20 pacientes con LAM* y LAL**, mostrando las bandas 28S y 18S. **b)** el gen control $\beta 2$ -microglobulina (394 pb), se muestra en el primer carril el marcador de peso, en el segundo carril K562, en el tercer carril al individuo sano, en el cuarto carril blanco de reacción y del carril 5 al 14 pacientes, en ambas columnas.

4.3 Análisis de expresión de los CTAs en pacientes

El estudio se realizó por medio de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos previamente utilizados en tejido testicular. En la figura 13 se observa el análisis de expresión de los CTAs; *MAGE-A3* (figura 13a), *MAGE-A4* (figura 13b), *MAGE-B2* (figura 13c), *MAGE-C1* (figura 13d), *BAGE-1* (figura 13e), *GAGE* (figura 13f), *LAGE-1* (figura 13g) y *NY-ESO-1* (figura 13h), mostrando en la tabla 11 la frecuencia de expresión para cada gen. Se obtuvo en los pacientes con LA la expresión en más de un gen de los CTAs.

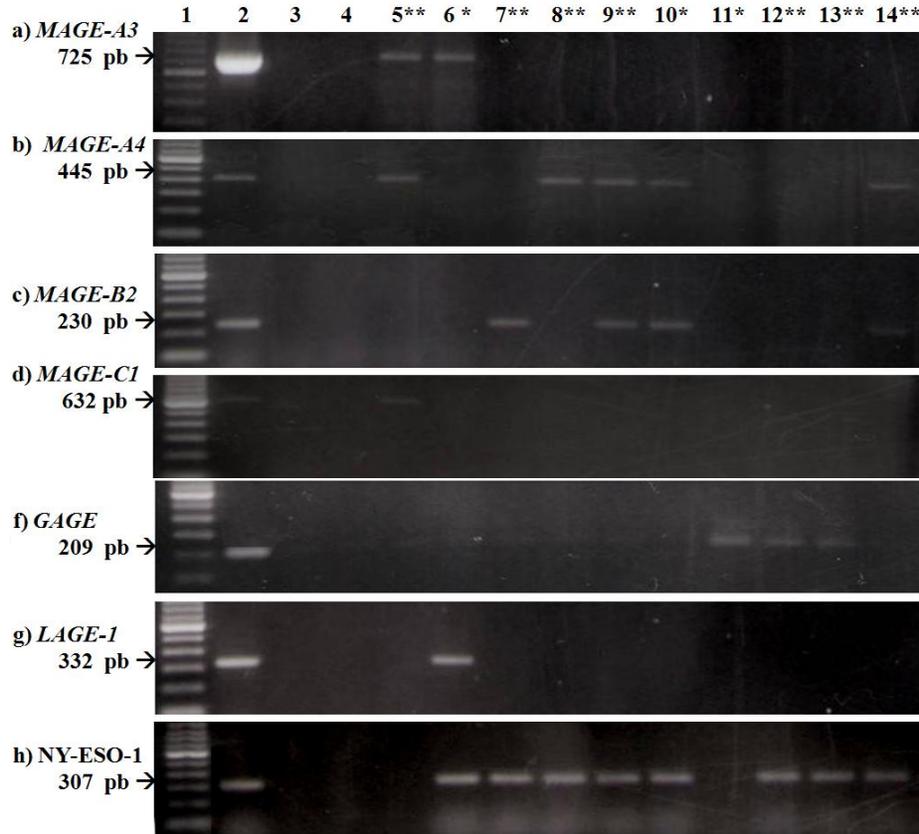


Figura 13. Análisis de la expresión de los CTAs en pacientes con L.A. Se muestra en el primer carril al marcador de peso, en el segundo a K562, en el tercer carril individuo sano, en el cuarto carril el blanco de reacción y del carril 5 al 14 pacientes con LAM* y LAL**. **a)** *MAGE-A3* (725 pb), **b)** *MAGE-A4* (445 pb), **c)** *MAGE-B2* (230 pb), **d)** *MAGE-C1* (632 pb), **e)** *BAGE-1* (275 pb), **f)** *GAGE* (209 pb), **g)** *LAGE-1* (332 pb) y **h)** *NY-ESO-1* (307 pb).

La tabla 11 resume la frecuencia de expresión de los CTAs en LAM y el LAL. Mostrando para el gen *MAGE-A3* en LAM que fueron positivos 2/35 (5.7%) y en LAL fueron positivos 3/36 (8.3%) pacientes. La frecuencia total de expresión en la LA fue de 7% (5/71) de los pacientes.

En el gen *MAGE-A4* en LAM fueron positivos 6/35 (17.1%) pacientes analizados, en el caso de LAL fueron positivos 6/36 (27.7%) pacientes. Se analizó la frecuencia total en LA siendo positivos el 22.5% (16/71) de los pacientes.

Para el gen *MAGE-B2*, en LAM fueron positivos 4/35 (11.4%) pacientes analizados y en LAL fueron positivos 5/36 (13.8%) pacientes. Se analizó la frecuencia total en LA siendo positivos el 12.7% (9/71).

El análisis del gen *MAGE-C1* en LAM fue únicamente positivo 1/35 (2.8%) pacientes analizados. Para LAL fue positivo 1/36 (2.7%) pacientes. Se analizó la frecuencia total en LA siendo positivos el 12.8% (2/7).

En el caso de los genes *BAGE-1* en LAM fueron positivos 2/35 (5.7%) pacientes analizados y en LAL los 36 fueron positivos 2/36 (2.7%). La frecuencia total en LA de los pacientes positivos fueron el 5.5% (2/71).

En el gen *GAGE* en LAM fueron positivos 5/35 (14.3%) pacientes analizados y en LAL fueron positivos 2/36 (5.5%) pacientes. La frecuencia de expresión en LA es del 9.9% (7/71) de los pacientes.

Para los genes *LAGE-1* en LAM fue positivo 1/35 (2.8%) pacientes y en el caso LAL ningún paciente fue positivo 0/36. Se analizó la frecuencia total en LA, resultando positivo el 1.4% (1/71) de los pacientes.

En el análisis de la expresión del gen *NY-ESO-1* en LAM fueron positivos 8/35 (22.8%) pacientes. Para LAL fueron positivos 8/36 (1.4%) pacientes. La frecuencia total de expresión en LA fue del 22.5% (16/71) de los pacientes.

La frecuencia de expresión de los CTAs en Leucemias Agudas se encontró de 54.9% (39/71).

La frecuencia de expresión de los genes, *MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE, LAGE-1* y *NY-ESO-1* en LAM y LAL, fue mayor al 10% en *MAGE (A4 y B2), GAGE* y *NY-ESO-1*, fue menor al 10% en *MAGE (A3 y C1), BAGE-1* y *LAGE*.

Tabla 11. Frecuencia de expresión de los CTAs en LAM y LAL.

CTAs	SANOS	LAM	LAL	Total de expresión en LA
<i>MAGE-A3</i>	0(0/8)	5.7(2/35)	8.3(3/36)	7(5/71)
<i>MAGE-A4</i>	0(0/8)	17.1(6/35)	27.7(10/36)	22.5(16/71)
<i>MAGE-B2</i>	0(0/8)	11.4(4/35)	13.8(5/36)	12.7(9/71)
<i>MAGE-C1</i>	0(0/8)	2.8(1/35)	2.7(1/36)	12.8(2/7)
<i>BAGE-1</i>	0(0/8)	5.7(2/35)	5.5(2/36)	5.5(2/71)
<i>GAGE</i>	0(0/8)	14.3(5/35)	5.5(2/36)	9.9(7/71)
<i>LAGE-1</i>	0(0/8)	2.8(1/35)	0(0/36)	1.4(1/17)
<i>NY-ESO-1</i>	0(0/8)	22.8(8/35)	22.2(8/36)	22.5(16/71)
TOTAL	0(0/8)	60(21/35)	50(18/36)	54.9(39/71)

4.4 Secuenciación de genes de los CTAs

Con el fin de corroborar la identidad de los genes CTAs en las muestras de pacientes analizadas, se secuenciaron las muestras de pacientes para cada gen, y se alinearon para determinar la identidad con las secuencias reportadas para cada CTAs.

En la figura 14 se observan los fragmentos de los genes CTAs que fueron secuenciados y se alinearon en el banco de datos GENE-BANK usando el programa BLASTN. Encontrando para el gen *MAGE-A3* un 98% de identidad (figura 14a), para *MAGE-B2* un 95.96% de identidad (figura 14b), para *GAGE* se encontró el 99% de identidad (figura 14c)

encontrado un 99% de identidad con la secuencia reportada para este gen (figura 14d).

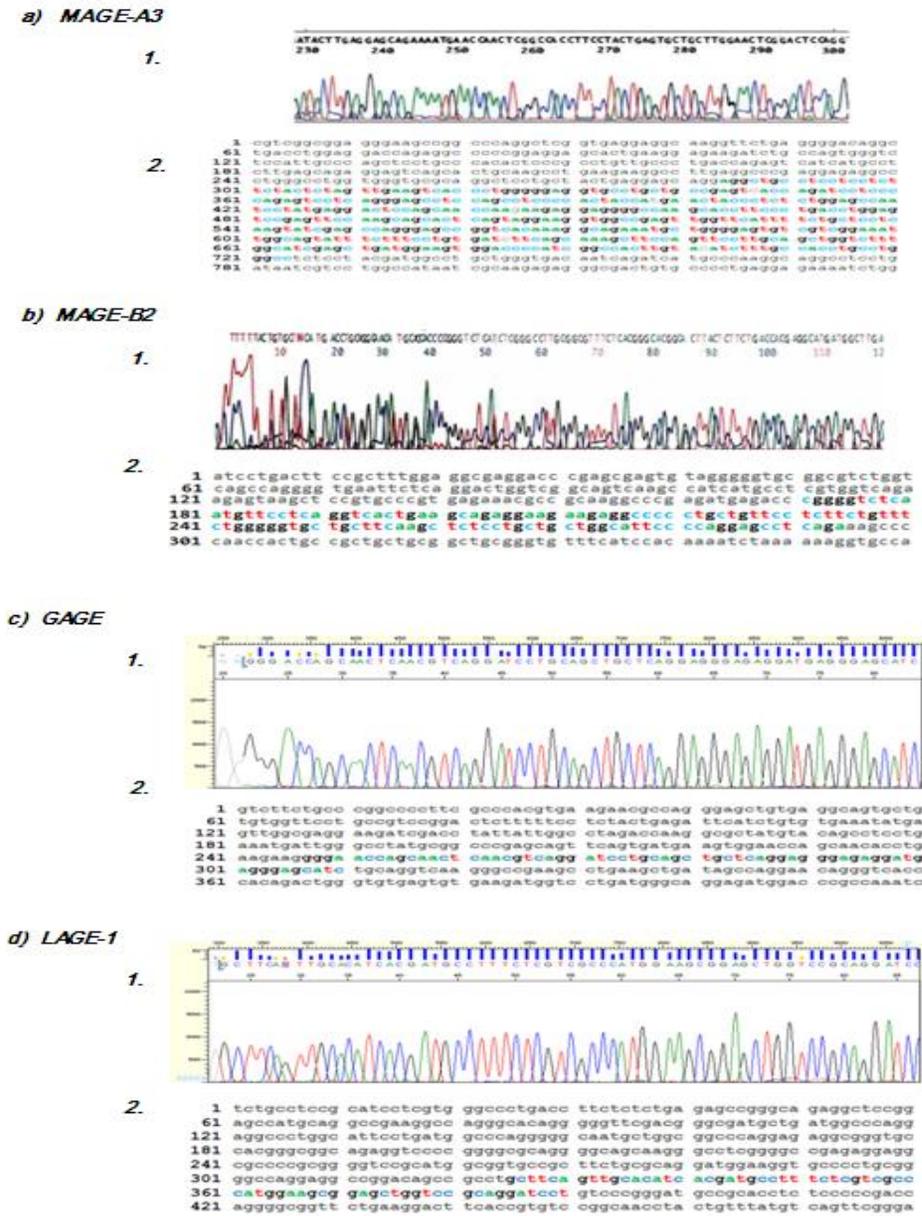


Figura 14. Secuenciación de los CTAs. **a) *MAGE-A3***; **b) *MAGE-B2***, **c) *GAGE*** y **d) *LAGE-1***. Se muestra en 1 la secuencia del producto amplificado y en 2 el alineamiento con la secuencia reportada, ubicando el fragmento del gen en color para cada nucleótido.

Para los demás genes para *MAGE-A4*, *MAGE-C1*, *BAGE-1* y *NY-ESO-1* se realizó la secuenciación y un alineamiento en el programa BLASTN del GENE-BANK, corroborando la identidad del gen de interés (datos no mostrados).

4.5 Frecuencia de los CTAs en LAL y LAM

La frecuencia encontrada en LAM fue de 21/35 (60%), en el caso de LAL fue de 18/36 (50%). Debido a la variedad en cada uno de los tipos de leucemia se realizó la determinación de la frecuencia por linaje.

En la figura 15 se muestran las frecuencias de los CTAs en LAM; encontrando en M0 0/1, para M1 1/1 (100%), M2 7/11 (63.6%), M3 7/10 (59.3%), M4 5/8 (62.5%), M5 1/1 (100%) y M6 0/1. En la figura 16 se observan las frecuencias de expresión en LAL; L1 1/2 (50%) y L2 17/34 (50%).

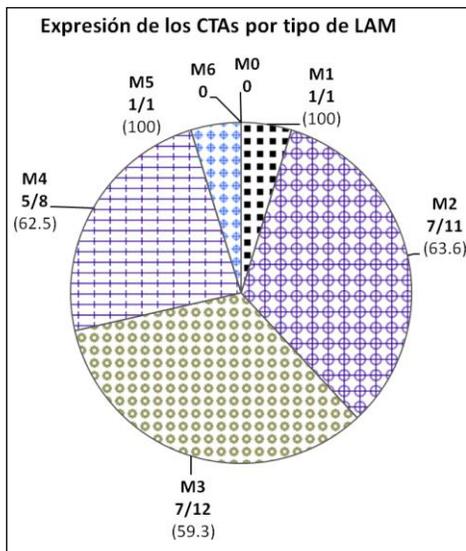


Figura 15. Frecuencia de expresión de los CTAs por tipo de LAM. Se observan las frecuencias para M0 0/1, M1 1/1 (100%), M2 7/11 (63.6%), M3 7/10 (59.3%), M4 5/8 (62.5%), M5 1/1 (100%) y M6 0/1

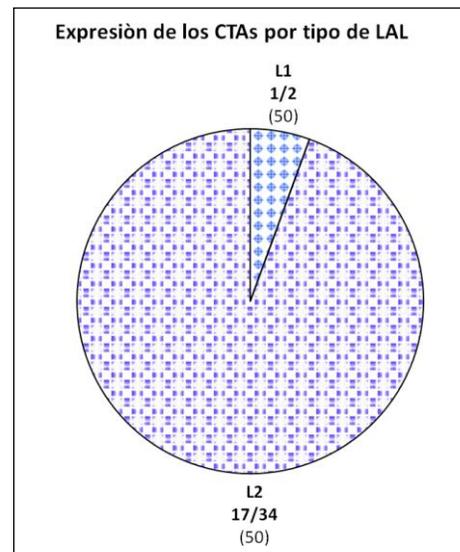


Figura 16. Frecuencia de expresión de los CTAs por tipo de LAL; Se observan las frecuencia de los genes en L1 1/2 (50%) y L2 17/34 (50%).

En detalle la expresión encontrada de cada uno de los CTAs por tipo de Leucemia se muestra en la tabla 12.

El gen *MAGE-A3* se expresa en la M2 en un 9.1% (1/11), en la M3 8.3% (1/12) y L2 8.8% (3/34).

El gen *MAGE-A4* se expresa en M1 (1/1) (100%), en la M2 (9.1%) (1/11), M3 (8.3%) (1/12), M4 (37.5%) (3/8) y L2 (32.3%) (11/34).

El gen *MAGE-B2* se expresa en la M1 (100%) (1/1), M3 (8.3%) (1/12), M4 (25%) (2/8), L1 (50%) (1/2) y L2 (5.8%) (2/34).

MAGE-C1 se expresa en M3 (8.3%) (1/12) y L2 (5.8%) (2/34).

El gen *BAGE-1* se expresa en M3 (16.6%) (2/12), en la M4 (12.5%) (1/8), M5 (100%) (1/1) y L2 (5.8%) (2/34).

GAGE se expresa en M2 (27.3%) (3/11) y L2 (5.8%) (2/34).

El gen *LAGE-1* se expresa en M3 (8.3%) (1/12).

Por último *NY-ESO-1* se expresa en M2 (27.3%) (3/11), M3 (16.6%) (2/12), M4 (37.5%) (3/8), L1 (50%) (1/2) y L2 (20.6%) (7/34).

Cabe destacar que los CTAs no se encontraron expresados para las Leucemias de tipo M0 y M6.

Tabla 12. Frecuencia de expresión los CTAs por tipo de LAM y LAL

DX	<i>MAGE-A3</i>	<i>MAGE-A4</i>	<i>MAGE-B2</i>	<i>MAGE-C1</i>	<i>BAGE-1</i>	<i>GAGE</i>	<i>LAGE-1</i>	<i>NY-ESO-1</i>
M1 n=1	-	1	1	-	-	-	-	-
%	-	100	100	-	-	-	-	-
M2 n=11	1	1	-	-	-	3	-	3
%	9.1	9.1	-	-	-	27.3	-	27.3
M3 n=12	1	1	1	1	-	2	1	2
%	8.3	8.3	8.3	8.3	-	16.7	8.3	16.7
M4 n=8	-	3	2	-	1	-	-	3
%	-	37.5	25	-	12.5	-	-	37.5
M5 n=1	-	-	-	-	1	-	-	-
%	-	-	-	-	100	-	-	-
L1 n=2	-	-	1	-	-	-	-	1
%	-	-	50	-	-	-	-	50
L2 n=34	3	10	4	1	2	2	-	7
%	8.8	29.4	11.7	2.9	5.9	5.9	-	20.6

4.6 Análisis de la sobrevida en LAM y LAL de los genes *MAGE-A4* y *NY-ESO-1*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se analizó la sobrevida por medio de Kaplan Maier en los pacientes con LAL, en los genes *MAGE-A4* y *NY-ESO-1* por ser los de mayor frecuencia de expresión; Se encontró que aquellos pacientes que expresaron *MAGE-A4* tuvieron menor tiempo de vida (figura 17).

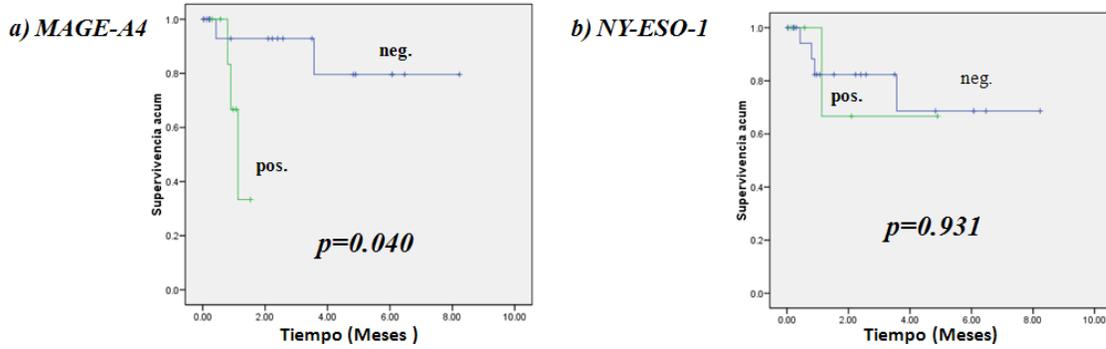


Figura 17. Análisis de sobrevida de pacientes con LAL en genes con mayor frecuencia de expresión. a) *MAGE-A4* con una $p=0.040$ y en b) *NY-ESO-1* con una $p=0.931$.

En LAM se encontró que al igual que en LAL el gen *MAGE-A4* tiene relación con una menor sobrevida en los pacientes, siendo estadísticamente significativo y teniendo una $p<0.007$ (figura 18).

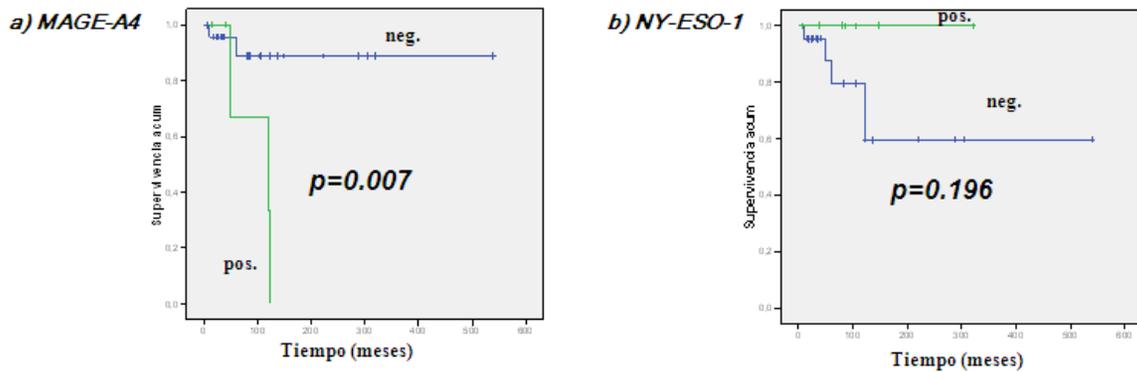


Figura 18. Análisis de sobrevida de pacientes con LAM en genes con mayor frecuencia de expresión. a) *MAGE-A4* con una $p=0.007$ y en b) *NY-ESO-1* con una $p=0.196$.

DISCUSION

Los primeros estudios de los CTAs en leucemias se realizaron con el análisis de la familia *MAGE*. En 1993 por Chambost y cols., se realizó el estudio de *MAGE* en la población francesa con 27 muestras de pacientes con LA (16 LAM y 11 LAL), 12 de LGC y 6 de otro tipo, en el cual se incluyeron 10 líneas celulares derivadas de blastos leucémicos. Reportó que todas las muestras fueron negativas en la expresión de RNAm del gen *MAGE-1*, excepto 3 líneas celulares de linaje mieloide (K562, HEL y HL-60). Concluyendo que no existe expresión del gen *MAGE* en tejido hematopoyético.

Por otro lado, en 1995 Shichijo y cols., realizaron el estudio en 63 muestras de pacientes con leucemia (34 muestras de leucemia de células T, en 16 casos de leucemia de células B, en 23 leucemia mielomonocítica), en el cual se examinó la expresión de varios de los genes de la familia *MAGE* (*MAGE-1, -2, -3, -4* y *-6*). Reportó que 24 muestras (17 muestras de leucemia de células T, 7 de leucemias de células B) expresaron los genes de la familia *MAGE* en pacientes con leucemia.

En el 2001 Chambost y cols., incluyó 154 muestras (22 de LGC, 72 de LAM, 7 de leucemia aguda bifenotípica, 27 de LAL y 10 de LLC). Reportando que la expresión fue baja (2/154). Concluyendo que *MAGE-A* no se expresa en leucemias. Debido a que durante el tiempo de amplificación y la cantidad de oligonucleótidos para el gen, no fueron adecuadas.

Los estudios anteriores solo muestran el análisis de familia *MAGE*, posteriormente en el 2002 Adams y cols., incrementan su lista de CTAs y el número de pacientes con leucemia, realizando el estudio en 68 muestras de pacientes (26 de LAM y 42 de LGC), analizando a los genes *MAGE-A3, BAGE-1, GAGE* y *NY-ESO-1*. Reportando la expresión en 33 pacientes con leucemia (9 de LAL y 24 de LGC). Ellos concluyen que si existe expresión de *MAGE-A3,-A6, BAGE, HAGE* y *NY-ESO-1* en muestras de pacientes con leucemia mieloide.

Posteriormente en el 2007 Martínez y cols., realizaron un estudio en la población mexicana con el fin de aclarar la controversia de la expresión de los genes de la familia *MAGE* analizando a 115 muestra de pacientes con leucemias (34 de LAM, 76 de LAL de células B y 5 de LGC), los genes *MAGE-A1, MAGE-A3* y *MAGE-B2*. Se encontró expresión en 37 pacientes con leucemia (14 de LAM, 23 en LAL de células B, 1 en LGC). Concluyeron con este trabajo que la familia *MAGE* si se expresa en Leucemias humanas, en contraste con lo encontrado por Chambost. También reportaron que K562 es positivo para el gen *MAGE-A3*, corroborando con anteriores estudios. Se describió que hay correlación con el número de blastos y el número de copias para el gen *MAGE-A3*.

En ambos estudios, así como en un trabajo de Serrano y cols., se confirmó la ausencia de expresión de los CTAs en individuos sanos y la expresión de todos los CTAs en la línea celular K562. Adicionalmente se corroboró la expresión en tejido testicular tal y como lo reportó Scalan M. en el 2004.

En el presente trabajo se encontró la expresión de los CTAs en líneas celulares de enfermedades hematológicas; la línea celular K562 expresó 8 genes (*MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE, LAGE-1* y *NY-ESO-1*), debido a sus bajos niveles de diferenciación, en el caso de las otras línea celulares, se expresaron los CTAs dependiendo del tipo: HL60 expresó 4 genes (*MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2* y *GAGE*); las líneas celulares REH, Jurkat, Raji y Ramos, amplificaron un gen (*MAGE-A4*); en tanto las demás líneas celulares MOLT-4 y U-937 no expresan los CTAs. Con estos resultados se muestra que los CTAs se expresan en líneas celulares hematológicas, principalmente a que en Leucemias los CTAs se expresan en el tipo de células menos diferenciadas ⁽⁴⁴⁾. La ausencia de expresión de los CTAs en las líneas celulares MOLT-4 (LAL, lifoblasto T) y U937 (Linfoma no Hodgkin, monocito), se explica porque se encuentran comprometidas hacia un linaje, dando un grado de diferenciación por lo que la ausencia de estas moléculas es frecuente en Leucemia.

En cuanto a las características de pacientes incluidos en el estudio, para las LAM se encontró mayor frecuencia en la M3, seguida de la M2. En las LAL sobresalió la frecuencia en la L2 con respecto a la L1. En LA (Leucemia Aguda) fué mayor la frecuencia en el sexo masculino, con un rango de edad de 18 a 40 años. La frecuencia encontrada se corrobora de acuerdo al Boletín estadístico de ingreso anual de pacientes en el servicio de Hematología en el HGM. ⁽¹²⁾.

En el análisis de la expresión de los CTAs en pacientes con LA, se obtuvo una frecuencia de expresión del 54.9% (39/71), de los cuales en LAM se expresó el 60% (21/35) de los pacientes y en LAL la frecuencia de expresión fue del 50% (18/36) de los pacientes, presentándose una tendencia hacia el linaje mieloide.

En nuestro estudio la expresión de *MAGE-A3* en LAL fue del 8.3% (3/36), para *MAGE-A4* fue de 27.7% (10/36), en *MAGE-B2* fue el 13.8% (5/36), en *MAGE-C1* fue de 2.7% (1/36), para *BAGE-1* el 5.5% (2/36), en *GAGE* fue de 5.5% (2/36), para *LAGE-1* fue ausente la expresión en los pacientes y el gen *NY-ESO-1* fue de 22.2% (8/36) de los pacientes analizados. Comparado el estudio de Martínez y cols., ⁽³⁹⁾, analizando al gen *MAGE-A3* en 53 pacientes con LAL, encontrando la expresión de 37.7 % (20/53) pacientes. Cabe mencionar que a excepción del trabajo anterior, en el estudio de los CTAs en pacientes con LAL, nuestro equipo es el primero en aportan datos en este tipo de Leucemia.

La frecuencia de expresión de los CTAs en pacientes de LAM obtenida para el gen *MAGE-A3* fue de 5.7% (2/35), de acuerdo con lo reportado por Adams, y cols. ⁽⁴⁷⁾, la expresión del gen *MAGE-A3* fue del 3.8% (1/26) corroborando una baja expresión independiente del número de pacientes analizados. Comparado con el estudio realizado en *MAGE-A3* por Martínez y cols., ⁽³⁹⁾ analizando 32 pacientes, encontrando la expresión de 31.3% (10/32) pacientes. Adams y cols., ⁽⁴⁷⁾ encuentran para *MAGE-A* la expresión del 3.8% (1/26) pacientes. Comparando nuestro estudio con el de Adams y cols. se encuentra la misma

frecuencia de expresión, a diferencia de Martínez y cols. donde encuentra mayor expresión de este gen, el cual puede ser explicado por el tamaño de muestras analizadas.

La expresión del gen *MAGE-A4* encontrada fue del 17.1% (6/35) para los pacientes de LAM y para los pacientes con LAL la frecuencia encontrada fue del 27.7% (10/36). El análisis de este gen en este trabajo aporta los primeros datos realizados en pacientes con LAM y LAL, siendo relevante por tener una alta frecuencia de expresión en ambos tipos de Leucemia.

Para el gen *MAGE-B2* encontramos en LAM una frecuencia del 11.4% (4/35) y para LAL se obtuvo una frecuencia del 13.8% (5/36) en los pacientes analizados. Martínez y cols. analizaron al gen *MAGE-B2*, encontrando una expresión del 25% (3/12) en pacientes con LAM y para los pacientes de LAL un 3.1% (1/32). En nuestro estudio no se encontraron altos porcentaje de expresión del gen por tipo de leucemia, en contraste con Martínez y cols. que obtuvieron mayor expresión del gen en pacientes con LAM que con LAL.

En análisis del gen *MAGE-C1* se encontró una frecuencia de expresión para LAL del 2.8% (1/35) y para LAM fue de 2.7% (1/36) de los pacientes. Siendo nuestro trabajo el único estudio realizado con el gen *MAGE-C1* en pacientes con LAL y LAM.

Se encontró para *BAGE-1* una expresión de 5.7% (2/35) y lo reportado por Adams y cols. ⁽⁴⁷⁾, para este gen no tiene expresión (0/26), lo cual contrasta con lo obtenido en nuestro estudio en el cual si encontramos expresión.

Para el gen *GAGE* encontramos una frecuencia de 14.3% (5/35) en pacientes con LAL, Adams no encontró expresión para este gen *BAGE-1* y *GAGE* (0/26) en los pacientes.

Para *LAGE-1* se encontró una expresión de 2.8% (1/35) en LAL, en donde Adams no reporta expresión.

El gen *NY-ESO-1* tiene una frecuencia de 22.8% (8/35). Adams y cols. reportaron una expresión de 4% (1/26), expresión menor a la nuestra, pero corroborando su expresión en LAM.

En el caso de los CTAs en LAM se observa mayor expresión en *NY-ESO-1*, seguido de *MAGE-A4*, *GAGE* y *MAGE-B2* mayores al 10% de frecuencia. En LAL se observa mayor expresión en *MAGE-A4*, *NY-ESO-1* y *MAGE-B2* mayor al 10% de frecuencia. Aunque en base a estos resultados no podemos establecer una relación entre la presencia del antígeno y el linaje celular, si es posible asegurar que el RNAm de *MAGE-A4*, *MAGE-B2* y *NY-ESO-1* se expresan preferencialmente al de los demás antígenos *MAGE-C1*, *BAGE-1*, *GAGE* y *LAGE-1* en leucemia aguda linfoblástica y mieloblástica.

La expresión de los CTAs se ha relacionado con el pronóstico del paciente, tal es el caso de carcinoma de pulmón, encontrando que entre la expresión de *MAGE-A4* y la sobrevida del paciente en correlación inversa fue encontrada en fase avanzada del cáncer. En el caso de Leucemias sería importante determinar la presencia de estos genes y la relación con el pronóstico del paciente.

En el análisis de sobrevida en LAM y LAL de los genes encontrados con mayor frecuencia de expresión *MAGE-A4* y *NY-ESO-1*, se encontró en *MAGE-A4* una $p=0.04$, estadísticamente significativo, debido a que este gen es altamente determinante en la sobrevida de los pacientes con LAM. En el gen *NY-ESO-1* la prueba arrojó una $p=0.931$, siendo no relevante en la sobrevida del paciente. En el análisis de los pacientes con LAL y los genes con mayor expresión, se comporta de manera semejante a lo anterior. En el gen *MAGE-A4* se obtuvo un valor significativo de $p=0.007$, siendo determinante en la sobrevida del paciente. Para *NY-ESO-1* con $p=0.195$ no teniendo significancia en la sobrevida del paciente.

Debido a la relevancia en la expresión que tienen los CTAs, nuestros resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre esta familia de antígenos tumorales que pueden ser utilizados como blanco para la inmunoterapia adoptiva ⁽⁴⁸⁾.

Se encontró que en leucemia el porcentaje de expresión de los CTAs es de 54.9%, los genes de mayor frecuencia fueron el gen *MAGE-A4* el 22.5% (16/71) y *NY-ESO-1* el 22.5% (16/71) tanto en LAM como en LAL. Actualmente los CTAs son utilizados en terapia y el hecho de que los pacientes presenten al menos uno de los CTAs les brinda una alternativa de tratamiento y la posibilidad de aplicarse en la inmunoterapia ya sea postransplante o bien en alguna de las fases de la enfermedad.

En relación a la sobrevida, se sabe en otros canceres que la expresión de los CTAs se relaciona con una sobrevida corta, en leucemia no existen estudios en relación a esto, por lo que hemos encontrado a cerca de la relación entre *MAGE-A4* y la corta sobrevida del paciente, debe ser objeto de un futuro estudio donde se amplié el número de pacientes y quizá analizar la sobrevida en diferentes tiempos.

CONCLUSION

Los genes *MAGE-A3, A4, B2* y *C; BAGE-1; GAGE; LAGE-1* y *NY-ESO-1* se expresan en pacientes con Leucemia Aguda.

Los genes *MAGE-A4* y *NY-ESO-1* tienen mayor frecuencia de expresión, afectando la sobrevida del paciente con Leucemia Aguda.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo realizado con un número significativo de pacientes analizados y la identificación de una amplia gama de CTAs, se propone continuar con trabajos enfocados en los genes obtenidos con mayor frecuencia de expresión, en tres importantes parámetros clínicos:

- i. Pronóstico: Correlación de la expresión de los CTAs y los parámetros clínicos de los pacientes con alto o bajo riesgo de Leucemia.
- ii. Diagnóstico: Evaluar la participación de los CTAs como marcador molecular.
- iii. Tratamiento: Posible uso de los CTAs en inmunoterapia adoptiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Zambrano I, Santiago E, Weiss B. **Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas.** *Revista de Investigación Clínica.* 1999; 51(1): 53-66.
2. Bellantuono I. **Haemopoietic stem cells.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004; 36(4): 607-620.
3. Orkin S. **Transcription factors and hematopoietic development.** *The Journal of Biological Chemistry.* 1995; 270 (10): 4955-4958.
4. Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P y Chávez A. **Hematopoyesis.** *Cancerología.* 2007; 2(2): 95-107.
5. Vega G. **Citocinas.** *AAPAUNAM Academia Ciencia y Cultura.* 2010; 53(2): 94-95.
6. Croce C. **Oncogenes and Cancer,** *New England Journal of Medicine.* 2008; 358:502-511.
7. OMS. **Cáncer 2007,** *Organización Mundial de la Salud.* 2010; (297).
8. OPS. **Situación de salud en las Américas indicadores Básicos.** *Organización Panamericana de la Salud.* 2005:12.
9. ACS. **Mortalidad en América Latina.** *American Cáncer Society.* 2005.
10. Philip R. **Oncología Clínica; enfoque multidisciplinario para Médicos y estudiantes,** *Oncología Clínica.* 2003:1-5.
11. INEGI. **Mortalidad 2007.** *Instituto Nacional de Estadística y Geografía.* 2007.

12. Rosas E, Martínez F, Torres B, Tabla R y Vargas J. **Boletín Estadístico de Mortalidad Hospitalaria 2003-2007.** *Boletín Estadístico Hospital General de México.* 2009; 3:364.
13. Montesinos J y Mayani H. **Nuevos conceptos de biología de la leucemia mieloide aguda.** *Gaceta Médica de México.* 2002; 138 (1): 67-75.
14. Miranda E. y Gutiérrez M. **Bases Moleculares de los Padecimientos Hematológicos.** *En Raport S.I.: Introducción a la Hematología,* 2ª Ed. 2002: 24-45.
15. Uribe E. **Medicina Interna.** *Tratado de Medicina interna.* 2ª Ed. 1995: 1477-1471.
16. Netinatsunthorn W, Hanprasertpong J, Dechsukhum C, Leetanaporn R y Geater A. **WT1 gene expression as a prognostic marker in advanced serous epithelial ovarian carcinoma: an immunohistochemical studyen.** *BioMed Central Cancer.* 2006. 6:90.
17. Brossart P. **Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases.** *Transfusion and Apheresis Science.* 2002; 27(2):183-6.
18. Scalan M, Simpson A y Old L. **The cancer/genes: Review, standardization, and commentary.** *Cancer Immunity.* 2004; 4:1
19. Gjerstorff M, Kock K, Nielsen O y Ditzel H. **MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development,** *Human Reproduction.* 2008; 22(4):953-60.
20. Lucas S, De Smet C y Arden K. **Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representation difference analysis.** *Cancer Research.* 1998.58: 743-752.
21. Philip A y Salehi A. **The MAGE Proteins: Emergeng roles en Cell Cycle Progression, Apoptosis, y Neurogenetic Disease.** *Journal of Neuroscience.* 2002; 67(6):705-712.

22. Xiao J y Hong S. **Biological functions of melanoma-associated antigens.** *World Journal of Gastroenterology.* 2004; 10 (13): 1849-1853.
23. De Plaen E, Arden K, Transversari C, Gaforio J, Szikora J, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Chomez P, De Backer O, Cavenee W y Boon T. **Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family.** *Immunogenetics.* 1994; 40 (5): 360-369.
24. Grunau C, Brun M, Rivals I, Selves J, Hindermann W, Favre-Mercuret M, Granier G, De Sario A. **BAGE hypomethylation, a new epigenetic biomarker for colon cancer detection,** *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention.* 2008; 6:1374-1379.
25. Lucas S, De Smet C y Arden K. **Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representation difference analysis.** *Cancer Research.* 1998; 58: 743-752.
26. Pellat-Deceunynck C, Medellin M, Labarriere N, Jegou G, Moreau-Aubry A, Harousseau J, Jotereau F, Bataille R. **The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human melanoma cell.** *European Journal of Immunology.* 2000; 30: 803-9.
27. Lee K, Chang H, Jo Y, Kim B, Lee B, Lee Y, Lee H, Huh M, Min Y, Spagnoli G, Yu T. **Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck.** *Anticancer Research.* 1999; 19(6B):5037-42.
28. Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T. **Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance.** *International Journal of Oncology.* 2006; 28(5):1089-1098.
29. Nagashima H, Sadanaga N, Mashino K, Yamashita K, Inoue H, Mori M y Sugimachi K. **Expression of MAGE-B genes in esophageal squamous cell carcinoma.** *Japanese Journal of Cancer Research.* 2001; 92(2):167-73.

30. Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M y Akiyoshi T. **Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma.** *Anticancer Research.* 1997; 17: 3559-3563.
31. Kim K, Choi J, Kim I, Ku J y Park J. **Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues.** *World Journal of Gastroenterology.* 2006; 21; 12(35):5651-7.
32. Jung E, Kim M, Lee H, Yang H, Lee Y, Lee B y Kim W. **Expression of family A melanoma antigen in human gastric carcinoma.** *Anticancer Research.* 2005; 25(3B):2105-11.
33. Chang H, Park J, Kim W, Kim K, Lee M, Park U y Choi B. **The expression of MAGE and GAGE genes in uterine cervical carcinoma of Korea by RT-PCR with common primers.** *Gynecologic Oncology.* 2005; 97(2):342-347.
34. Dhodapkar M, Osman K, Teruya-Feldstein J, Filippa D y Hedvat C. **Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease.** *Cancer Immunity.* 2003; 23:3:9
35. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K y Akiyoshi T. **Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers.** *Annals of Oncology.* 1999; 8: 369-372.
36. Nishimura S, Fujista M, terata N, Tani T, Kodoma M y Itoh K. **Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas.** *Nihon Risnscho Meneki.* 1997; (20): 95-101.
37. Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A y Itoh K. **Expression of MAGE genes in osteosarcoma.** *Journal of Orthopaedic Research.* 1997; (15): 128-132.

38. Martínez A, Olarte I, Mergold M, Rozen E, Collazo J, Amansio- Chassin O, Ordóñez R, Montesinos J, Mayani H, McCurdy D, Ostrosky-Wegman P, Garrido- Guerrero E y Miranda E. **mRNA expression of MAGE- A3 gene in leukemia cells.** *Leukemia Research.* 2007;31:33-37
39. Xiao J y Hong-Son C. **Biological functions of melanoma- associated antigens.** *World Journal of Gastroenterology.* 2004; 10: 1849-1853.
40. Bolli M, Schult E, Zajac P, Guller U, Feder C, Sanguedolce F, Carafa V, Terracciano L, Hudolin T, Spagnoli G y Tornillo L. **NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study.** *International Journal of Cancer.* 2005; 20; 115(6):960-966.
41. Lloyd J. **Cancer vaccines: an overview.** *Cancer immunity.* 2008; 8:1-4.
42. Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J y Lim S. **Cancer-testis antigens in haematological malignancies.** *British Journal of Haematology review.* 2007; 136:769-776.
43. Gjerstorff M, Kock K, Nielsen O y Ditzel H. **MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development.** *Human Reproduction.* 2007; 2(4):953-960.
44. Gjerstorff M. y. Ditzel. H. **An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members.** *Journal compilation.* 2008; 71:187–192.
45. Andrade V, Vettore A, Felix R, Almeida M, Carvalho F, Oliveira J, Lopes F, Andriolo A, Caballero O, Zago M y Colleoni W. **Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients.** *Cancer Immunity.* 2008; 8:2-9.

46. Adams S, Sahota S, Mijovic A, Czepulkowski B, Padua R, Mufti G y Guinn B. **Frequent expression of *HAGE* in presentation chronic myeloid leukaemias.** *Leukemia*.2002; 16: 2238–2242.
47. Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Maiyajima J, Sagawa K y Itoh K. **Expression of the *MAGE* gene family in human lymphocytic leukemia.** *Cancer immunology Immunotherapy*. 1995; 41: 90-103.