



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de variantes de mRNA del antígeno
nuclear de proliferación celular (PCNA) en leucemia
linfoblástica aguda**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO FONSECA MONTAÑO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ**

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Fonseca
Montaño
Marco Antonio
56 86 56 36
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307179977

2. Datos del tutor

Dr.
Sergio
Juárez
Méndez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alejandro
Zentella
Dehesa

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Raúl
Peralta
Rodríguez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Víctor Manuel
Dávila
Borja

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Vanessa
Villegas
Ruíz

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de variantes de mRNA del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en leucemia linfoblástica aguda
76 p
2015

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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

Agradezco a mi tutor, el Dr. Sergio Juárez Méndez, investigador del INP, por haber dirigido este trabajo. Durante el tiempo en que escribí éste, conté con su cooperación; la cual fue para mí de enorme valor. Aún más, fue importante el interés que mostró por las ideas que mantiene la misma, y sobre todo, por las sugerencias para mejorarla. Por ello, mi invaluable agradecimiento. En todo momento tuvo la virtud de guiarme para que yo evitara cometer errores y tratara de escribir mejor mis argumentos. Su tenacidad en el laboratorio me ayudó a adquirir un mejor conocimiento de las técnicas empleadas en esta investigación.

Muy especialmente, agradezco al Dr. Víctor Manuel Dávila Borja, jefe del laboratorio de Oncología Experimental del INP, por haberme permitido colaborar en su laboratorio. Además, agradezco su participación en el jurado para la revisión de esta tesis. Le reitero mi agradecimiento al Dr. Dávila por la lectura de esta investigación, así como sus críticas y sugerencias, las cuales fueron muy constructivas. Agradezco su amistad y apoyo cuando más lo necesité.

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento, con admiración y respeto, al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, del Departamento de Bioquímica de Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zurbirán, por haber aceptado participar en el jurado para evaluar este trabajo; sus sugerencias fueron fructíferas para la última versión.

Agradezco al Dr. Raúl Peralta Rodríguez y a la M. en C. Vanessa Villegas Ruíz por su disponibilidad para formar parte del jurado para la revisión de este trabajo; sus sugerencias fueron valiosas para la última versión. También agradezco al Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz y, nuevamente, a la Mtra. Villegas del Departamento de Genética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana IAP por la colaboración en la parte de secuenciación de nucleótidos y al Laboratorio de Visualización 3D de la Facultad de Medicina por el apoyo brindado para la realización del modelado *in silico* en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, Laura, por su amor incondicional, por su apoyo y paciencia, y sus consejos siempre certeros. Gracias por enseñarme que todo lo que uno se proponga en la vida es posible, siempre con dedicación y esfuerzo.

A mi papá, Antonio, por su apoyo incondicional, estaré siempre agradecido por su cariño.

A mi hermano, Mauricio, por su cariño, y sobre todo por su tolerancia y paciencia.

A mi abuelita, Rafaela, muchas gracias por su apoyo cuando más lo requerí.

A mi tía Evangelina y a mis primas Esperanza y Sheila, por verme crecer y por apoyarme en esta travesía.

Agradezco a Karina y a Itzel, por sus críticas y comentarios, los cuales fueron de gran valía.

A todos los integrantes del Laboratorio de Oncología Experimental, por su camaradería.

A mis profesores y compañeros de la Facultad de Ciencias, por haberme mostrado cuán increíble es el mundo ciencia y por aumentar mi agrado por la misma.

ÍNDICE

Abreviaturas	7
1. Resumen	9
2. Introducción	10
2.1 Leucemia	10
2.1.1. Leucemia linfoblástica aguda	10
2.1.1.1. Epidemiología	10
2.1.1.2. Presentación clínica	11
2.1.1.3. Diagnóstico, factores pronóstico y grupos de riesgo	12
2.1.1.4. Tratamiento	15
2.1.1.5. Patofisiología	16
2.1.1.5.1. Linfogénesis B	17
2.1.1.5.2. Características genéticas y moleculares de la leucemia linfoblástica aguda de linaje B	18
2.2. <i>Splicing</i>	23
2.2.1. Ensamblaje del espliceosoma y reacción de <i>splicing</i>	24
2.2.2. <i>Splicing</i> alternativo	25
2.2.2.1. Importancia genética y molecular	28
2.2.2.2. Microarreglos y <i>splicing</i> alternativo	31
2.3. Antígeno nuclear de proliferación celular	33
2.3.1. Descubrimiento de PCNA	33
2.3.2. Estructura genómica	33
2.3.3. Estructura proteica	34
2.3.4. Interacción con proteínas y funciones	36
2.3.5. Modificaciones post-traduccionales	37
3. Justificación	39
4. Objetivos	40
5. Materiales y Métodos	41
5.1. Obtención de muestras	41
5.2. Extracción de RNA total	41
5.3. Transcripción reversa	42

5.4. Amplificación de RPL4 por PCR punto final	42
5.5. Amplificación de PCNA por PCR punto final	43
5.6. Caracterización e identificación de variantes	44
5.7. Modelado <i>in silico</i>	45
6. Resultados	47
6.1. Identificación de PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6, tres nuevas isoformas de mRNA de PCNA humano	47
6.2. Análisis y modelado <i>in silico</i> de PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6	55
6.2.1. Diferencias estructurales entre PCNA-4 y PCNA-1/-2	56
6.2.2. Diferencias estructurales entre PCNA-5, PCNA-6 y PCNA-1/-2	58
7. Discusión	60
8. Conclusiones	66
9. Perspectivas	67
10. Bibliografía	68

ABREVIATURAS

AID	Desaminasa de citidinas
AMO	Aspirado de médula ósea
BCoR	Correpresor de BCL-6
BPS	Secuencia de ramificación
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV	Citomegalovirus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMR	Enfermedad mínima residual
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ESE	Potenciador de <i>splicing</i> exónico
ESS	Silenciador de <i>splicing</i> exónico
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con inmunofluorescencia
HSC	Células madre hematopoyéticas
IDCL	Asa de conexión interdominio
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
ISE	Potenciador de <i>splicing</i> intrónico
ISS	Silenciador de <i>splicing</i> intrónico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de linaje B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de linaje T
LLC	Leucemia linfoblástica crónica
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloblástica crónica
MLL	Del inglés <i>Mixed Lineage Leukemia</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MO	Médula ósea

NES	Secuencia de exporte nuclear
NMD	Del inglés <i>Nonsense-Mediated Decay</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PPT	Tramo de polipirimidina
PTB	Proteína de unión al tramo de polipirimidina
RFC	Factor de replicación C
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
SA	<i>Splicing</i> alternativo
SC	<i>Splicing</i> constitutivo
SNC	Sistema nervioso central
snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
SR	Serinas y argininas
SRE	Elementos reguladores de <i>splicing</i>
SRP	Proteínas reguladoras de <i>splicing</i>
SS	Sitio de <i>splicing</i>
TACMH	Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas
TLS	Síntesis de translesión
uORF	Marcos de lectura abierto río arriba
UTR	Región no traducida
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

1. RESUMEN

La leucemia aguda linfoblástica (LLA) es la neoplasia de mayor frecuencia en la población pediátrica y representa una de las principales causas de muerte en dicha población. Investigaciones sobre las alteraciones genéticas y moleculares en las enfermedades neoplásicas, incluida la LLA, han permitido conocer la existencia de mecanismos de regulación de la expresión genética críticos como el *splicing* alternativo que contribuyen en la versatilidad del transcriptoma y proteoma, y que favorecen bajo circunstancias particulares los procesos de transformación celular y progresión neoplásica.

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína que lleva a cabo funciones importantes en diversos procesos relacionados con el DNA. Una desregulación en su expresión promueve la alteración de la proliferación celular y una fuerte asociación con la transformación celular en distintos tipos de neoplasias. Según datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), solamente se han reportado tres transcritos de PCNA: PCNA-1 (NM_002592.2), PCNA-2 (NM_182649.1) y PCNA-3 (NR_028370.1). Las dos primeras corresponden a RNA codificantes, mientras que la tercera se trata de un RNA largo no codificante. La proteína resultante de PCNA-1 y PCNA-2 contiene el mismo número y secuencia de aminoácidos, ambas cuentan con la misma función.

Nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad, ha revelado el incremento de la expresión de PCNA en LLA; además, se han observado cambios en su expresión exónica, sugiriendo la presencia de potenciales variantes de mRNA en PCNA. Por lo anterior, en este estudio evaluamos la expresión de mRNA de PCNA en LLA. Mediante RT-PCR y secuenciación Sanger identificamos tres variantes no reportadas de mRNA de PCNA, generadas por *splicing* alternativo: PCNA-4 (con la escisión de exones 2 y 3), PCNA-5 (con un sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2) y PCNA-6 (con un sitio donador de *splicing* 3' en el exón 2). Es importante destacar que la expresión de PCNA-4 se presentó tanto en muestras de leucemia (pacientes diagnosticados con LLA-B y líneas celulares) como del grupo control, PCNA-5 solo en líneas celulares, y PCNA-6 en un paciente con LLA-B. El modelado *in silico* de las isoformas 4, 5 y 6 muestra diferencias en su estructura terciaria proteica respecto de la forma canónica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Leucemia

La leucemia se considera una neoplasia hematológica multifactorial que comienza en la médula ósea (MO), se caracteriza por la proliferación descontrolada de leucocitos y su eventual diseminación en la sangre periférica, causando alteraciones en la hematopoyesis. La leucemia puede desarrollarse a partir de linajes celulares linfoides o mieloides y se clasifica, como: aguda o crónica según sea la velocidad de proliferación celular. La leucemia aguda surge de manera repentina y progresa con gran rapidez, en tanto que la leucemia crónica es menos agresiva y se desarrolla con lentitud. La distinción principal entre ambos tipos se encuentra en el estado de diferenciación de las células involucradas. Por ejemplo, la leucemia aguda tiende a originarse en células menos diferenciadas, mientras que la crónica lo hace en células de mayor diferenciación. Se distinguen cuatro tipos principales: leucemia mieloblástica crónica (LMC), leucemia linfoblástica crónica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Rivera, 2010).

2.1.1. Leucemia linfoblástica aguda

2.1.1.1. Epidemiología

La leucemia es la neoplasia predominante en niños y adolescentes menores de 15 años, representando cerca del 30% del total de las neoplasias pediátricas diagnosticadas y la segunda causa de muerte en esta población. La LLA es la neoplasia predominante y se divide en dos subtipos: LLA de linaje B (LLA-B) y LLA de linaje T (LLA-T). La LLA-B representa el 85% de las LLA diagnosticadas, mientras que el 15% restante corresponde a LLA-T (Harrison, 2013; Rose and Kuehl, 2014).

A nivel mundial, la LLA representa aproximadamente el 80% del total de las leucemias diagnosticadas en la población pediátrica con una incidencia media de 4 por cada 100,000 niños (con una ligera predominancia en individuos de sexo masculino) y con un pico

principal entre los 2 a 5 años (Harrison, 2011; OMS, 2014; Young *et al.*, 2014; Cooper and Brown, 2015).

En algunos países de Latinoamérica, como Costa Rica y México, la incidencia de LLA es mayor a la reportada en otras partes del mundo, con tasas de hasta 12 por cada 100,000 niños. En México durante 2011, de cada 100 personas menores de 20 años con neoplasias, 59 son de origen hematopoyético (de las cuales, el 99% corresponden a leucemias). Por sexo y grupo de edad, se observa que las leucemias afectan más a los hombres que a las mujeres (53.6% y 46.4%, respectivamente). Con respecto a la tasa de mortalidad, ésta es de 2.53 por cada 100,000 personas menores de 20 años de edad, siendo más alta en los hombres que en las mujeres (2.91 y 2.14 por cada 100,000 personas de cada sexo, respectivamente) (Rivera, 2010; Secretaria de Salud, 2011; INEGI, 2014).

2.1.1.2. Presentación clínica

La leucemia pediátrica comprende una amplia gama de complicaciones (fiebre, recurrencia de infecciones, entre otras), muchas de estas son comunes en otras enfermedades y por lo tanto no son específicas. La presentación inicial más frecuente involucra síntomas relacionados al fallo de la MO o la infiltración de linfoblastos leucémicos en distintos órganos, causando una fuerte alteración funcional. Al igual que la anemia, trombocitopenia y leucopenia, las leucemias muestran manifestaciones iniciales muy parecidas. Por ejemplo, pacientes con anemia pueden experimentar disnea, fatiga, dolor de cabeza y pecho. Además, muestran sangrados frecuentes, en nariz y encías como resultado de la trombocitopenia. Más del 60% de los pacientes con leucemia pueden presentar alguna forma de sangrado. A pesar de la cantidad de glóbulos blancos, algunos pacientes pueden tener comprometido su sistema inmune (Labardini *et al.*, 2011).

La leucemia aguda puede presentarse con linfadenopatías asintomáticas, hepatomegalia y esplenomegalia. En algunos casos, los pacientes pediátricos con este tipo de leucemias pueden experimentar fiebres, transpiración nocturna y pérdida de peso. Algunos subtipos como LLA-B y LLA-T, pueden tener una presentación clínica muy particular y en ocasiones única. Por ejemplo, el síndrome espontáneo de lisis tumoral, es frecuente en individuos con LLA-B; la infiltración de blastos leucémicos al sistema nervioso central

(SNC) es otra característica de presentación en pacientes con recaídas. Por otra parte, complicaciones como la hipercalcemia y las lesiones líticas óseas son comunes en individuos con LLA-T (Rose and Kuehl, 2014).

Las manifestaciones músculo-esqueléticas son características representativas de la LLA pediátrica, ya que más de un tercio experimentan dolor, lesiones espinales y óseas. Cerca de la mitad de estos pacientes tienen al menos una anormalidad, por ejemplo: desmineralización difusa, erosión ósea cortical, lesiones líticas o fracturas patológicas. Otros rasgos muy frecuentes en niños con LLA son las hemorragias (en piel, ojos, nariz, encías, tracto gastrointestinal e intracraneal), coagulopatías, y linfadenopatías en axila, ingle y cuello (Rivera, 2010).

2.1.1.3. Diagnóstico, factores pronóstico y grupos de riesgo

Los protocolos estándar para el diagnóstico de la LLA pediátrica incluyen: análisis de aspirado de médula ósea (AMO) mediante estudios de morfología celular de los linfoblastos según el sistema de clasificación franco-americano-británico (FAB), valoración del inmunofenotipo para identificar el linaje celular afectado y el estadio de desarrollo por citometría de flujo (OMS, 2014). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación *in situ* con inmunofluorescencia (FISH) representan técnicas adicionales para un diagnóstico más preciso de la LLA. Estudios adicionales como la biometría hemática, bioquímica sanguínea (lactato deshidrogenasa (LDH), ácido úrico, calcio, fósforo, etc.), serologías (hepatitis viral, citomegalovirus (CMV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), herpes, etc.), análisis de coagulación e inmunoglobulinas (Ig) son también importantes en el diagnóstico de LLA (Rivera, 2010; Labardini *et al.*, 2011; Inaba *et al.*, 2013). El esquema general de los estudios diagnóstico se muestra en la Figura 1.

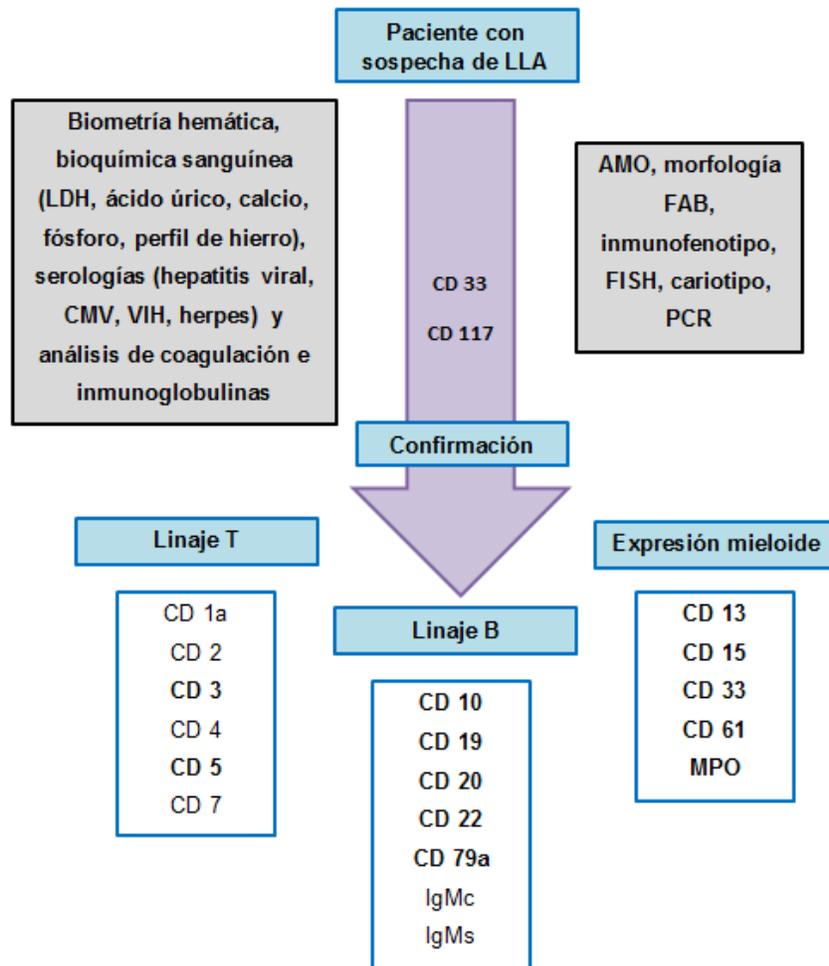


Figura 1. Esquema general de los estudios para el diagnóstico de la LLA. Los estudios de biometría hemática, bioquímica sanguínea, serologías, análisis de morfología celular de acuerdo al sistema de clasificación FAB, ensayos citogenéticos (PCR y FISH) y la valoración del inmunofenotipo por citometría de flujo son algunos de los estudios más comunes para el diagnóstico de la LLA (modificado de Rivera, 2010; Labardini *et al.*, 2011).

Los factores pronóstico en la LLA son de gran importancia ya que con base en éstos, es posible predecir el curso y la evolución clínica de la enfermedad. Los factores pronóstico más importantes de la LLA son: 1) la presencia de la enfermedad mínima residual (EMR) y 2) el fallo en la respuesta al tratamiento. Esta última está fuertemente relacionada con las características genéticas de los linfoblastos, la farmacodinámica y la farmacogenética de los pacientes, los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia sobre las células (Teachey and Hunger, 2011). Otras características, tales como la edad, el sexo y la etnia han mostrado tener un significado en la población pediátrica diagnosticada con LLA (Rivera, 2010; Ribera, 2011; Cooper and Brown, 2015). Los principales factores pronóstico y sus significados en la LLA pediátrica se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Principales factores pronóstico y su significado en niños con LLA (modificado de Rivera, 2010; Ribera, 2011; Teachey and Hunger, 2011; Cooper and Brown, 2015).

Factor	Pronóstico favorable	Pronóstico desfavorable
Edad de diagnóstico	1-9 años	<1 o >9 años
Sexo	Femenino	Masculino
Conteo leucocitario	Bajo (<50 x 10 ⁹ /L)	Elevado (>50 x 10 ⁹ /L)
Genotipo (LLA-B)	Hiperdiploidia (>50 cromosomas) <i>TEL-AML1</i> t(12;21) <i>TCF3-PBX1</i> t(1;19) <i>MYC-IgH</i> t(8;14) Trisomías 4 y 10 Mutaciones/deleciones de <i>IKZF1</i> Sobreexpresión de <i>CRLF2</i>	Hipodiploidia (<44 cromosomas) Reordenamientos en <i>MLL</i> <i>MLL-AF4</i> t(4;11) <i>BCR-ABL1</i> t(9;22) <i>iAMP21</i> Mutaciones en <i>JAK1</i> y <i>JAK2</i> Mutaciones cooperativas en <i>IKZF1</i>
Genotipo (LLA-T)	<i>TCR-NOTCH1/HOX11/JAK1</i> t(7;14) Reordenamientos en <i>TAL/LMO</i> <i>CALM-AF10</i> <i>MLL-ENL</i> Mutaciones cooperativas en <i>NOTCH</i>	Reordenamientos en <i>HOXA</i> Reordenamientos en <i>HOX11L2</i> Mutación cooperativa PTEN-AKT-mTOR Deleciones en <i>CDKN2A/2B</i>
Inmunofenotipo	Común, pre-B	Pro-B, linaje T

De acuerdo con los factores pronóstico, los pacientes pediátricos diagnosticados con LLA pueden dividirse en cuatro grupos (Teachey and Hunger, 2013):

- a) *Bajo riesgo.* Pacientes diagnosticados con LLA-B, edad de entre 1 a 9 años, conteo leucocitario menor a 50 x 10⁹/L, translocación *TEL-AML1* t(12;21), hiperdiploidias (>50 cromosomas) y trisomías 4 o 10.
- b) *Riesgo intermedio.* Pacientes con las mismas características que el grupo de bajo riesgo que no tienen la translocación *TEL-AML1* t(12;21) y trisomías.
- c) *Alto riesgo.* Pacientes diagnosticados con LLA-pro B o LLA-T, edad menor a 1 o mayor a 9 años, hipodiploidias (<44 cromosomas), reordenamientos en *MLL*, *HOXA* y translocaciones *BCR-ABL1* t(9;22) y *MLL-AF4* t(4;11).

d) *Muy alto riesgo*. Pacientes con las mismas características que el grupo de alto riesgo que no tienen una buena respuesta al tratamiento o que fallan y mantienen cantidades elevadas de EMR durante el mismo.

Dependiendo del grupo de riesgo, se diseñará y aplicará un esquema de tratamiento.

2.1.1.4. Tratamiento

El tratamiento estándar para pacientes pediátricos diagnosticados con LLA tiene como base un régimen quimioterapéutico que consta de tres fases:

1) *Inducción*. El objetivo de esta fase consiste en eliminar la mayor cantidad posible de linfoblastos leucémicos y el restablecimiento de la hematopoyesis normal. La fase de inducción consta de terapia intratecal y en la administración de tres fármacos que actúan a nivel sistémico: vincristina, corticosteroides (dexametasona o prednisona) y asparaginasa. En algunos protocolos, se incluye la adición de antraciclinas (doxorubicina o daunorubicina). Esta fase tiene una duración de 4 a 6 semanas. Aproximadamente el 95% de los pacientes completan satisfactoriamente esta etapa (Rivera, 2010; Ribera, 2011; Rose and Kuehl, 2014).

2) *Consolidación*. Esta fase tiene como objetivo reducir la carga sistémica de linfoblastos leucémicos residuales, contribuyendo a disminuir el riesgo de recaída. En esta etapa se administra un régimen más agresivo que involucra la combinación de distintos agentes quimioterapéuticos que maximizan su sinergia y minimizan la resistencia a fármacos, los agentes empleados son distintos a los usados en la etapa de inducción e incluyen: mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, ciclofosfamida, etópsido y citarabina. Esta fase tiene una duración de 6 a 9 meses (Rivera; 2010; Pui *et al.*, 2012).

En pacientes de alto riesgo se realiza una reinducción que consiste en la repetición del tratamiento de inducción con el fin de reducir el riesgo de recaídas (Inaba *et al.*, 2013).

3) *Mantenimiento*. El tratamiento para pacientes con LLA culmina con la fase de mantenimiento prolongado con una duración de 2-3 años o más, dependiendo del tipo de LLA y del protocolo. Esta fase consiste en la administración diaria de mercaptopurina y metotrexato cada semana. Algunos protocolos incluyen terapia intratecal, y la administración de glucocorticoides y vincristina (Rivera, 2010; Rose and Kuehl, 2014; Cooper and Brown, 2015).

Una fase adicional es la terapia dirigida al SNC con el objetivo de prevenir las recaídas en el mismo. Aquí se administra terapia triple intratecal con fármacos sistémicos que penetran la barrera hematoencefálica (metotrexato, citarabina e hidrocortisona) y en raras ocasiones, radiación intracraneal. Algunos autores han sugerido efectuar un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TACMH), sin embargo algunos la reservan solamente para pacientes con elevado riesgo de recaída, fallos durante el tratamiento, presencia de EMR después de la fase de consolidación e hipodiploidias (Inaba *et al.*, 2013).

Al término del tratamiento, la tasa de supervivencia promedio a 5 años es del 85% (Cooper and Brown, 2015). Por esta razón es importante tener un amplio conocimiento sobre la patofisiología de la LLA para diseñar fármacos de mayor especificidad y con un menor número de efectos secundarios.

2.1.1.5. Patofisiología

La LLA constituye un grupo de enfermedades heterogéneas debido a sus particularidades moleculares, alteraciones genéticas, epigenéticas, evolución clínica y respuesta al tratamiento. La LLA-B es el tipo de neoplasia predominante en la población pediátrica, por esta razón, en este estudio, haremos énfasis particular en ella (Campos *et al.*, 2011; Graux, 2011).

2.1.1.5.1. Linfogénesis B

El proceso de maduración de las células madre hematopoyéticas (HSC) hacia células B maduras en la MO implica una serie de fases caracterizadas por la expresión específica de factores de transcripción y marcadores de superficie celular, reordenamientos en genes clave y un patrón de expresión de Ig. Uno de los principales reguladores en la progresión de las HSC hacia el linaje linfocitario B es el factor de transcripción IKAROS. IKAROS es requerido para la supresión de genes asociados a células madre y para el inicio de la diferenciación linfocitaria. Un papel esencial de IKAROS consiste en antagonizar la expresión del factor de transcripción PU.1 en células progenitoras multipotenciales, a través de la inducción de expresión del gen *GFI1* encargado de promover el destino hacia células B. El equilibrio entre la actividad de GFI1 y PU.1 regula la elección de linaje celular entre el mielocitoide y el linfocitoide, de esta manera indirecta IKAROS promueve el desarrollo linfocitario B (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

Otro elemento involucrado en el compromiso del linaje linfocitario es el factor de transcripción E2A, el cual es codificado por el gen *TCFE2*. E2A es indispensable para el desarrollo de células pro-B, pre-B y células B inmaduras en la MO. A nivel molecular, E2A no sólo es requerido para el inicio sino también para el mantenimiento de la expresión de *EBF1*, *PAX5* y el programa genético del linaje linfocitario B en células pro-B. EBF1 y PAX5 son factores cruciales que participan en el compromiso hacia células B. PAX5 es un claro ejemplo de un factor de compromiso de linaje celular, ya que controla la entrada irreversible de los progenitores linfocitarios hacia células B mediante un mecanismo dual: 1) reprime genes inapropiados del linaje B y 2) activa genes específicos de las células B. De acuerdo con su función de compromiso celular: la expresión de *PAX5* en HSC se restringe sólo al linaje linfocitario B, a partir de la fase de células pro-B comprometidas hacia células B maduras. Algunos estudios indican que la inactivación condicional de *PAX5* induce la conversión de células B maduras hacia células T mediante un proceso de desdiferenciación hacia progenitores no comprometidos (Abbas *et al.*, 2008).

Adicionalmente, los procesos del desarrollo y homeostasis de los linfocitos están regulados por distintas interleucinas (IL), por ejemplo: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. De éstas, IL-7 es una de las citocinas más importantes para el desarrollo de las células B y T. La señalización de IL-7 es requerida para la transición de células pro-B a pre-B,

además, actuando de forma sinérgica con la señalización de los receptores de células pre-B (pre-BCR) se promueve la expansión de las células pre-B con un correcto reordenamiento en los genes *IgH* (Campos *et al.*, 2011).

Por consiguiente, podemos resaltar que el desarrollo de los linfocitos B es un proceso altamente regulado, el cual involucra la participación e interacción de diversas citocinas, receptores y una amplia gama de mecanismos transcripcionales, permitiéndole a la HSC diferenciarse. Dicho proceso involucra múltiples puntos de control que verifican la presencia de reordenamientos correctos en las *Ig* y el acceso progresivo a etapas de mayor diferenciación. Cualquier alteración en este delicado equilibrio puede favorecer, en la mayoría de los casos, un arresto en el desarrollo y muerte celular. Sin embargo, existen múltiples lesiones genéticas y moleculares en el programa de diferenciación que pueden alterar la capacidad de auto-renovación e inducir el arresto en una fase de desarrollo específica (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2013; Mejía, 2013; Marshall 2014; Zuckerman and Rowe, 2014). Muchas de estas lesiones tienen un gran impacto en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular; y son las responsables del desarrollo de las leucemias, particularmente de la LLA-B (Campos *et al.*, 2011).

2.1.1.5.2. Características genéticas y moleculares de la leucemia linfoblástica aguda de linaje B

La LLA-B se define como una malignidad de los linfoblastos comprometidos al linaje celular de tipo B, su acumulación en la MO causa la supresión de la hematopoyesis y la eventual infiltración de los blastos leucémicos en distintos órganos vitales, alterando su funcionalidad. Según las características inmunofenotípicas de las células B, dependiendo de su estadio de maduración y desarrollo, por la presencia de antígenos de superficie celular (anticuerpos monoclonales) y por la expresión de *Ig* citoplasmáticas o de superficie celular, la LLA-B puede clasificarse en cuatro grupos principales (Rivera, 2010):

1. *LLA-B pro-B/pre-B temprana*. TDT+, HLA DR+, CD10+, CD19+, CD34+.
2. *LLA-B pre-B*. TDT+, HLA DR+, CD10+, CD19+, CD20+, IgMc.
3. *LLA-B pre-B transicional*. TDT+, HLA DR+, CD19+, CD20+, IgMc, IgMs.
4. *LLA-B*. TDT+, HLA DR+, CD10+, CD19+, CD20+, CR2.

La LLA-B es de origen monoclonal y de carácter multifactorial. Su patofisiología es muy compleja e involucra la participación de factores de susceptibilidad genética (polimorfismos, síndrome de Down, entre otros) y la exposición a agentes exógenos y endógenos, los cuales están involucrados en el daño al material genético que da lugar a alteraciones en los procesos de desarrollo y maduración, favoreciendo así el arresto en los primeros estadios de diferenciación y la proliferación descontrolada de las células neoplásicas. Se ha demostrado que varias de las lesiones de inicio en las células progenitoras hematopoyéticas tienen un origen *in utero* y que eventos de daño adicionales tienen lugar después del nacimiento (Inaba *et al.*, 2013; Mejía, 2013; Bhatla *et al.*, 2014; Marshall *et al.*, 2014).

Varios estudios señalan que los genes y vías de señalización celular alteradas en la LLA-B son el resultado de pérdidas y ganancias de funciones que conducen a la inestabilidad genética a través de múltiples mecanismos, tales como: procesos de recombinación (translocaciones cromosómicas), mutaciones puntuales (inversiones, transversiones), ganancia (duplicaciones), pérdida (deleciones) de material genético y aneuploidias (hipodiploidias e hiperdiploidias) (Mullighan, 2010; Gramatges and Rabin, 2013; Mejía, 2013; Pui, 2013; Marshall 2014; Zuckerman and Rowe, 2014). Una sola alteración resulta insuficiente para producir los procesos neoplásicos, por lo que eventos adicionales son necesarios, por ejemplo: alteraciones *de novo* y eventos cooperativos (Inaba *et al.*, 2013; Mejía, 2013). Las bases genéticas de la LLA-B se muestran en la Figura 2.

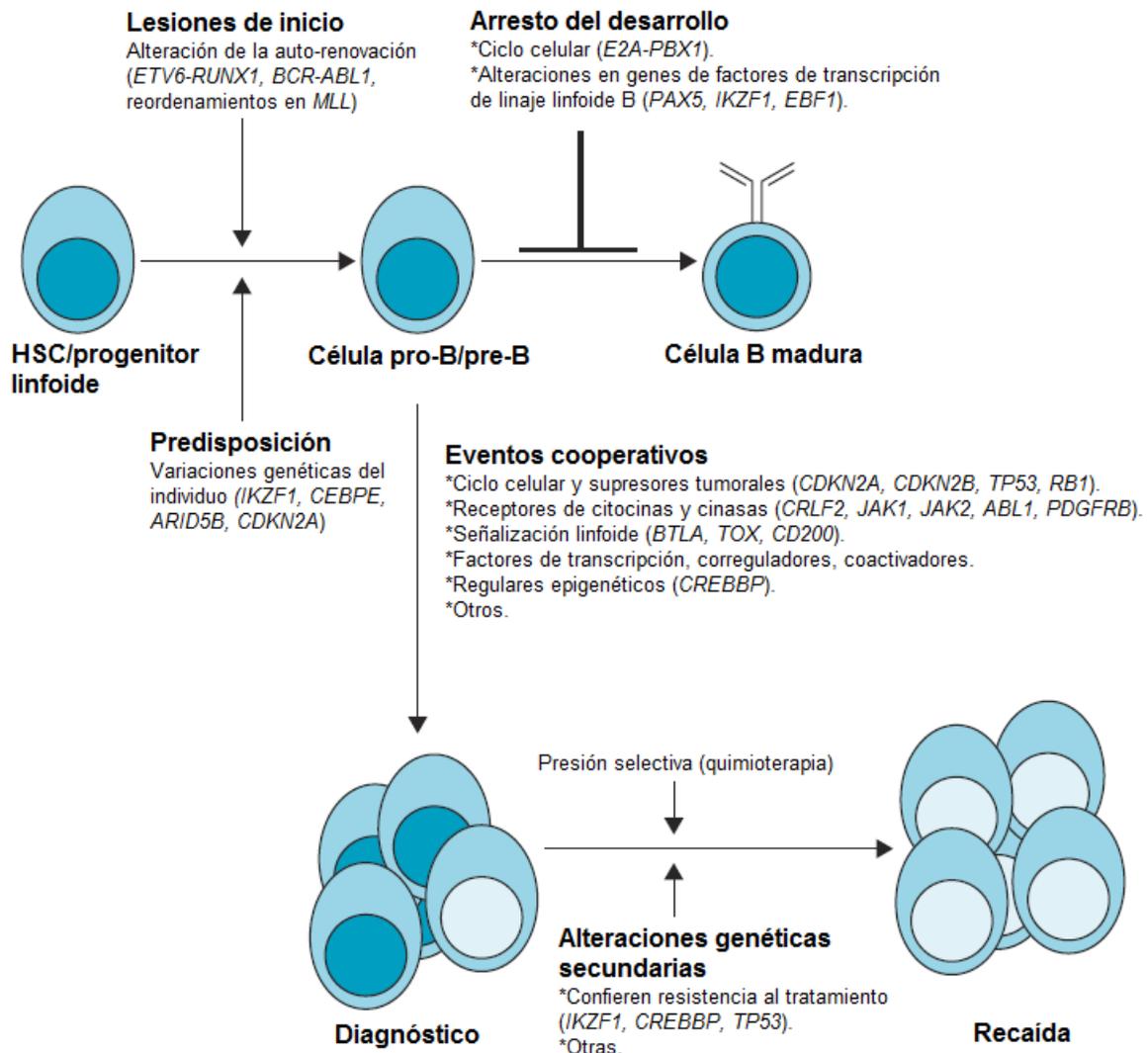


Figura 2. Bases genéticas de la LLA-B pediátrica. La presencia de distintas alteraciones durante la linfogénesis B (aneuploidias, translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales, pérdida y ganancia de material genético) tiene un gran impacto en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular; y son las responsables del desarrollo de la LLA-B. Algunos autores han indicado que durante la progresión y tratamiento de la LLA ocurre la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y moleculares *de novo*, que con el paso del tiempo favorecen la selección de clones leucémicos; y por tanto, una eventual resistencia al tratamiento y un incremento en la agresividad de la enfermedad (modificado de Inaba *et al.*, 2013).

Dado el gran número de alteraciones reportadas presentes en la LLA-B, en este apartado sólo haremos mención de las alteraciones de mayor frecuencia en la población pediátrica (Figura 3), las cuales son: a) aneuploidias, b) reordenamientos y translocaciones cromosómicas y c) alteraciones submicroscópicas secundarias.

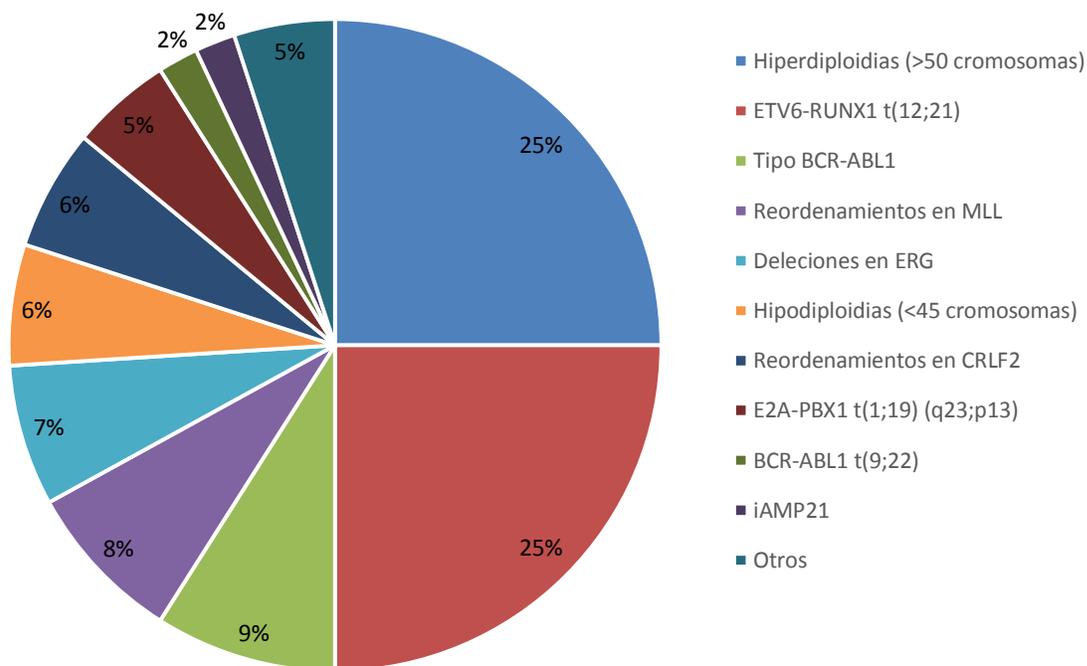


Figura 3. Frecuencia de anomalías en la LLA-B pediátrica. Las hiperdiploidias (25%), translocaciones *ETV6-RUNX1* (25%), reordenamientos de tipo *BCR-ABL1* (9%), reordenamientos en *MLL* (8%), deleciones en *ERG* (7%), hipodiploidias (6%), reordenamientos en *CRLF2* (6%), *E2A-PBX1* (5%), *BCR-ABL1* (2%) y amplificaciones *iAMP21* (2%) son las alteraciones genéticas más comunes en la LLA-B pediátrica (modificado de Mejía 2013, Pui, 2013; Zuckerman and Rowe, 2014).

a) Aneuploidias

Las aneuploidias resultan de anomalías durante la división celular. En la LLA-B se distinguen dos tipos principales: 1) las hiperdiploidias (>50 cromosomas) que representan el 25% de los casos y se asocian con un pronóstico favorable; 2) las hipodiploidias (<45 cromosomas) que se presentan en un 6% de los casos y se asocian a un mal pronóstico (Mejía, 2013; Pui *et al.*, 2013; Zuckerman and Rowe, 2014).

b) Reordenamientos y translocaciones cromosómicas

Reordenamientos en *MLL* (del inglés *Mixed Lineage Leukemia*). *MLL* es un gen presente en el cromosoma 1, codifica una metiltransferasa que ejerce su actividad sobre la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), regula la expresión de genes de la familia *HOX*; responsables de la morfogénesis, el desarrollo y la hematopoyesis. Las principales alteraciones cromosómicas que ocurren en *MLL* corresponden a translocaciones recíprocas, causando

su fusión con más de 60 genes distintos, y duplicaciones parciales en tándem (repetición de una misma secuencia). Tales translocaciones dan lugar a proteínas quiméricas (o de fusión) que alteran los procesos normales de diferenciación y proliferación celular. *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10*, *AF6* y *ELL* son algunos de los principales genes que comúnmente se fusionan con *MLL*. De éstas, la translocación t(4;11) (q21;q23) que da lugar a la oncoproteína MLL-AFA4; es la más común en la LLA-B. En general, los reordenamientos en el gen *MLL* representan cerca del 8% de los casos de LLA-B (Chen *et al.*, 2010; Campos, 2011; Pui *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013).

Reordenamientos en *E2A*. La t(1;19) (q23;p13.3) da lugar a la proteína quimérica E2A-PBX1, la cual tiene un efecto de promoción tumoral; ya que reprime la expresión de genes blanco de *E2A* y altera la progresión del ciclo celular. Esta translocación se asocia a un buen pronóstico con una supervivencia a 5 años del 80-90%. Por otra parte, la t(14;19) (q22;p13.3) resulta en la oncoproteína E2A-HLF que interfiere con el desarrollo normal de los linfocitos y los vuelve más susceptibles a la transformación maligna. Esta oncoproteína se presenta en el 5% de los casos de LLA-B pediátrica y se asocia a un pronóstico muy desfavorable con una supervivencia a 4 años (Graux, 2011; Inaba *et al.*, 2013; Nigro, 2013).

ETV6-RUNX1 (TEL-AML1). Otro ejemplo es la proteína quimérica ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) que resulta de la translocación t(12;21) (p13;q22). *ETV6* es un gen ubicado en el cromosoma 12, codifica para una fosfoproteína nuclear de la familia de factores de transcripción ETS requerida para el mantenimiento de la hematopoyesis. *RUNX1* es un gen ubicado en el cromosoma 21, codifica la subunidad α del factor CBFA importante para la biología y diferenciación de las HSC. La oncoproteína ETV6-RUNX1 reprime la activación de genes blanco activados por *RUNX1* e inhibe a las proteínas de la familia ETS para alterar la capacidad de auto-renovación y diferenciación de las HSC. Esta alteración es la de mayor frecuencia, representando cerca del 25% de los casos en la LLA-B (Mullighan, 2010; Gallegos *et al.*, 2013).

BCR-ABL. Este oncogen, resultante de la fusión t(9;22) (q34;q11), interfiere en el desarrollo del linaje celular de tipo B. Esta fusión representa el 2% de los casos de LLA-B pediátrica. Tiene el pronóstico más desfavorable de todos los subtipos de LLA-B con una supervivencia a 5 años del 37%. *BCR-ABL* presenta dos isoformas, p210 y p190, siendo

esta última la forma predominante. Las oncoproteínas BCR-ABL activan de manera constitutiva, a receptores de cinasas de tirosina, y a su vez activan las vías de control de proliferación y supervivencia que contribuyen con la transformación celular neoplásica e inhiben la reparación del DNA, favoreciendo la inestabilidad del genoma (Harrison, 2013; Inaba *et al.*, 2013; Zuckerman and Rowe, 2014).

c) *Alteraciones submicroscópicas secundarias*

El número de alteraciones genéticas secundarias en la LLA se ha incrementado exponencialmente, con el avance en las técnicas de secuenciación de nueva generación. Para el caso de la LLA-B, se han identificado poco más de 120 genes con cambios en el número de copias. Dentro de éstos se encuentran, por ejemplo: deleciones en *IKZF1*, *PAX5* y *CDKN2A/B*. Otras anomalías incluyen mutaciones o amplificaciones en genes involucrados en el desarrollo de las células B (*EBF1*, *ERG*, *IKZF2*, *RAG1*, *RAG2*), cinasas (*JAK1*, *JAK2*), acetilación de histonas (*CREBBP*), metilación (*PRMT2*, *EZH2*, *CTCF*), supresores de tumores (*TP53*, *RB1*), apoptosis (*BTG1*, *BTG2*, *BIRC5*, *HRK*), reparación del DNA (*PTTG1*, *MSH6*), metabolismo de purinas (*WSHC1*, *USH2A*, *NT5C1B*), regulación del ciclo celular (*DUSP6*, *UBE2V1*, *FR2*) y resistencia a fármacos (*TYMS*, *RAB5C*) (Pui *et al.*, 2012; Harrison, 2013; Mejía, 2013; Teachey and Hunger, 2013; Bhatla *et al.*, 2014). Algunos autores han indicado que durante la progresión y tratamiento de la LLA ocurre la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y moleculares *de novo*, que con el paso del tiempo favorecen la selección de clones leucémicos; y por tanto, una eventual resistencia al tratamiento y un incremento en la agresividad de la enfermedad (Jan and Majeti, 2013).

Algunas de las investigaciones centradas en la LLA han permitido conocer la existencia de mecanismos post-transcripcionales críticos que participan en la regulación de la expresión genética como: el *splicing* alternativo que promueve la diversidad de RNA mensajeros (mRNA) y proteínas, favoreciendo el desarrollo y progresión del cáncer bajo condiciones particulares (Chen and Weiss, 2014).

2.2. *Splicing*

El *splicing* es uno de los eventos clave en el procesamiento del pre-mRNA, en el cual se efectúan cortes en extremos 5' y 3' de cada intrón (remoción de intrones), y los exones

situados a cada lado de los sitios de *splicing* (SS) deben ser ligados para formar un mRNA maduro (Matlin *et al.*, 2005). El *splicing* puede clasificarse en: a) *splicing* constitutivo (SC) y b) *splicing* alternativo (SA). El primero consiste en la escisión de los intrones y la ligación de los exones; y en el segundo, ocurre la inclusión de exones alternativos en el mRNA maduro, permitiendo generar diversos mensajeros a partir de un solo gen (Kornblihtt *et al.*, 2013; Chen and Weiss, 2014; Fu and Ares, 2014).

2.2.1. Ensamblaje del espliceosoma y reacción de *splicing*

El proceso de SC que comprende la remoción de los intrones, es realizado por un complejo denominado espliceosoma, el cual se conforma de cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP: U1, U2, U4, U5 y U6) y ~150 factores proteicos auxiliares (Kim *et al.*, 2007; Fu and Ares, 2014). El proceso de *splicing* está caracterizado por cuatro señales clásicas que permiten el reconocimiento y catálisis del pre-mRNA por el espliceosoma: 5'SS, 3'SS, secuencia de ramificación (BPS) y tramo de polipirimidina (PPT) (Figura 4a) (Chen and Manley, 2009; Kornblihtt *et al.*, 2013; Chen and Weiss, 2014). El ensamblaje del espliceosoma inicia con la formación del complejo E, mediante el reclutamiento de la U1 snRNP al 5'SS. U1 snRNP se une por complementariedad a la GU en el 5'SS del intrón. De manera simultánea, el factor de *splicing* SF1 se une a la BPS del intrón, el factor U2AF2 al PPT y U2AF1 en la AG del 3'SS. Luego, U2 snRNP desplaza al factor SF1 y se une a la BPS mediante una reacción dependiente de ATP, dando lugar al complejo A o pre-espliceosoma. Después ocurre la formación del complejo B o espliceosoma pre-catalítico con la incorporación del trímero U4/U5/U6 snRNP, donde U5 snRNP se une al 5'SS del exón y U6 a U2 snRNP. Esto ocasiona que U1 snRNP sea liberada, favoreciendo que U5 cambie del exón al intrón y que U6 se una al 5'SS (Li *et al.*, 2007).

Además, se produce la formación del complejo C o espliceosoma catalítico mediante la liberación de U4, de esta forma U6/U2 snRNP catalizan su transesterificación, causando que el 5' terminal del intrón se ligue a la A de la BPS para generar una estructura intrónica en forma de asa. U5 snRNP escinde el 5'SS para separar al exón de la asa intrónica, e inmediatamente ligar covalentemente los exones (proceso dependiente de ATP). Posteriormente, U5 se une a U6/U2 snRNP para formar un trímero que permanecerá unido a la asa intrónica escindida por un corto tiempo.

De esta manera, el mRNA procesado por *splicing* es liberado, la asa intrónica es degradada y las snRNP son recicladas para iniciar el *splicing* de otros pre-mRNA (Figura 4b).

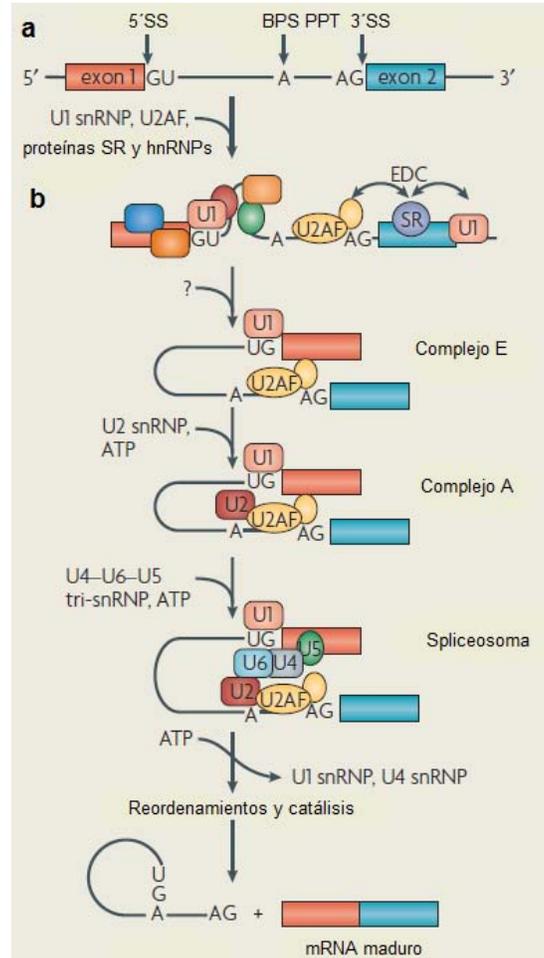


Figura 4. Maquinaria de *splicing*. a) Las cuatro señales clásicas que permiten el reconocimiento del pre-mRNA por el espliceosoma (5'SS, 3'SS, BPS y PPT). b) Ensamblaje del espliceosoma y reacción de *splicing* (modificado de Li *et al.*, 2007).

2.2.2. *Splicing* alternativo

El procesamiento del pre-mRNA mediante SA da lugar a la inclusión de distintos exones o secciones de ellos en el mRNA maduro, resultando en la generación de formas distintas de mRNA a partir de un solo gen. Los transcritos procesados por SA varían en cuanto a su estabilidad, función e incluso contienen información que codifica para proteínas con funciones similares o completamente distintas a las del transcrito canónico, dependiendo

del tipo de tejido, tipo celular, tipo de estímulo y del microambiente celular (Chen *et al.*, 2012).

Estudios recientes han revelado que aproximadamente el 90% de los genes en humano son regulados por SA. Además, se ha estimado que cerca de 28,000 genes en humanos que codifican para proteínas pueden generar un repertorio de hasta 100,000 proteínas distintas por este mecanismo (Kalsotra and Cooper, 2011; Fu and Ares, 2014). Lo que sugiere que el SA es un proceso clave que contribuye en la complejidad fenotípica celular al incrementar la información y versatilidad del transcriptoma y proteoma (Nielsen and Graveley, 2010; Neacsulea and Kaessman, 2014).

La producción de mRNA alternativos está regulada por un complejo sistema de factores proteicos que actúan en *trans* e interactúan con secuencias que funcionan en *cis* en el pre-mRNA (Figura 5). La combinación de estas interacciones da lugar a diferentes patrones de SA para generar distintos mRNA maduros (Figura 6). Las secuencias que actúan en *cis* involucran a las cuatro señales clásicas de SC (5'SS, 3'SS, BPS y PPT) y adicionalmente a los elementos reguladores de *splicing* (SRE), los cuales contienen sitios de unión cortos y degenerados, a ellos se unen proteínas reguladoras de *splicing* (SRP). Los SRE pueden dividirse en dos clases: 1) potenciadores y silenciadores de *splicing* exónico (ESE, ESS) y 2) potenciadores y silenciadores de *splicing* intrónico (ISE, ISS) (Chen and Manley, 2009).

Por otra parte, los elementos que actúan en *trans* también conocidos como SRP se clasifican en dos grupos: 1) proteínas ricas en serinas y argininas (SR) y 2) ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP). Las proteínas SR, generalmente tienen un papel como reguladoras positivas o promotoras de *splicing*, promueven la inclusión de exones por unión a los ESE, reclutamiento de la U1 snRNP al 5'SS y del factor auxiliar U2AF al 3'SS; a través de interacciones proteína-proteína en etapas tempranas del ensamblaje del espliceosoma. Por su parte, las hnRNP están involucradas en la regulación negativa o inhibición del *splicing*. Ejemplo de ello, son las hnRNP A/B y las proteínas de unión al PPT (PTB). hnRNP A/B antagonizan la función de las proteínas SR mediante su unión de gran afinidad con los ESS. Las PTB se unen a los ISS de las regiones intrónicas, interfiriendo con el reconocimiento funcional de los 3'SS por las U2 snRNP y de los 5'SS por la U1 snRNP (Kornblihtt *et al.*, 2013).

La actividad reguladora de las SRP está coordinada con el espliceosoma, que define los SS funcionales y modula la selección diferencial del SS mediante cuatro reglas reguladoras: a) el umbral para el reconocimiento del SS, b) los efectos opuestos de las proteínas SR y hnRNP, c) los efectos dependientes de la posición y d) la competencia entre los SS (Fu and Ares, 2014). Estas cuatro reglas desembocan en la cooperación y competencia de factores de *splicing* en la regulación del SA (Figura 7).

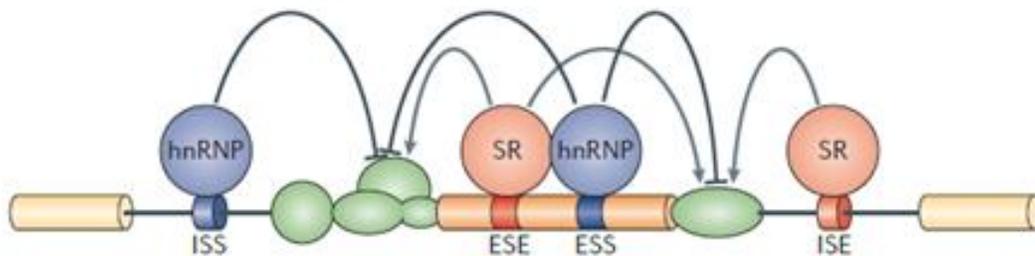


Figura 5. Regulación del SA. Las interacciones entre los elementos que actúan en *cis* (ESS, ESE, ISE e ISS) y los factores proteicos que funcionan en *trans* (proteínas SR y hnRNP) regulan la producción de mRNA alternativos (modificado de Kornblihtt *et al.*, 2013).

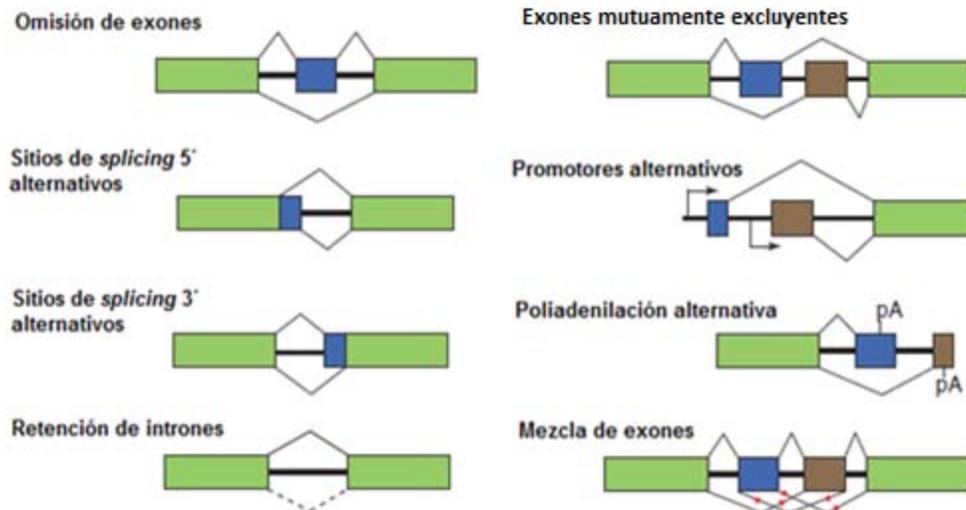


Figura 6. Patrones de SA más frecuentes en eucariotes superiores. Existen múltiples patrones de SA que pueden dar lugar a distintos mRNA. La omisión o escisión de exones representa cerca del 40% de los eventos de SA, la selección de 5' SS y 3' SS representan el 18% y 8% de los eventos de SA, respectivamente. Patrones de menor frecuencia y que representan el 34% restante son la retención de intrones, exones mutuamente excluyentes, promotores alternativos, poliadenilación alternativa y mezcla de exones (modificado de Keren *et al.*, 2010; Chen and Weiss, 2014).

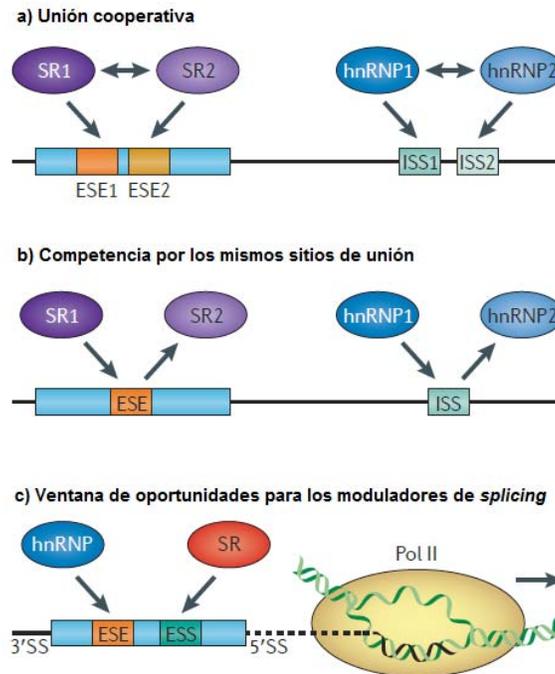


Figura 7. Cooperación y competencia de factores de *splicing* en la regulación del SA. a) Distintos reguladores de *splicing* pueden unirse a SRE adyacentes, en un modo cooperativo, mediante interacciones proteína-proteína. b) SRE que actúan en *cis* localizados en los intrones o exones pueden ser reconocidos por reguladores semejantes de *splicing* de unión a RNA, resultando en la competencia entre reguladores semejantes. c) Estudios recientes sugieren que la velocidad de elongación de la RNA polimerasa II puede influir en la selección de los SS, lo cual puede crear una ventana de oportunidades para que las SRP positivas y negativas reconozcan sus sitios de unión co-transcripcionalmente, sugiriendo un posible acoplamiento del proceso de *splicing* con la transcripción (modificado de Schor *et al.*, 2013; Fu and Ares, 2014).

Adicionalmente, existen mecanismos moleculares de mantenimiento homeostático que afectan la estabilidad, localización y eficiencia traduccional de las SRP y de los mRNA alternativos, tales como: el uso de sitios alternativos de inicio de la transcripción, la poliadenilación alternativa, la edición del RNA mediante modificaciones post-traduccionales (fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, etc.), la variabilidad en las regiones no traducidas (UTR) del mRNA y la vía NMD (del inglés *Nonsense-Mediated Decay*) (Kalsotra and Cooper, 2011; Hatano *et al.* 2013).

2.2.2.1. Importancia genética y molecular

La predominancia del SA ha generado una pregunta importante sobre su importancia biológica. ¿Qué fracción de las múltiples isoformas de mRNA de cada uno de los genes que son regulados por SA tienen un impacto funcional? Ello ha desembocado en un

incremento de la investigación e identificación de un creciente número de eventos de SA con importancia biológica funcional. Algunos de los eventos de SA más relevantes son los siguientes:

- 1) *Control del ciclo celular y apoptosis.* Una gran fracción de factores apoptóticos en mamíferos, incluyendo receptores de muerte, caspasas y blancos de las caspasas experimentan SA. El SA de los reguladores de la apoptosis de la familia BCL-2, incluyendo BCL-2, BCL-X y MCL-1, dan lugar a isoformas largas y cortas que proveen funciones apoptóticas o funciones pro-apoptóticas respectivamente (Schwerk and Schulze, 2005; Moore *et al.*, 2010).
- 2) *Auto-renovación y diferenciación de las células madre.* Algunos investigadores han evidenciado cambios específicos en el transcriptoma durante la diferenciación de las células madre embrionarias. Éstos incluyen contribuciones del SA en las decisiones del destino celular y en las capacidades de pluripotencia. El SA afecta factores de transcripción clave, tales como: OCT4, NANOG, SOX2 y E2 α . En el caso particular del OCT4, genera dos isoformas alternativas: OCT4A que regula genes responsables de la pluripotencialidad y OCT4B que no mantiene la capacidad de auto-renovación y activa genes de estrés celular (Boyer *et al.*, 2005; Wang and Dai, 2010).
- 3) *Maduración de tejidos.* Trabajos recientes han demostrado que cerca del 50% de las variantes generadas por SA son expresadas en tejidos específicos (Kalsotra and Cooper, 2011). Por ejemplo: la expresión de las SRP NOVA1/2 y RBFOX regulan los eventos de *splicing* requeridos en tejido cerebral para el correcto desarrollo de las neuronas motoras y la homeostasis eléctrica neuronal, respectivamente. Alteraciones en RBFOX1 están asociadas a eventos de epilepsia, autismo y retraso mental (Li *et al.*, 2007). Los eventos de SA también son importantes en la morfogénesis y maduración del corazón (Kalsotra *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009).
- 4) *Transiciones epitelio-mesénquima (EMT).* Las conversiones fenotípicas de las células entre un estado epitelial y mesenquimal son fundamentales en: a) la morfogénesis de órganos y la remodelación tisular durante el desarrollo

embrionario, b) respuestas fisiológicas al daño y cicatrización en tejidos adultos, y c) respuestas patológicas (fibrosis y metástasis). A nivel celular las EMT se identifican por la pérdida de características epiteliales (adhesión celular y polaridad) y la adquisición de características mesenquimales (motilidad e invasividad). En líneas celulares de cáncer de mama, la sobreexpresión de SRSF1 favorece la EMT, a través del SA del proto-oncogen *RON*, para producir una forma pro-invasiva y constitutivamente activa (Thiery and Sleeman, 2006). Por otra parte, las proteínas reguladoras de *splicing* epitelial ESRP1 y ESRP2 tienen un papel determinante en los cambios de *splicing* en la EMT. Mediante estudios con microarreglos sensibles a *splicing*, se detectó que las ESRP dan lugar a isoformas de CD44 que favorecen los procesos de proliferación, adhesión y migración en la EMT (Warzecha *et al.*, 2010).

- 5) *Cáncer*. Anormalidades en el SA, que afectan a los elementos que actúan en *trans* y en *cis*, son una fuente muy amplia de enfermedades humanas, entre ellas el cáncer. Su papel ha sido bien documentado e incluye cambios en genes asociados con los procesos de progresión tumoral, tales como: migración celular, regulación de la proliferación y crecimiento celular, angiogénesis, evasión de la apoptosis, entre otros (Wang and Cooper, 2007; Chen and Weiss, 2014). En el caso particular de la LLA, se ha señalado la participación del SA, pero hay un número limitado de estudios.

En el estudio de Iacobucci y colaboradores en 2010, se demostró que pacientes diagnosticados con LLA-B positivos para *BCR-ABL1* hay cambios en la expresión de la desaminasa de citidinas (AID); la cual promueve mutaciones en el DNA, ya que causa la desaminación de las citosinas y las convierte en uracilos. En dichos pacientes se identificaron cuatro nuevas isoformas de AID y su expresión diferencial entre cada individuo: AID-E4a, AID-E4, AIDins3 y AID-E3E4, solo las primeras tres mantienen el dominio de desaminasa de citidinas. Tales isoformas muestran distinta localización subcelular (al mostrar alteraciones en la secuencia de exporte nuclear) y promueven el incremento de la inestabilidad genómica del individuo portador. Muchos de sus blancos son genes cruciales en los procesos de leucemiogénesis (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *GADD45*, *PAX5*, *BTG1*, *EBF1*, *MDS1* e Ig) (Iacobucci *et al.*, 2010).

El correpresor de BCL-6 (BCoR) es otro gen con una expresión aberrante de isoformas. Las variantes alternativas de BCoR muestran alteraciones en los dominios de unión a AF9, causando la eventual supresión de genes esenciales en los procesos de la regulación hematopoyética (Srinivasan *et al.*, 2003).

Se ha demostrado, también, la participación del SA en la LLA mediante la expresión de distintas isoformas de BMF. BMF pertenece a la familia de proteínas BCL-2, involucradas en la activación de la apoptosis. En 2004 Morales y colaboradores identificaron dos nuevas isoformas de mRNA de BMF, BMF-II y BMF-III, en células leucémicas derivadas de LLC-B. Cada isoforma, a diferencia de BMF canónica, da lugar a una proteína distinta que carece del dominio proteico BH3 con funciones antiapoptóticas (Morales *et al.*, 2004).

Por otro lado, *IKAROS* es otro gen con patrones de SA, bien definidos, involucrado en el desarrollo temprano de las células B en un contexto normal. En condiciones de expresión aberrante por SA participa en la progresión de la LLA. En células derivadas de LLA-pre-B con reordenamientos del gen *BCR-ABL1* muestran una desregulación en el SA del pre-mRNA de *IKAROS*, favoreciendo la expresión aberrante de una variante dominante negativa, denominada IK6. La sobreexpresión de IK6 interfiere con la identidad del linaje y exhibe un arresto de diferenciación de los linfoblastos leucémicos en la fase pre-B (Klein *et al.*, 2006).

Finalmente, se ha demostrado que *BCR-ABL1* induce el SA aberrante de varios genes, incluyendo *SLP65* (regulación del programa de desarrollo que promueve la diferenciación y limita la expansión de las células pre-B) (Jumaa *et al.*, 2003), *PYK2* (regulación en la migración y los niveles de células B esplénicas) (Salesse *et al.*, 2004) y *BTK* (indispensable en el desarrollo, diferenciación y señalización de las células B) (Feldhahn *et al.*, 2011).

2.2.2.2. Microarreglos y *splicing* alternativo

Avances en las técnicas de microarreglos sensibles a *splicing* han permitido la realización de análisis detallados del transcriptoma a gran escala, particularmente de exones individuales. Los chips para microarreglos generalmente contienen sondas que son complementarias a regiones de exones individuales y/o a las uniones exón-exón. Éstos

son hibridados al DNA complementario (cDNA) derivado de las muestras de RNA que serán comparadas. El SA resulta en la pérdida de señal de sondas específicas en relación a otras, y una ganancia de señal para sondas que son específicas para las uniones de variantes alternativas. Por ejemplo, la escisión de exones resulta en la pérdida de señal de una sola sonda cuando solo se usan sondas específicas para exones o en la pérdida de señal cuando se emplean sondas de exones individuales y sondas de unión exón-exón. Posteriormente, los resultados deben ser validados mediante RT-PCR (Wang and Copper, 2007).

Resultados de nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad sensibles a *splicing* (con muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B, líneas celulares derivadas de leucemia y células B normales de individuos catalogados como clínicamente sanos), han revelado la presencia de potenciales variantes de mRNA del gen antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en LLA-B (Figura 8). Por esta razón, en este trabajo evaluaremos la expresión de PCNA en muestras de LLA-B y en líneas celulares derivadas de leucemia, comparadas con células B normales.

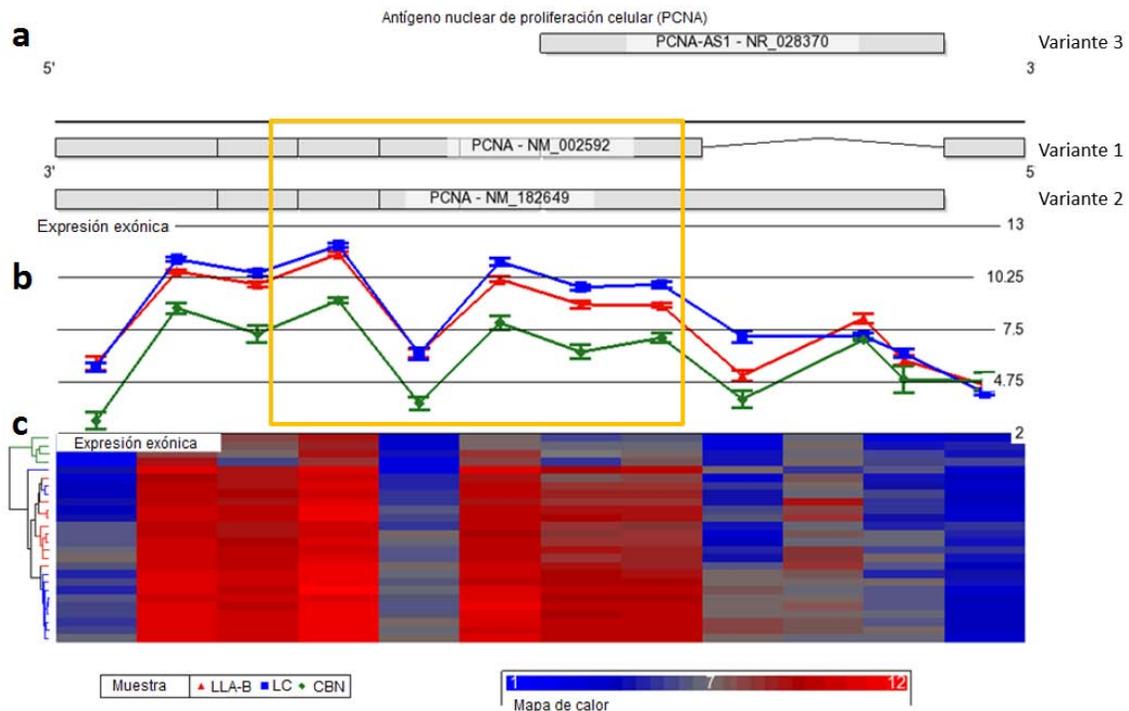


Figura 8. Expresión exónica diferencial de PCNA en LLA-B. a) Variantes alternativas de PCNA (isoformas 1 y 2 corresponden a RNA codificantes; la variante 3 se trata de un RNA largo no codificante). b) Niveles individuales de expresión exónica en LLA-B (roja), líneas celulares derivadas de leucemia (LC, azul) y células B normales (CBN, verde). c) Mapa de calor de cada pico que contiene las muestras individuales; azul denota una baja expresión y rojo indica una expresión elevada. El cuadro amarillo indica la región de interés a evaluar en este estudio.

2.3. Antígeno nuclear de proliferación celular

2.3.1. Descubrimiento de PCNA

En 1978 Miyachi y colaboradores reportaron la presencia de “antígenos” involucrados en el ciclo celular de células HEp-2, derivadas de carcinoma epidermoide, y posteriormente estos “antígenos” fueron identificados en pacientes japonesas con lupus eritematoso sistémico, denominándolos “Ne”. Sin embargo, cuando se mostró que éste estaba altamente expresado en linfocitos en proliferación, el nombre fue cambiado a “antígeno nuclear blastogénico”. Cuando estudios posteriores mostraron que dicho antígeno estaba altamente expresado en el núcleo de una gran variedad de tejidos y líneas celulares, el nombre fue modificado a antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). En 1987 Bravo y colaboradores identificaron a PCNA como un factor de procesividad de la DNA polimerasa δ , denominándolo PFDP δ , el cual formaba parte de un complejo multiproteico con forma de anillo, implicado en la replicación y reparación del DNA. No obstante, la nomenclatura de PCNA persiste hoy en día (Mahler *et. al.*, 2012).

2.3.2. Estructura genómica

El gen *PCNA* se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 20 en la región p12.3 de la hebra antisentido. Tiene una extensión de 11,674 pb y cuenta con 8 exones (Figura 9) (GeneCards, 2014). Dicho gen da lugar a tres transcritos, dos de estos son producidos por SA y codifican para la misma proteína, y el otro para un RNA largo no codificante. Según datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la variante 1 de mRNA (NM_002592.2) tiene una longitud de 1355 pb y está conformada por 7 exones, de los cuales 6 contienen la secuencia codificante. La traducción inicia en la adenina 240 del exón 2 y termina en la guanina 1025 del exón 7 (Figura 10a).

La variante 2 de mRNA de PCNA (NM_182649.1) tiene una extensión de 1319 pb y está constituida por 6 exones que contienen la secuencia codificante. La traducción inicia en la adenina 204 del exón 1 y termina en la guanina 989 del exón 6 (Figura 10b). Tanto la variante 1 como la variante 2 generan una proteína monomérica idéntica de 261 aminoácidos (NP_872590.1 y NP_872590.1, respectivamente) con un peso de 28.6 kDa (NCBI, 2014).

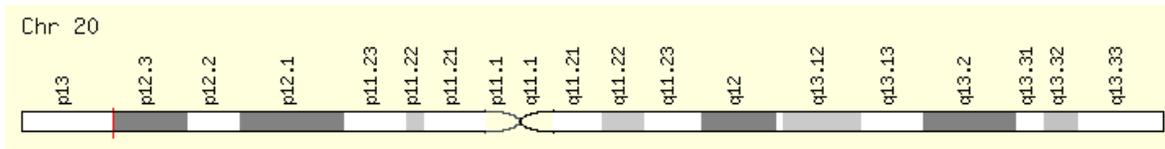


Figura 9. Localización del gen PCNA. PCNA tiene una extensión de 11,674 pb y se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 20(p12.3) (GeneCards, 2014).

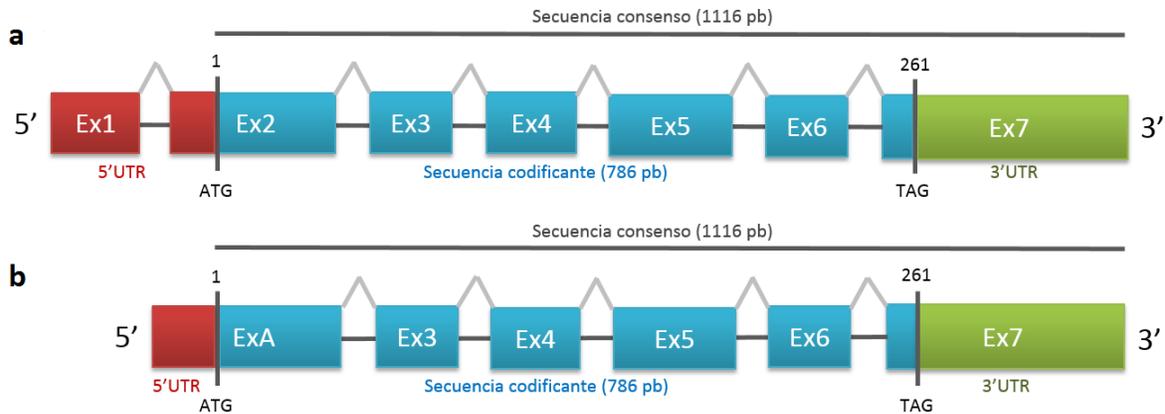


Figura 10. Representación de variantes de mRNA de PCNA. a) Variante 1 (NM_002592.2) y b) variante 2 (NM_182649.1) comparten una secuencia consenso de 1116 pb (línea negra) y difieren en la región 5'UTR.

2.3.3. Estructura proteica

PCNA es una proteína que consta de dos dominios estructuralmente similares. El dominio A o N-terminal (residuos 1-117) y el dominio B o C-terminal (residuos 135-258) están conectados a través de una asa de conexión interdominio, IDCL (residuos 118-134) (Dieckman *et al.*, 2013, UniProt, 2014). PCNA monomérica tiene dos secuencias de exporte nuclear (NES), que son: 1) ILKKVLEALKDLI en el dominio A y 2) LDVEQLGI en el IDCL (Bouayad *et al.*, 2012). Topológicamente, ambos dominios constan de 2 hélices- α y 9 láminas- β cada uno (Figura 11).

PCNA pertenece a la familia de proteínas de abrazaderas deslizantes del DNA, un grupo de proteínas multiméricas con estructura de tipo anillo y con simetría pseudo-hexagonal que encierran el dúplex de DNA para luego deslizarse a lo largo de éste. En humanos, se requieren de tres subunidades de PCNA para formar una estructura cuaternaria homotrimérica, éstas se ensamblan en el núcleo celular alrededor del DNA, mediante una

reacción dependiente de ATP catalizada por el factor de replicación C (RFC), en una forma de cabeza a cola (*head-to-tail manner*) mediante el dominio A de una subunidad que interactúa con el dominio B de otra subunidad adyacente (Figura 12).

El anillo de PCNA tiene un diámetro de 80 Å, su canal interno tiene un diámetro de ~35 Å y contiene un conjunto de 12 hélices- α , 4 por cada monómero de PCNA, con carga positiva debido a la presencia de argininas y lisinas. Esto facilita el paso del DNA con carga negativa a través de la cavidad central, permitiendo una adecuada orientación para que las proteínas de unión a PCNA puedan llevar a cabo su función (Figura 11) (Dieckman *et al.*, 2013).

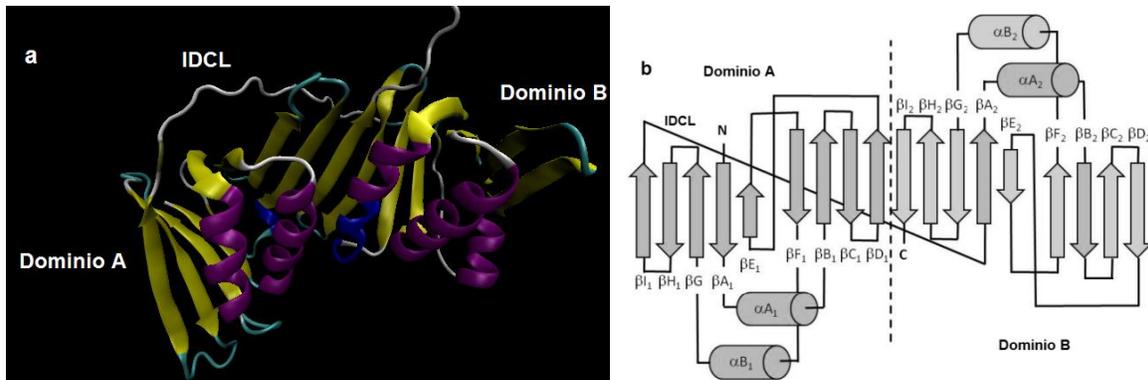


Figura 11. Estructura monomérica de PCNA de humano. a) PCNA monomérica tridimensional. b) Esquema topológico que muestra la estructura secundaria y terciaria (ID 1W60, Protein Data Bank, 2014).

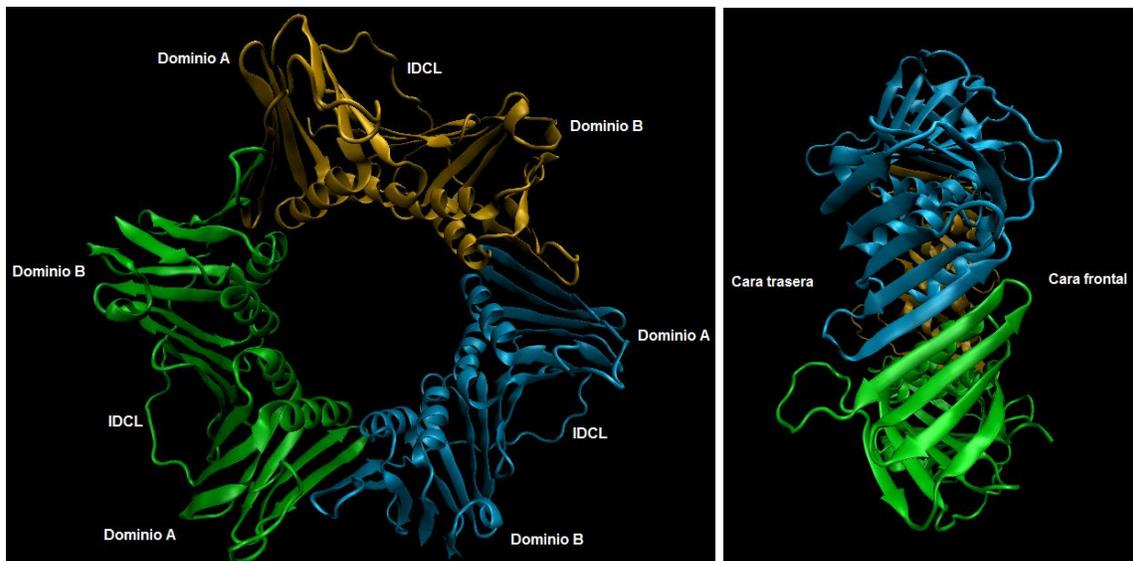


Figura 12. Estructura tridimensional de PCNA homotrimerica de humano. Lado izquierdo: vista frontal. Lado derecho: vista lateral (ID 1W60, Protein Data Bank, 2014).

2.3.4. Interacción con proteínas y funciones

PCNA trimérica actúa como una plataforma para el reclutamiento de componentes nucleares, cruciales en múltiples procesos relacionados con el DNA. Estos incluyen: replicación, reparación de daño al DNA, cohesión de cromátidas hermanas, remodelación de la cromatina, apoptosis y control del ciclo celular (Cuadro 2) (Stoimenov and Helleday, 2009). Dado lo anterior, PCNA tiene múltiples interacciones con otras proteínas, éstas deben ser reguladas de manera espacio-temporal para facilitar sus funciones en tales procesos. Muchas de las proteínas de unión a PCNA cuentan con motivos que gobiernan las interacciones proteína-PCNA. Dependiendo del tipo de proteína de unión a PCNA se distinguen tres motivos principales: a) PIP *box* [Q-x-x-(ILM)-x-x-(FY)-(FY)], b) APIM [(KR)-(FYW)-(LIVA)-(LIVA)-(KR)] y c) PIP *degron*, una versión extendida del PIP *box* clásico [Q-x-x-(ILM)-x-T-D-x-(FY)-(FY)]. Estos motivos han sido identificados en >200 proteínas distintas y usualmente interactúan con una sola subunidad de PCNA en una región hidrofóbica entre los dominios A y B cercanos al IDCL. La naturaleza tripartita del anillo de PCNA le permite interactuar con tres proteínas al mismo tiempo (una por cada monómero) (De Biasio and Blanco, 2013; Mailand *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Ejemplos de proteínas de interacción a PCNA en humanos (modificada de De Biasio and Blanco, 2013).

Función	Proteínas de interacción a PCNA
Replicación del DNA	DNA polimerasas clásicas (δ , ϵ), DNA polimerasas de TLS (η , ι , λ), WRN, RFC, FEN1, Ligasa 1, PDIP1, Ku, PDIP38, Cdt1, RNasa HB2.
Reparación al DNA y evasión de daño	PARP-1, APE-1, APE-2, hMYH, MSH2, UNG2, XRCC1, MSH3, MSH6, DNA polimerasa β , TdT.
Control del ciclo celular y supervivencia	CDC2, CDK2, CDK5, ciclina D1, ciclina D3, p21, Cdc25C, Gadd45 α , ProT α , p15, CDC6, hHus1, MCL-1, ING2, PP1.
Ensamblaje-remodelación de la cromatina y cohesión de cromátidas hermanas	DNMT1, Ctf18, Desacetilasa de histonas-1, CAF-1 p300, P160, WSTF.
Otras	Treacle (posiblemente involucrada en el transporte nucleolar-citoplasmático), RHA (relajación del DNA y RNA de doble hebra en dirección 3' a 5').

Un ejemplo clásico de la función de PCNA es su papel en el proceso de replicación del DNA. El modelo general de la replicación del DNA involucra a la DNA polimerasa α , la cual sintetiza, en ambas hebras del DNA (adelantada y rezagada) un oligonucleótido de ~20 bases e inicia el proceso de replicación. PCNA es ensamblado, con ayuda del factor RFC, alrededor del DNA en los sitios donde fueron sintetizados dichos oligonucleótidos, de esta manera PCNA desplaza a la DNA polimerasa α en ambas hebras. Luego recluta la DNA polimerasa ϵ a la hebra adelantada y la DNA polimerasa δ a la hebra rezagada. Así PCNA, en parte, contribuye a la elevada procesividad de la DNA polimerasa y mantiene una replicación eficiente (Stoimenov and Helleday, 2009).

2.3.5. Modificaciones post-traduccionales

El reclutamiento de proteínas a los sitios de replicación vía interacción PCNA está regulado adicionalmente por modificaciones post-traduccionales de PCNA (Figura 13). Las modificaciones más frecuentes incluyen:

a) Monoubiquitinación. En eucariontes superiores PCNA es monoubiquitinado, en presencia de daño al DNA para promover la síntesis de translesión (TLS), en la lisina (K) 164 por el complejo RAD18-RAD6 en respuesta a un bloqueo en la replicación. Esto favorece el intercambio de DNA polimerasas clásicas por DNA polimerasas de TLS, las cuales contienen, además del motivo PIP box, dominios de unión a ubiquitina UBZ o UBM, permitiendo la interacción preferencial con PCNA monoubiquitinado y previniendo el colapso de la horquilla de replicación (Mailand *et. al.* 2012).

b) Sumoilación. La sumoilación de las K127 y K164 promueve el reclutamiento de factores de anti-recombinación (PARI) a la horquilla de replicación, evitando procesos de recombinación del DNA (Dieckman *et al.*, 2013).

c) Acetilación y fosforilación. La acetilación de la K248 y la fosforilación de las tirosinas 114, 211, 249 y 250 están involucradas en la protección contra la degradación de PCNA vía proteosoma (Wang, 2014).

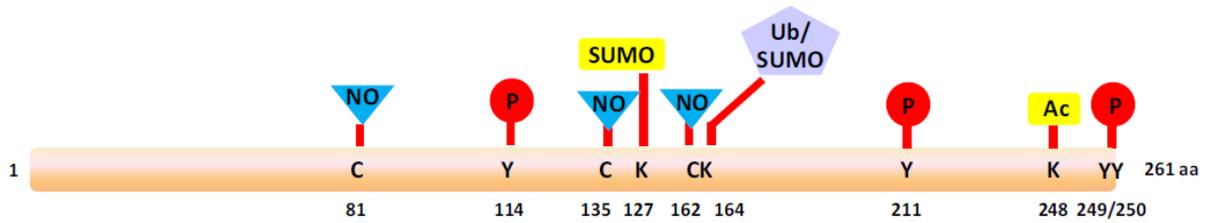


Figura 13. Modificaciones post-traduccionales de PCNA. La monoubiquitinación del residuo K164 está asociada a los procesos de reparación de daño en el DNA, la sumoilación de K127 y K164 impide procesos de recombinación no deseados, la acetilación de K248 y la fosforilación de distintas Y (114, 211, 249 y 250) favorecen la protección de PCNA contra la degradación vía proteosoma. Ac, acetilación; NO, S-nitrosilación; P, fosforilación; SUMO, sumoilación; Ub, ubiquitinación; C, cisteína; K, lisina; Y, tirosina (modificado de Wang, 2014).

De acuerdo con Wang en 2014, la versatilidad de PCNA en sus funciones, es de particular interés en estudios sobre el cáncer. La sobreexpresión de PCNA en cáncer de mama, colón, próstata, hepatocarcinoma celular, linfomas, LLC y melanomas ha sido relacionada con la velocidad de proliferación de tales neoplasias. Su participación en la proliferación celular y su asociación con la malignidad celular ha resultado en un uso frecuente de PCNA como un marcador molecular pronóstico y diagnóstico, su inhibición se ha considerado como una estrategia viable contra el cáncer (Stoimenov and Helleday, 2009; Wang, 2014). Dado que no hay estudios sobre PCNA desde el punto de vista del SA en cáncer, particularmente en la LLA; en este estudio evaluaremos la expresión de mRNA de PCNA en la LLA.

3. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo de neoplasia predominante en niños y adolescentes menores de 15 años, representando así una tercera parte del total de las neoplasias pediátricas diagnosticadas y la segunda causa de muerte en esta población a nivel mundial, por lo que es de gran importancia identificar marcadores moleculares pronóstico, diagnóstico y de tratamiento (Harrison, 2011; OMS, 2014; Young *et al.*, 2014; Cooper and Brown, 2015). Anormalidades en el SA, son una fuente muy amplia de enfermedades humanas, entre ellas el cáncer. Su papel ha sido bien documentado e incluye cambios en genes asociados con los procesos de progresión tumoral, tales como: migración celular, regulación de la proliferación y crecimiento celular, angiogénesis, evasión de la apoptosis, entre otros (Wang and Cooper, 2007; Chen and Weiss, 2014). En el caso particular de la LLA, se ha señalado la participación del SA, pero hay un número limitado de estudios. Nuestro grupo de investigación, utilizando microarreglos de alta densidad, ha revelado el incremento de la expresión de PCNA en líneas celulares derivadas de leucemia, muestras de pacientes con LLA-B y en células B normales; además, se han observado cambios de expresión exónica, sugiriendo la presencia de potenciales variantes de mRNA del gen PCNA en LLA.

PCNA es una proteína que lleva a cabo funciones importantes en diversos procesos relacionados con el DNA, tales como la replicación, reparación de daño, ensamblaje/remodelación de la cromatina y cohesión de cromátidas hermanas. Una desregulación en la expresión de dicha proteína promueve la alteración de la proliferación celular y una fuerte asociación con la transformación celular en distintos tipos de neoplasias, entre ellas la LLA (Stoimenov and Helleday, 2009; De Biasio and Blanco, 2013; Mailand *et al.*, 2013; Wang, 2014).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la expresión e identificar variantes de mRNA del gen *PCNA* en muestras de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B.

4.2. Objetivos particulares

1. Amplificar la región de *PCNA* con un decremento en la expresión exónica, según el microarreglo de alta densidad.
2. Caracterizar las variantes de mRNA expresadas del gen *PCNA*.
3. Modelar *in silico* la estructura terciaria de las variantes expresadas de mRNA de *PCNA*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de muestras

Para el presente estudio se seleccionaron pacientes pediátricos diagnosticados con LLA-B en el INP del periodo de julio a diciembre de 2014, con previo consentimiento y asentimiento informado, de los cuales se obtuvo aspirado de médula ósea (AMO) con los siguientes criterios de inclusión:

1. Pacientes pediátricos con el diagnóstico de LLA-B.
2. Sin tratamiento previo.
3. De cualquier sexo.
4. Edad de 1 a 15 años.

Además, se obtuvieron muestras de sangre periférica donadas por siete individuos de entre 22 a 25 años (grupo control), siendo los únicos criterios de inclusión: el no presentar alguna neoplasia y ser de cualquier sexo.

Las líneas celulares (K-562 y Jurkat derivadas de LMC y LLA-T, respectivamente) empleadas en este estudio fueron donadas por el Laboratorio de Oncología Experimental del INP.

5.2. Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA total, se obtuvo el botón de células, las muestras se lavaron dos veces con 1 ml de PBS pH 7.4, y luego fueron homogenizadas por pipeteo en 1 ml de TRIzol® e incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Enseguida, a cada tubo se le agregaron 200 µl de cloroformo (por cada mL de TRIzol® empleado), se agitaron en vórtex por 15 segundos e incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos; las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa resultante fue

transferida a tubos eppendorf nuevos, luego se adicionaron 500 μ l de isopropanol para después dejar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12,000 g por 10 minutos a 4°C; el sobrenadante resultante fue eliminado. El botón de RNA obtenido fue resuspendido en 1 ml de etanol al 75% en frío, se agitó en el vórtex por 15 segundos y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4°C, el etanol fue retirado y se dejó secar el botón para resuspenderlo finalmente en 30 μ l de agua libre de nucleasas. Las muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000, la concentración total fue determinada a 260 nm, mientras que la pureza se obtuvo a partir de los valores de los cocientes de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . La integridad del RNA total, se obtuvo mediante el análisis de la presencia de las subunidades ribosomales 28s y 18s, por electroforesis en geles de agarosa al 1% (g/v) y bromuro de etidio 0.005% (v/v).

5.3. Transcripción reversa

Para la obtención del cDNA se empleó el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Para cada muestra, en un tubo eppendorf de 0.2 ml se adicionaron 5 μ g de RNA total, 1 μ l de buffer para DNAasa (1X), 1 μ l de DNAasa (1 U) y la cantidad necesaria de agua libre de nucleasas para tener un volumen de reacción de 10 μ l. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) a 37°C por 30 minutos. Después, a cada tubo se le agregó 1 μ l de EDTA (5 mM) y se continuó con una incubación a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, a cada tubo se le adicionaron 10 μ l de master mix con los siguientes reactivos: 4 μ l de Buffer First-Strand (5X), 1 μ l de dNTP (10 mM), 1 μ l de Random Primers (10X), 2 μ l de DTT (0.1 M), 1 μ l de RNaseOUT (40 U) y 1 μ l de enzima M-MLV RT. Las reacciones fueron incubadas de la siguiente manera: 37°C por 5 minutos, 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos y 70°C por 10 minutos. El volumen de reacción final fue de 20 μ l. Todas las muestras se dividieron en alícuotas a una concentración final de 25 ng/ μ l y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.4. Amplificación de RPL4 por PCR punto final

Como control de expresión endógeno se utilizó el gen RPL4 y se evaluó su expresión en los cDNA obtenidos con la DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). Para cada muestra, en un tubo eppendorf de 0.2 ml se adicionaron 2.5 μ l de DreamTaq Green

Buffer (10X), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de oligonucleótido *forward* (10 pM), 1 µl de oligonucleótido *reverse* (10 pM) (Juárez *et al.*, 2012) (Cuadro 3), 0.125 µl de DreamTaq DNA Polimerasa (0.625 U), 1 µl de cDNA (25 ng) y 18.375 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron inicialmente a 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos. El volumen de reacción final fue de 25 µl.

Los amplicones resultantes se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v) a 85 volts por 45 minutos en solución TBE al 0.5%.

5.5. Amplificación de PCNA por PCR punto final

La amplificación de PCNA por PCR punto final se realizó bajo las siguientes condiciones: para cada muestra, en un tubo eppendorf de 0.2 ml se adicionaron 3.5 µl de DreamTaq Green Buffer (10X), 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de oligonucleótido *forward* (10 pM), 1 µl de oligonucleótido *reverse* (10 pM) (Cuadro 3), 0.125 µl de DreamTaq DNA Polimerasa (0.625 U), 1 µl de cDNA (25 ng) y 17.375 µl de agua libre de nucleasas. El volumen de reacción final fue de 25 µl.

Dependiendo de la secuencia de PCNA a amplificar, las reacciones se incubaron con un programa distinto:

- *Secuencia consenso*. Una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 50 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos.
- *PCNA-1 y PCNA-2*. Una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55.5°C por 30 segundos, 72°C por 70 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos.
- *PCNA-4*. Una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56.5°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos; y una extensión final a 72°C por 15 minutos.

Los amplicones resultantes se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (g/v) con bromuro de etidio 0.005% (v/v) a 85 volts por 45 minutos en solución TBE al 0.5%.

Cuadro 3. Secuencias de oligonucleótidos empleadas para RPL4 y PCNA.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón
RPL4	<i>Forward:</i> 5'-CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCCAAA-3'	60°C	243 pb
	<i>Reverse:</i> 5'-ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC-3'		
PCNA (secuencia consenso)	<i>Forward:</i> 5'-ATATTAGCTCCAGCGGTGTA AA -3'	55°C	613 pb
	<i>Reverse:</i> 5'-ACATCTGCAGACATACTGAGTG-3'		
PCNA-1	<i>Forward:</i> 5'-TGGTTCTGGAGGTAACCGG -3'	55.5°C	916 pb
	<i>Reverse:</i> 5'-ACATCTGCAGACATACTGAGTG-3'		
PCNA-2	<i>Forward:</i> 5'-ATTAAACGGTTGCAGGCGTAG -3'	55.5°C	858 pb
	<i>Reverse:</i> 5'-ACATCTGCAGACATACTGAGTG-3'		
PCNA-4	<i>Forward:</i> 5'-ATTAAACGGTTGCAGGCGTAG -3'	56.5°C	392 pb
	<i>Reverse:</i> 5'-TACTCCTGTTCTGAGGTT-3'		

5.6. Caracterización e identificación de variantes

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa, extraídos y purificados mediante el Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm, mientras que la pureza se obtuvo a partir de los valores de los cocientes de A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

Luego, mediante el BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), se realizó la secuenciación de las bandas de interés bajo las siguientes condiciones: 3.5 µl de buffer de secuenciación BigDye (5X), 0.5 µl de oligonucleótido forward o reverse (10 pM), 15 ng de cDNA, 0.5 µl de enzima BigDye Terminator y la cantidad de agua libre de nucleasas para tener un volumen de reacción final de 10 µl. Las reacciones se dejaron correr en el termociclador con el siguiente programa: 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos (Juárez *et al.*, 2012; Villegas *et al.*, 2014).

Los productos de BigDye fueron purificados con el kit CENTRI-SEP Spin Columns (Princeton Separations, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron introducidas en el secuenciador Applied Biosystems Abi Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con el software 4Peaks v1.7 para Mac OS X; además, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) con el software Clustal Omega del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) para identificar la similitud e identidad entre las secuencias obtenidas y las dos variantes de mRNA de PCNA (NM_002592.2 para la variante 1 y NM_182649.1 para la variante 2) ya reportadas en la base de datos de nucleótidos del NCBI. Con ello, se identificaron nuevas variantes de mRNA de PCNA.

5.7. Modelado *in silico* de la nueva proteína de PCNA

Las variantes de mRNA de PCNA identificadas fueron sometidas a análisis de modelado *in silico* para inferir su posible estructura terciaria. Previo al modelado, las secuencias primarias de aminoácidos, obtenidas a partir de las nuevas variantes de mRNA de PCNA, se buscaron en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) con el fin de verificar que dichas secuencias no hayan sido reportadas previamente.

Posteriormente, empleamos el servidor de libre acceso Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009) para predecir la estructura terciaria de la nueva proteína hipotética de PCNA mediante el método de homología remota y reconocimiento de plegamientos. Durante el perfil de construcción, el servidor Phyre2 hace uso de librerías de estructuras proteicas conocidas de la base de datos del Structural Classification of Proteins (SCOP), PDB y del

PSI-Blast. Además, recurre a programas de predicción de estructura secundaria (Psi-Pred, SSPro, JNet y Disopred), múltiples algoritmos de alineamiento (*profile-profile* y *graph-based*) y a librerías de rotámeros de cadenas laterales. Al finalizar el modelado *in silico*, Phyre2 arrojó resultados de alta precisión (de acuerdo con su nivel de clasificación: CASP8) respecto de la estructura terciaria y realizó una predicción funcional de la nueva proteína hipotética de PCNA. El archivo resultante fue visualizado en el software Visual Molecular Dynamics (VMD) v1.9.2 para Mac OS X.

6. RESULTADOS

En este estudio se evaluaron quince muestras: dos líneas celulares derivadas de leucemia [K-562 (LMC) y Jurkat (LLA-T)], seis muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B y siete muestras del grupo control. El RNA total fue aislado y visualizado en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del mismo. Después, se realizó una transcripción reversa para obtener el cDNA y después PCR punto final. Se utilizó como control de expresión al gen *RPL4*, cuyo fragmento de amplificación fue de 243 pb (Figura 14).

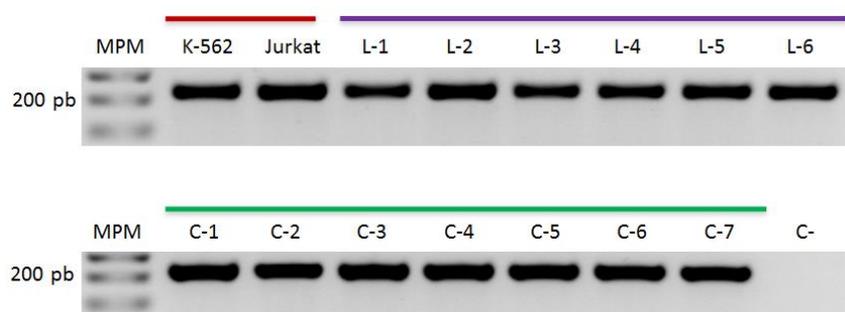


Figura 14. Expresión de RPL4. Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 1.5%. Líneas celulares derivadas de leucemia (línea roja), muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (línea morada) y muestras del grupo control (línea verde). MPM, marcador de peso molecular.

6.1. Identificación de PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6, tres nuevas isoformas de mRNA de PCNA

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para evaluar mediante PCR, la expresión de la secuencia consenso de las variantes constitutivas de PCNA (1 y 2) en la región de interés con un decremento en la expresión exónica, anteriormente indicada en el microarreglo (Figura 8). Todas las muestras tuvieron expresión de PCNA. En el gel de agarosa se muestran los amplicones con el tamaño esperado de 613 pb que corresponden a la secuencia consenso de las variantes constitutivas (PCNA-1 y PCNA-2). Pero, en siete muestras: dos líneas celulares (K-562, Jurkat), dos muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (L-3, L6) y tres muestras del grupo control (C-1, C-5, C-6) se identificó un amplicón adicional con un peso molecular aproximadamente de 447 pb, menor al

esperado (Figura 15). Los amplicones superiores en L-3, L-4 y C-7 están siendo trabajados en nuestro grupo de investigación (datos no publicados).

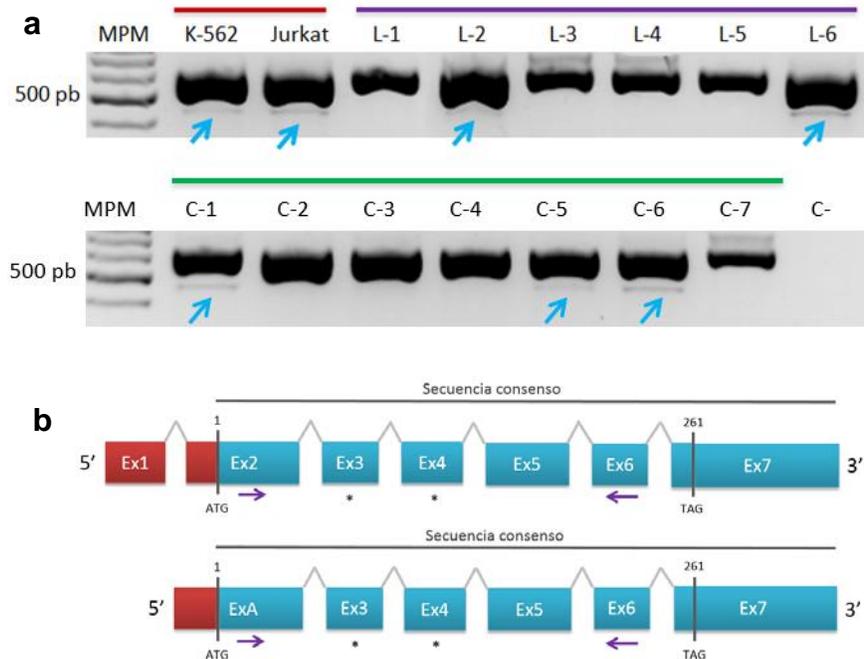


Figura 15. Expresión de PCNA (secuencia consenso). a) Gel de agarosa al 1.5% en el que se observa la expresión de PCNA utilizando oligonucleótidos consenso para las variantes 1 y 2. Todas las muestras mostraron expresión. Adicionalmente, en las líneas celulares, L-2, L-6, C-1, C-5 y C-6 se observó la expresión de una banda menor (~447 pb). Además, en L-3, L-4 y C-7 se observó un amplicón de mayor tamaño al esperado. b) Diseño de oligonucleótidos para la secuencia consenso de PCNA-1 y PCNA-2. Líneas celulares derivadas de leucemia (línea roja), muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (línea morada) y muestras del grupo control (línea verde). MPM, marcador de peso molecular.

Los amplicones de menor peso molecular (señalados con una flecha azul) fueron aislados y secuenciados. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple para comparar la secuencia de la banda menor (presente en K-562, Jurkat, L-2, L-6, C-1, C-5 y C-6) con las dos isoformas de mRNA de PCNA (NM_002592.2 y NM_182649.1), reportadas en el NCBI. En este alineamiento observamos un patrón de SA para PCNA-4 (banda menor) caracterizado por la escisión de dos exones conformados por 166 pb (Figura 16). Por lo tanto, sugerimos dos posibles patrones de SA para PCNA-4: a) escisión de los exones 3 y 4 si la nueva isoforma sigue un procesamiento similar a PCNA-1 y b) escisión de los exones 3 y 4 si la nueva variante sigue un procesamiento similar a PCNA-2 (Figura 17).

Para determinar el patrón de SA correcto de PCNA-4, de las dos variantes alternativas anteriores, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar a PCNA-1 y a PCNA-

2, respectivamente; puesto que el diseño inicial de oligonucleótidos nos impedía señalar el patrón adecuado de SA para PCNA-4.

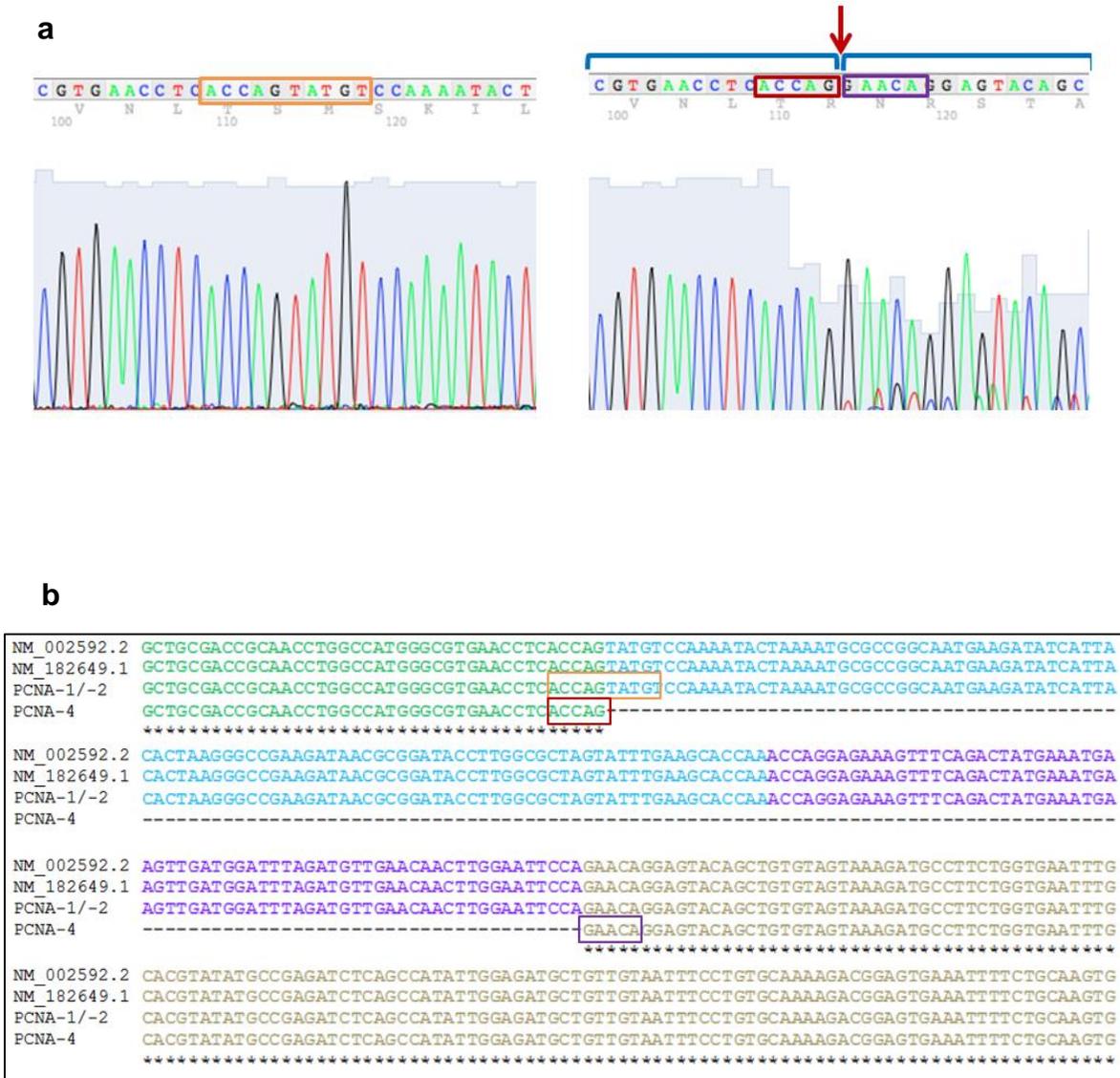


Figura 16. Identificación de PCNA-4. a) Electroferogramas (secuencia constitutiva de PCNA-1 y PCNA-2, cuadro izquierdo; secuencia de PCNA-4 que revela SA, cuadro derecho). b) Alineamiento múltiple de secuencias para PCNA-4 (presente en K-562, Jurkat, L-2, L-6, C-1, C-5 y C-6) comparadas con las dos isoformas de mRNA constitutivas, PCNA-1 (NM_002592.2) y PCNA-2 (NM_182649.1), ya reportadas en el NCBI. Los cuadros rojo y morado denotan los sitios de unión exónicos de PCNA-4 en comparación con el cuadro naranja que indica la secuencia constitutiva de PCNA-1 y PCNA-2.

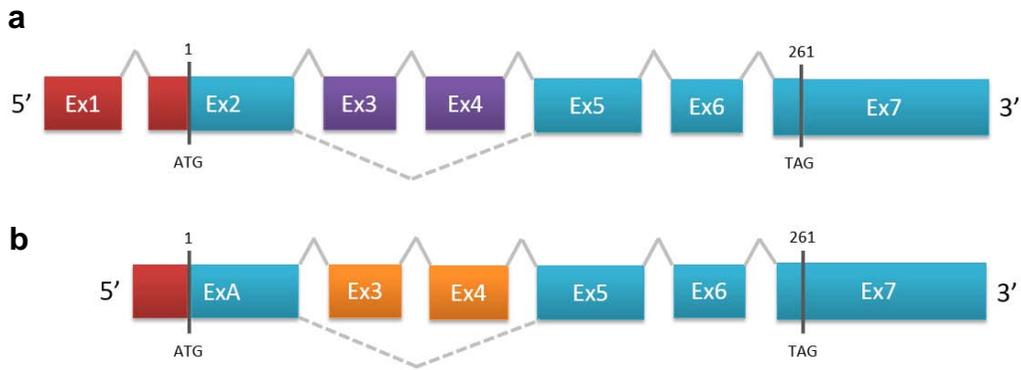


Figura 17. Patrones de SA propuestos para PCNA-4. a) Escisión de los exones 3 y 4 si la nueva isoforma sigue un procesamiento similar a PCNA-1 (a) o a PCNA-2 (b).

Después se realizó PCR punto final para evaluar la expresión de PCNA-1 y PCNA-2 por separado. Solo K-562, Jurkat, L-2, L-5, L-6 y de C-1 a C-6 mostraron expresión de PCNA-1. En el gel de agarosa se muestran los amplicones con el tamaño esperado de 916 pb. Sin embargo, solamente tres muestras, tuvieron un amplicón de menor tamaño: dos líneas celulares (K-562, Jurkat) y una muestra de un paciente diagnosticado con LLA-B (L-2) (Figura 18). Para determinar si los fragmentos anteriores se trataban de PCNA-4, estos fueron separados y secuenciados (Figura 19 y 20). Posteriormente, realizamos un alineamiento múltiple para comparar la identidad de la secuencia obtenida, los amplicones menores (en K-562, Jurkat y L-2) con la secuencia de la isoforma de mRNA de PCNA-1.

En el alineamiento observamos dos patrones de SA distintos a lo que se esperaba: 1) los fragmentos menores generados por las líneas celulares indican un sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2, en el cual, se excluyen 179 pb (residuos 282-460) y 2) el amplicon de la muestra L-6 que cuenta con un sitio donador de *splicing* 3' en el exón 2 en el que se escinden 263 pb (bases 124-386). De esta manera, se identificaron dos variantes de mRNA de PCNA adicionales denominadas: PCNA-5 (en K-562 y Jurkat) y PCNA-6 (en la muestra L-2) (Figura 21).

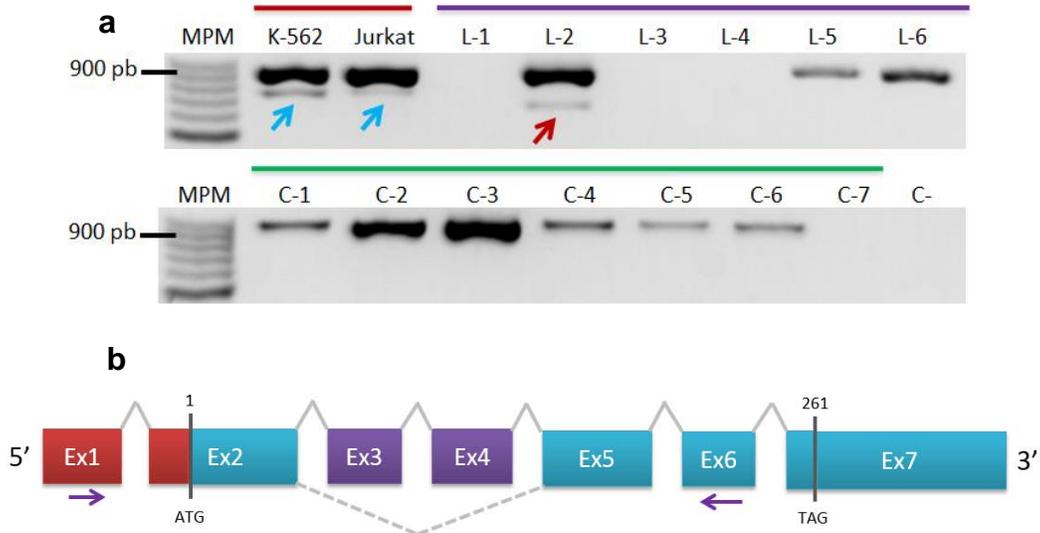


Figura 18. Expresión de PCNA-1. a) En el gel de agarosa al 1.5% se observa la expresión de PCNA-1. Solo K-562, Jurkat, L-2, L-5, L-6, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6 mostraron expresión. La presencia de amplicones adicionales con un peso molecular menor al esperado se denotan con una flecha azul en K-562 y Jurkat (~720 pb) y con una flecha roja en L-2 (~650 pb). b) Diseño de oligonucleótidos para PCNA-1. Líneas celulares derivadas de leucemia (línea roja), muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (línea morada) y muestras del grupo control (línea verde). MPM, marcador de peso molecular.

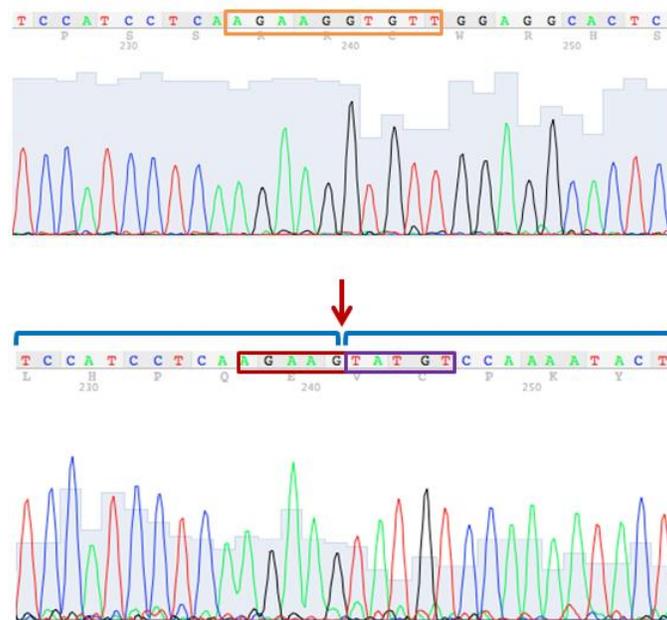


Figura 19. Electroferogramas de PCNA-1 en comparación con PCNA-5. Secuencia constitutiva de PCNA-1, cuadro superior; secuencia de PCNA-5 que indica SA, cuadro inferior.

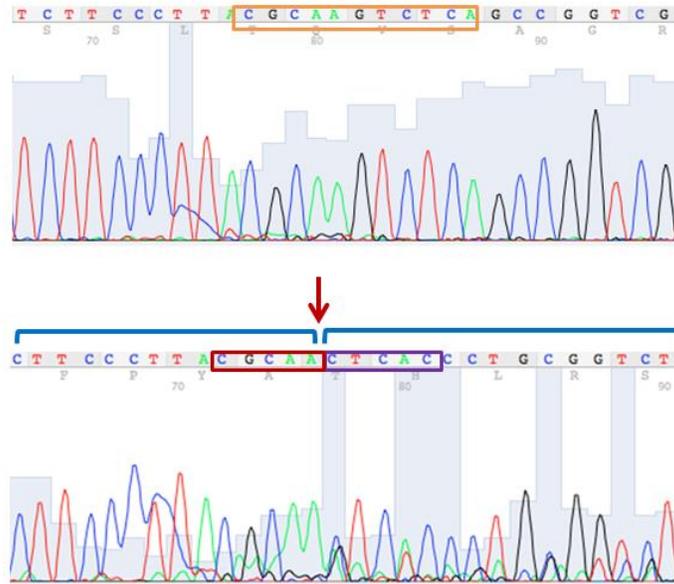


Figura 20. Electroferograma de PCNA-1 en comparación con PCNA-6. Secuencia constitutiva de PCNA-1, cuadro superior; secuencia de PCNA-6 que indica SA, cuadro inferior.

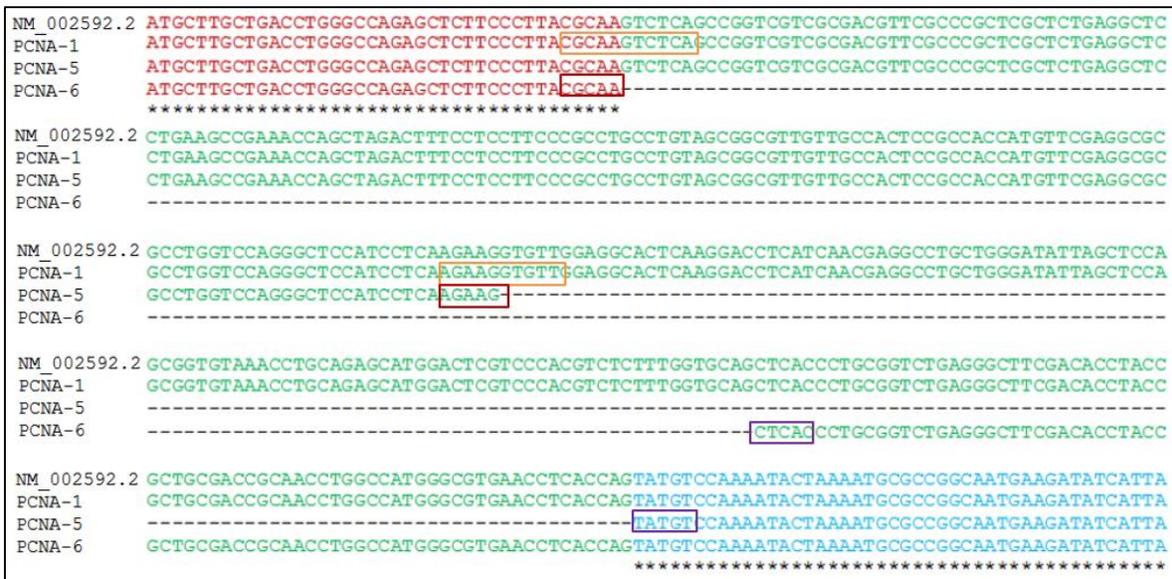


Figura 21. Identificación de PCNA-5 y PCNA-6. Alineamiento múltiple de secuencias para PCNA-5 (en K-562 y Jurkat) y PCNA-6 (en L-2) en comparación con PCNA-1 (NM_002592.2). Los cuadros rojo y morado denotan los sitios de unión exónicos de PCNA-5 y PCNA-6 en comparación con el cuadro naranja que indica la secuencia constitutiva de PCNA-1.

Dado que la isoforma de mRNA de PCNA-4 no sigue un procesamiento similar a PCNA-1, entonces realizamos PCR punto final para amplificar la variante de PCNA-2; y así identificar si PCNA-4 se procesa de manera similar a PCNA-2. Observamos que todas las muestras tuvieron expresión de PCNA-2 con un peso molecular de 858 pb. Esta última tuvo una elevada expresión, por ello nos resultó complicado confirmar si PCNA-4 estaba siendo expresada junto con PCNA-2. Así sugerimos que esta podría estar enmascarada (Figura 22).

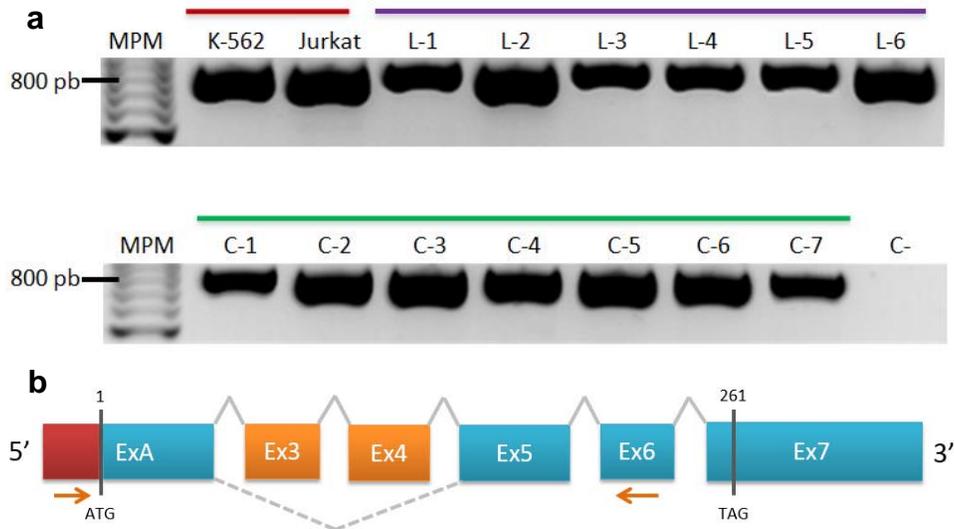


Figura 22. Expresión de PCNA-2. a) En el gel de agarosa al 1.5% se observa la expresión de PCNA-2. Todas las muestras mostraron expresión. b) Diseño de oligonucleótidos para PCNA-2. Líneas celulares derivadas de leucemia (línea roja), muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (línea morada) y muestras del grupo control (línea verde). MPM, marcador de peso molecular.

Por consiguiente, optamos por un diseño alternativo de oligonucleótidos que amplificasen específicamente a PCNA-4. Mediante PCR punto final evidenciamos que PCNA-4 sigue un procesamiento similar a PCNA-2. La mayoría de la muestras (líneas celulares, pacientes diagnosticados con LLA-B y muestras control), excepto L-1 y C-7, mostraron la expresión de PCNA-4 (Figura 23).

Es importante destacar que las nuevas isoformas con procesamiento similar a PCNA-1 (PCNA-5 y PCNA-6) se expresaron solamente en líneas celulares y en un paciente con LLA-B (L-2) en comparación con la variante de procesamiento similar a PCNA-2 (PCNA-4) que está presente prácticamente en todas las muestras (líneas celulares, pacientes con LLA-B y muestras control). Esto podría sugerir que PCNA-5 y PCNA-6 podrían estar

asociadas con la patogénesis de la leucemia. Las tres variantes identificadas en este estudio (PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6) se esquematizan en la Figura 24.

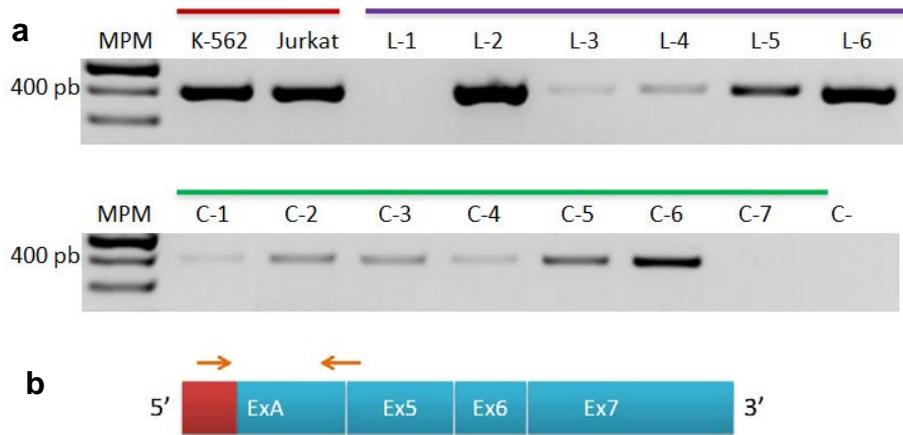


Figura 23. Expresión de PCNA-4. a) En el gel de agarosa al 1.5% se observa la expresión de PCNA-4. Solo K-562, Jurkat, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6 mostraron expresión. b) Diseño de oligonucleótidos para PCNA-4. Líneas celulares derivadas de leucemia (línea roja), muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B (línea morada) y muestras del grupo control (línea verde). MPM, marcador de peso molecular.

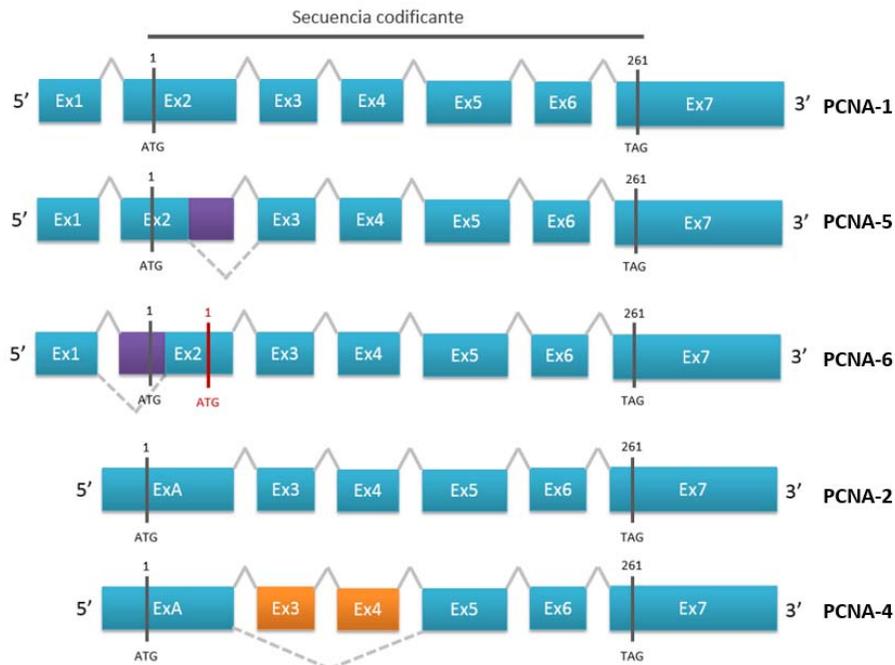


Figura 24. Representación diagramática de las isoformas de mRNA de PCNA en humano y la derivación de propuesta de las tres nuevas variantes generadas por SA. PCNA-4 con la escisión de los exones 2 y 3, PCNA-5 con un sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2 y PCNA-6 con un sitio donador de *splicing* 3'. PCNA-1 (NM_002592.2) y PCNA-2 (NM_182649.1) corresponden a transcritos previamente reportados en el NCBI. ATG y TAG se tratan de los codones de inicio y paro de la traducción, respectivamente. Es posible que PCNA-6 cuente con un sitio de inicio alternativo de la traducción, en este caso nosotros señalamos en color rojo la ATG más cercana a la región exónica escindida por SA.

6.2. Análisis y modelado *in silico* de PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6

Una vez identificadas las nuevas variantes de mRNA de PCNA (4, 5 y 6), se realizó un análisis bioinformático para determinar cómo la información codificante escindida por SA afecta el plegamiento de las proteínas resultantes modeladas *in silico*. Las secuencias de nucleótidos de las variantes 4, 5 y 6 fueron traducidas a aminoácidos y posteriormente comparadas con las secuencias de las variantes constitutivas (PCNA-1/-2), a nivel de aminoácidos. Es importante tener en cuenta que los transcritos constitutivos cuentan con una secuencia codificante consenso de 786 pb que al ser traducidos generan una proteína de 261 aminoácidos, con la misma estructura y función.

- a) PCNA-4 presenta la escisión de dos exones (2 y 3), en los cuales ocurre la pérdida de 166 pb que forman parte de la secuencia codificante. A nivel de estructura primaria, PCNA-4 carece de 55 aminoácidos, dando lugar a una proteína final de 206 aminoácidos. Además, esta nueva isoforma muestra la pérdida de la segunda secuencia de exporte nuclear (NES-2, marcada en amarillo).
- b) PCNA-5 tiene un sitio donador de *splicing* 5' en el exón 2, en el cual se excluyen 179 pb que pertenecen a la secuencia codificante. En su estructura primaria, PCNA-5 presenta la pérdida de 59 aminoácidos, generando una proteína de 202 aminoácidos. Esta variante muestra una escisión parcial de la NES-1 (marcada en verde).
- c) PCNA-6 cuenta con un sitio donador de *splicing* 3' en el exón 2, en el cual se escinden 263 pb que afectan a la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante (incluido el primer triplete de nucleótidos que marcan el inicio de la traducción). Por ello, nosotros seleccionamos el siguiente codón de inicio de la traducción (ATG) más cercano a la región exónica escindida por *splicing* para realizar el análisis de esta nueva variante. En su estructura primaria, PCNA-6 muestra la escisión de 67 aminoácidos, dando lugar a una proteína final de 194 aminoácidos. Esta isoforma pierde la NES-1 (marcada en verde).

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de PCNA-1, PCNA-2, PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6 se muestra en la Figura 25.



Figura 25. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de PCNA. PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6 cuentan con 206, 202 y 194 aminoácidos, respectivamente. Por su parte, PCNA-1 y PCNA-2 tienen una secuencia de 261 aminoácidos cada uno. La secuencia resaltada en verde corresponde a la NES-1, mientras que la secuencia en amarillo se trata de la NES-2.

Las secuencias de aminoácidos resultantes (PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6) fueron buscadas en la base de datos del PDB, en la cual no se hallaron estructuras proteicas con dichas secuencias. Esto sugiere que posiblemente podría tratarse de nuevas isoformas proteicas. Por consiguiente, decidimos ingresar las secuencias de aminoácidos al servidor Phyre2, para predecir su estructura terciaria mediante el método de homología remota y reconocimiento de plegamientos. Las estructuras proteicas resultantes de PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6 fueron comparadas con la estructura canónica de la proteína reportada (PCNA-1 y PCNA-2), haciendo uso del software VMD.

6.2.1. Diferencias estructurales entre PCNA-4 y PCNA-1/-2

La estructura terciaria de PCNA-4 muestra diferencias con respecto de la variante constitutiva (PCNA-1/PCNA-2). Estructuralmente PCNA-4 está constituida por el dominio A o N-terminal (residuos 1-66) y el dominio B o C-terminal (residuos 80-206), interconectados mediante una IDCL (residuos 67-79). Topológicamente, PCNA-4 cuenta

con 3 hélices- α y 14 láminas- β en comparación con PCNA constitutiva, la cual cuenta de 4 hélices- α y 18 láminas- β . PCNA-4 carece de la NES-2, sin embargo conserva la NES-1, crucial para el transporte del citoplasma al núcleo. Una característica peculiar es que PCNA-4 conserva sitios de unión a DNA: 4 lisinas (residuos 13, 14, 20 y 163) y 3 argininas (residuos 91, 94 y 155), en comparación con PCNA constitutiva que tiene 6 lisinas y 3 argininas. La estructura tridimensional de PCNA-4 comparada con PCNA constitutiva se muestra en la Figura 25.

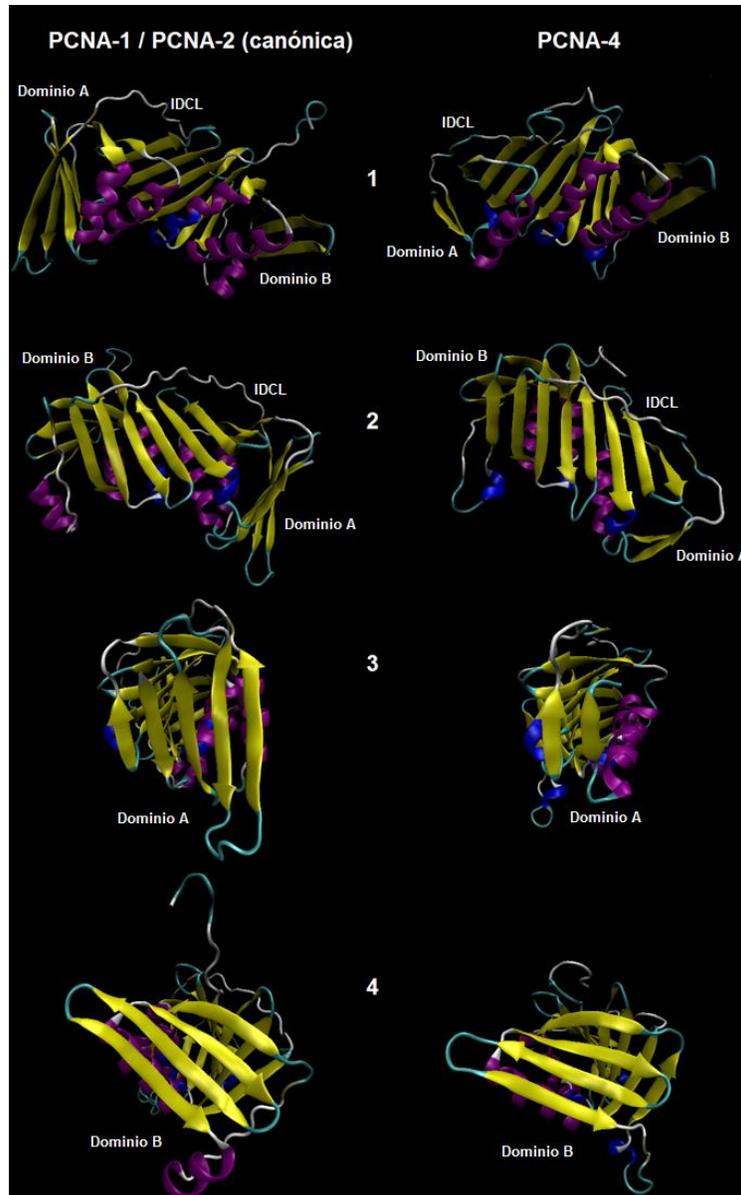


Figura 25. Comparación de estructuras terciarias de PCNA monomérica. Panel izquierdo corresponde a PCNA-1 / PCNA-2 (canónica); panel derecho corresponde a PCNA-4. 1. Vista frontal, cara superior; 2. Vista frontal, cara inferior; 3. Vista lateral, dominio A o N-terminal; 4. Vista lateral, dominio B o C-terminal.

6.2.2. Diferencias estructurales entre PCNA-5, PCNA-6 y PCNA-1/-2

La estructura terciaria de PCNA-5 y PCNA-6 muestran diferencias notorias con respecto de la variante constitutiva (PCNA-1/PCNA-2). Estructuralmente PCNA-5 está constituida por el dominio A o N-terminal (residuos 1-58) y el dominio B o C-terminal (residuos 76-202), interconectados mediante una IDCL (residuos 59-75). Topológicamente, PCNA-5 cuenta con 3 hélices- α y 12 láminas- β en comparación con PCNA constitutiva, la cual cuenta de 4 hélices- α y 18 láminas- β . PCNA-5 carece de la NES-2 y parcialmente de la NES-1. PCNA-5 conserva sitios de unión a DNA: 3 lisinas (residuos 18, 21 y 158) y 3 argininas (residuos 87, 90 y 151), en comparación con PCNA constitutiva que tiene 6 lisinas y 3 argininas. La estructura tridimensional de PCNA-5 comparada con PCNA constitutiva se muestra en la Figura 26.

Como mencionamos anteriormente, PCNA-6 se caracteriza por la pérdida de 263 pb que afectan a la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante, incluido el codón de inicio de la traducción. A pesar de la pérdida de dicho codón, es posible que la maquinaria traduccional pueda reconocer un codón de inicio alternativo en el mRNA de PCNA-6 y que de esta manera sea traducida. Por esta razón, decidimos realizar el modelado de la estructura terciaria de PCNA-6.

Al igual que PCNA-5, PCNA-6 muestra diferencias evidentes con respecto a la isoforma constitutiva. PCNA-6 está conforma por el dominio A o N-terminal (residuos 1-50) y el dominio B o C-terminal (residuos 68-194), interconectados mediante una IDCL (residuos 51-67). Topológicamente, PCNA-6 cuenta con 3 hélices- α y 12 láminas- β en comparación con PCNA constitutiva, la cual cuenta de 4 hélices- α y 18 láminas- β . PCNA-5 carece de la NES-1. PCNA-6 conserva sitios de unión a DNA: 3 lisinas (residuos 10, 13 y 150) y 3 argininas (residuos 79, 82 y 143), en comparación con PCNA constitutiva que tiene 6 lisinas y 3 argininas. La estructura tridimensional de PCNA-6 comparada con PCNA constitutiva se muestra en la Figura 26.

Dado lo anterior, nosotros podemos notar diferencias estructurales evidentes de las isoformas 5 y 6 con relación a la variante constitutiva y con PCNA-4. Sin embargo, PCNA-5 y PCNA-6 muestran una gran similitud estructural entre ambas, por ejemplo: la notable separación entre los dominios A y B de ambas variantes, y el mismo número de hélices- α

y láminas- β . Es importante recordar que la variante 5 solamente se presentó en las líneas celulares (K-562 y Jurkat) y la isoforma 6 en la muestra L-2 derivada de un paciente diagnosticado con LLA-B. Ambas variantes, a nivel de mRNA que muestran un procesamiento similar a PCNA-1, presentan un sitio donador de *splicing* 5' y 3' en el exón 2, respectivamente. Aunado al análisis *in silico*, que indica similitudes en la estructura proteica terciaria.

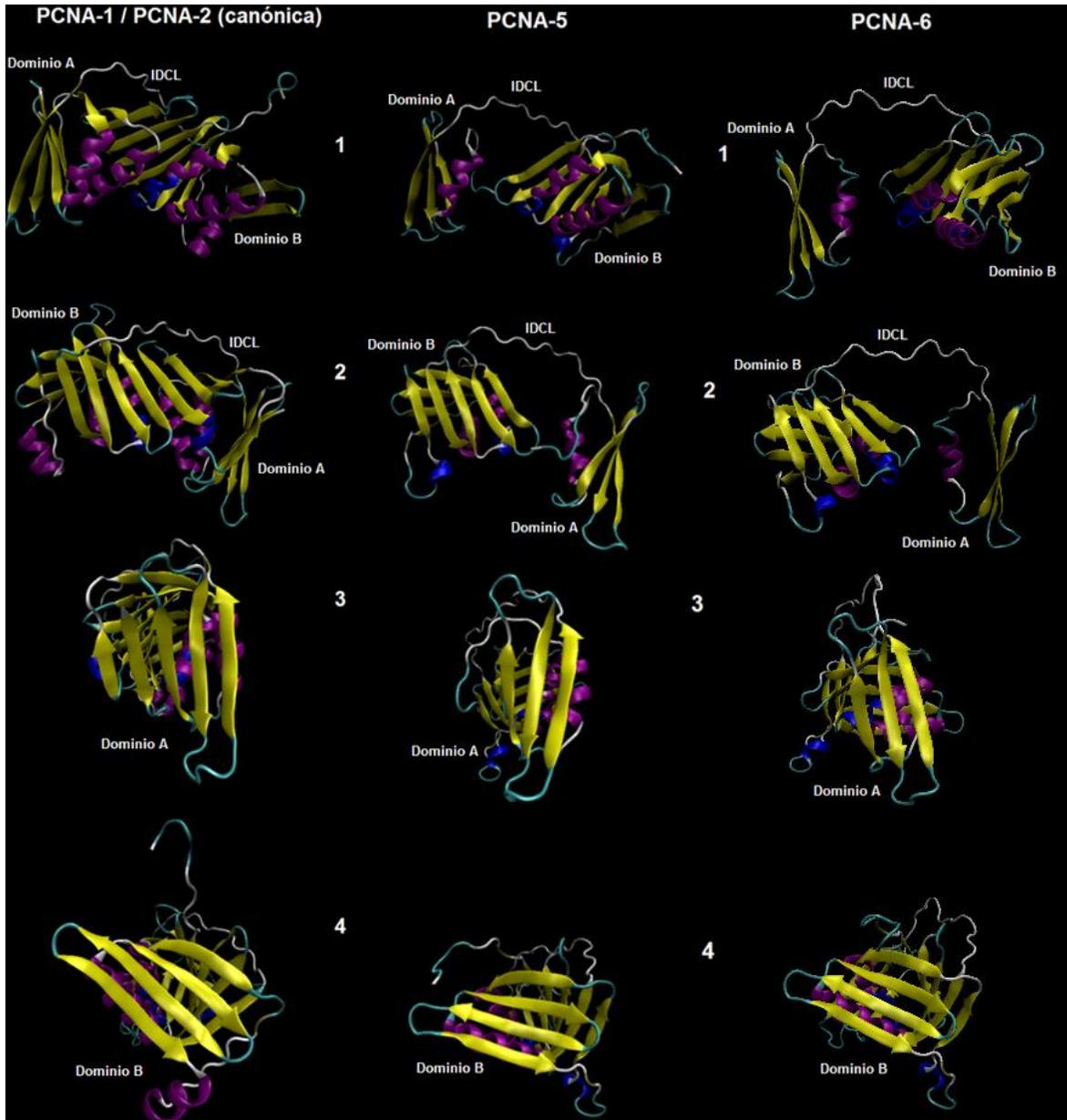


Figura 26. Comparación de estructuras de terciarias de PCNA monomérica. Panel izquierdo corresponde a PCNA-1 / PCNA-2 (canónica); panel central corresponde a PCNA-5; panel derecho corresponde a PCNA-6. 1. Vista frontal, cara superior; 2. Vista frontal, cara inferior; 3. Vista lateral, dominio A o N-terminal; 4. Vista lateral, dominio B o C-terminal.

7. DISCUSIÓN

La LLA es el tipo de neoplasia predominante en niños y adolescentes menores de 15 años, representando la segunda causa de muerte en esta población a nivel mundial (Harrison, 2013; Rose and Kuehl, 2014). Investigaciones sobre alteraciones genéticas y moleculares en neoplasias, han permitido reconocer algunas alteraciones producidas por SA, que podrían ser causa de una amplia variedad de enfermedades humanas, entre ellas el cáncer. Su papel ha sido bien documentado e incluye cambios en genes asociados con los procesos de progresión tumoral, tales como: migración celular, regulación de la proliferación y crecimiento celular, angiogénesis, evasión de la apoptosis, entre otros (Chen and Weiss, 2014).

Varios estudios han demostrado que PCNA, también conocida como la “guardiana de la replicación”, es una proteína que lleva a cabo funciones importantes en diversos procesos relacionados con el DNA. La desregulación en su expresión, se ha visto involucrada en la alteración de la proliferación celular y una fuerte asociación con la transformación celular en distintas neoplasias (Stoimenov and Helleday, 2009; Zölzer *et al.*, 2010; Wang, 2014). A pesar de la información que se tiene sobre PCNA en humano, en la actualidad no existen trabajos sobre PCNA desde el punto de vista del SA en la LLA. No obstante, algunos investigadores han trabajado el SA de genes relacionados con los procesos de leucemiogénesis; además, en el caso de la LLA se ha documentado la participación de isoformas generadas por SA de genes como *IKAROS*, *AID*, *BMF*, *SLP65*, *PYK2*, *BTK*, entre otros que están involucradas en la patogénesis de la misma (Jumaa *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Salesse *et al.*, 2004; Feldhahn *et al.*, 2011).

Nuestros resultados, también, revelaron la presencia de isoformas de mRNA generadas por SA en LLA: PCNA-4, PCNA-5 y PCNA-6.

Isoforma PCNA-4

Una de las nuevas variantes de mRNA de PCNA generadas por SA es PCNA-4, la cual se caracteriza por la escisión de los exones 2 y 3, con una pérdida de 166 pb. Distintos estudios han sugerido que mRNA alternativos generados a partir de un solo gen pueden llevar a cabo funciones biológicas importantes (por ejemplo, la proliferación, el desarrollo

celular, la apoptosis, entre otras) que en ocasiones pueden estar relacionadas con algunas enfermedades, entre ellas la LLA.

En 2010 Iacobucci y colaboradores demostraron, que en pacientes diagnosticados con LLA-B positiva para BCR-ABL1, tienen una expresión alterada de AID y la generación de cuatro isoformas distintas (AIDE4a, AID-E4, AIDins3 y AID-E3E4), las cuales muestran distinta localización subcelular (al tener alteraciones en la NES). Además, promueven el incremento de la inestabilidad genómica, por la desaminación de un amplio número de genes involucrados en los procesos de leucemiogénesis (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *GADD45*, *PAX5*, *BTG1*, *EBF1*, entre otros) (Iacobucci *et al.*, 2010). Por otra parte, en 2006 Klein y colaboradores demostraron que en células derivadas de la LLA-pre-B, hay expresión de IK6 una isoforma alternativa de IKAROS. Este estudio reportó que IK6 actúa como una dominante negativa al interferir con la identidad del linaje y al favorecer un arresto de diferenciación de los linfoblastos leucémicos en la fase pre-B (Klein *et al.*, 2006).

En 2004 Morales y colaboradores, también, señalaron la participación del SA en la leucemia, mediante la expresión de distintas isoformas de BMF. BMF pertenece a la familia de proteínas BCL-2, involucradas en la activación de la apoptosis. Identificaron dos nuevas isoformas de mRNA de BMF, BMF-II y BMF-III, en células leucémicas derivadas de LLC-B. Cada isoforma, a diferencia de BMF canónica, da lugar a una proteína distinta que carece del dominio proteico BH3 con funciones antiapoptóticas (Morales *et al.*, 2004).

En el caso de las isoformas de mRNA constitutivas de PCNA (1 y 2), éstas dan lugar a una proteína de 261 aminoácidos con la misma función (De Biasio and Blanco, 2013; Mailand *et al.*, 2013). Podemos suponer que cualquier cambio en el patrón de SA que modifique la secuencia codificante del mRNA podría dar lugar a isoformas proteicas alternativas de PCNA con variaciones estructurales y funcionales.

De acuerdo, con los análisis *in silico* donde comparamos la estructura proteica de PCNA-4 con las isoformas constitutivas; identificamos que PCNA-4 conserva la NES-1 (ILKKVLEALKDLI) y pierde la NES-2 (LDVEQLGI). En comparación con estudios estructurales y funcionales de PCNA humano, se ha determinado que únicamente la NES-1, es esencial para que ocurra el transporte de citoplasma al núcleo de PCNA monomérica (Bouyad *et al.*, 2012; Dieckman *et al.*, 2013). Con lo anterior, podemos

sugerir que PCNA-4 podría transportarse al núcleo celular dado que conserva su NES-1. A pesar de que PCNA-4 tiene una hélice- α y 4 láminas- β menos que la proteína canónica, resulta interesante destacar que la estructura proteica de PCNA-4 es muy similar a la isoforma constitutiva. Es decir, PCNA-4 presenta los dominios A y B contiguos e interconectados por un asa IDCL. Además, PCNA-4 conserva la mayoría de los sitios de unión a DNA conformados por 4 lisinas y 3 argininas en las hélices- α . Esto podría sugerir que PCNA-4 (al no presentar alteraciones de su NES-1, contar con la mayoría de los sitios de unión al DNA y una estructura parecida a la de las variantes constitutivas) estaría implicada en procesos similares a los de la variante canónica, por ejemplo: la replicación y reparación del daño al DNA. Es importante señalar que PCNA-4 se expresó en las líneas celulares, cinco pacientes diagnosticados con LLA-B y en seis muestras del grupo control. Esto podría sugerir que PCNA-4 no está asociada a la leucemia. Tal vez, esta nueva isoforma tenga una función biológica particular dado su expresión en la mayoría de las muestras. Por ello, estudios adicionales serán de gran ayuda para conocer la función de PCNA-4.

Isoformas PCNA-5 y PCNA-6

En el caso particular de PCNA-6, la cual se caracteriza por la pérdida de 263 pb que afectan a la región 5'UTR y el inicio de la secuencia codificante, incluido el codón de inicio de la traducción. Podemos tener tres posibles alternativas:

- a) Dado que la información perdida por SA afecta al codón de inicio de la traducción, es posible que PCNA-6 no sea traducida a proteína y que, posiblemente, dicho transcrito, sea degradado por el sistema de RNA de interferencia o por la vía *Nonsense-Mediated Decay* (NMD) crucial en la homeostasis de los mRNA, mediante la introducción de codones de paro prematuros en el transcrito (Kalsotra and Cooper, 2011; Hatano *et al.*, 2013).
- b) La información perdida por SA afecta a la región 5'UTR. La región 5'UTR de un mRNA contiene estructuras secundarias, múltiples marcos de lectura abiertos río arriba (uORF) y secuencias IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) que influyen en su tasa transcripcional. Además, dicha región porta numerosos sitios de unión para proteínas que reprimen o promueven la traducción en respuesta a la

retransmisión de múltiples señales moleculares. La alteración en la región 5'UTR de los mRNA se ha relacionado con variaciones aberrantes que afectan la regulación transcripcional, favoreciendo así cambios en la expresión de proteínas. Dichos cambios han sido asociados con la susceptibilidad y el desarrollo de varias enfermedades, entre ellas el cáncer (Reynolds, 2002; Pickering and Willis, 2005; Scheper *et al.*, 2007; Sangeeta and Pal, 2009). Por ejemplo, se ha sugerido que mutaciones en los uOFR del mRNA de TGF- β y BRCA1 están asociadas con la progresión del cáncer de mama (Signori *et al.*, 2001). Algunos estudios han señalado que mutaciones puntuales en las secuencias IRES de los mRNA, como el de MYC, incrementan su capacidad de unión hacia un gran número de proteínas; en particular a las hnRNP-K, resultando en un incremento de su eficiencia traduccional; esto ha sido asociado al mieloma múltiple (Stoneley *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que alteraciones de los uORF resultan en un decremento de la expresión proteica, como es el caso de CDKN2A, y esto ha sido asociado con la desregulación del ciclo celular y con la progresión de los melanomas (Liu *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta dichos estudios, podemos sugerir que PCNA-6 puede experimentar un incremento o un decremento de su eficiencia traduccional y contribuir con los procesos de leucemiogénesis.

- c) O bien, que a pesar de la pérdida del codón de inicio de la traducción, es posible que la maquinaria traduccional pueda reconocer un codón de inicio alternativo en la secuencia codificante del mRNA de PCNA-6 y que de esta manera dicho transcrito sea traducido a proteína.

En condiciones normales, PCNA monomérica canónica (después de haber sido traducida en el citoplasma) debe viajar al núcleo celular, donde será ensamblada como anillo trimérico, con ayuda del factor RFC, alrededor del DNA en los sitios de inicio de la replicación para llevar a cabo sus funciones. Estudios de localización subcelular en PCNA, han demostrado que mutaciones puntuales o la pérdida total de la NES-1 impiden el reconocimiento de la proteína por el complejo del poro nuclear. De esta manera, PCNA monomérica, con alteraciones en su NES-1, no ingresa al núcleo y queda retenida en el citoplasma (Bouyad *et al.*, 2012; De Biasio and Blanco, 2013; UniProt, 2014). Estos estudios apoyan nuestro análisis *in silico* de PCNA-5 y PCNA-6, donde identificamos que

tales isoformas muestran alteraciones en su NES-1 (una escisión parcial y total de dicha secuencia, respectivamente). Esto podría sugerir que tales variantes no ingresan al núcleo celular y por lo tanto no estarían implicadas en los procesos clásicos que lleva a cabo PCNA, tales como: la replicación y reparación del daño al DNA, el ensamblaje/remodelación de la cromatina y la cohesión de cromátidas hermanas. Algunos estudios han demostrado, que la generación de isoformas alternativas resulta en la producción de proteínas con funciones contrarias o distintas a las de las variantes constitutivas. Un claro ejemplo es el de las proteínas proapoptóticas BMF, que en células leucémicas derivadas de LLC-B generan las isoformas alternativas BMF-II y BMF-III, las cuales desempeñan funciones antiapoptóticas, favoreciendo así la progresión de la enfermedad (Morales *et al.*, 2004). Otros han señalado que la generación de isoformas alternativas, en LLA-pre-B, dan lugar a proteínas con funciones dominantes negativas que contribuyen al desarrollo y progresión de la leucemia (Klein *et al.*, 2006; Wang and Cooper, 2007; Chen and Weiss, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, posiblemente, PCNA-5 y PCNA-6 (presentes en las líneas celulares y en un paciente con LLA-B, respectivamente) desempeñen funciones distintas a las de las variantes constitutivas (1 y 2) que favorezcan los procesos de progresión de la LLA-B. Para tener un conocimiento preciso de la función de PCNA-5 y PCNA-6 serán necesarios estudios adicionales que nos ayuden a dilucidar el papel de dichas isoformas en la LLA-B.

Las isoformas 5 y 6, a nivel estructural, muestran diferencias con relación a la variante constitutiva y con PCNA-4. Sin embargo, PCNA-5 y PCNA-6 muestran una gran similitud estructural entre ambas, por ejemplo: la notable separación entre los dominios A y B, el mismo número de hélices- α y láminas- β y la misma cantidad de argininas y lisinas (3 cada una) en las hélices- α . Es importante recordar que la variante 5 solamente se presentó en las líneas celulares y la isoforma 6 en la muestra L-2 derivada de un paciente diagnosticado con LLA-B. Ambas variantes, siguen un procesamiento similar a PCNA-1, sin embargo, presentan un sitio donador de *splicing* 5' y 3' en el exón 2, respectivamente. Alteraciones en los elementos reguladores del *splicing* pueden influir en la decisión de cuáles exones serán removidos (Chen and Manley, 2009). Por nuestra parte, sugerimos que el exón 2 de dichos transcritos puede tener alteraciones en sus elementos reguladores (potenciadores exónicos) que favorezcan la escisión parcial de dicho exón. Además, el análisis *in silico* de PCNA-5 y PCNA-6 indica que hay grandes similitudes en su estructura proteica terciaria, a diferencia de la variante constitutiva. Dado que PCNA-5

y PCNA-6 solo se expresaron en las líneas celulares y en un paciente diagnosticado con LLA-B, respectivamente, es posible que dichas isoformas estén asociadas con la patología de la leucemia. Estas nuevas variantes generadas por SA, probablemente, sean el resultado de alteraciones adicionales que pudiesen ocurrir en el espliceosoma, en los elementos reguladores del SA y en la maquinaria traduccional en condición de leucemia.

8. CONCLUSIONES

1. Se identificó la expresión de tres variantes de PCNA con distinto patrón de SA: la variante 4 se expresó en la mayoría de las muestras, la variante 5 se presentó solamente en las líneas celulares y la variante 6 se expresó en un paciente diagnosticado con LLA-B.
2. De acuerdo al análisis *in silico*, las variantes de PCNA mostraron diferencias estructurales a nivel de proteína.

9. PERSPECTIVAS

- I. Realizar un estudio con un mayor número de muestras (controles y pacientes) en el cual se evalúe la expresión de PCNA y sus variantes en la LLA.

- II. Llevar a cabo estudios de caracterización funcional para PCNA-4.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A., Lichtman A. and Pillai S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6º edición. Elsevier Saunders. México. pp. 153-187.

Bhatla T., Jones C., Meyer J., Vitanza N., Raetz E. and Carrol W. (2014). The Biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 36(6), 413-418.

Bouyad D., Pederzoli M., Mocek J., Candalh C., Benolt J., Hermine O., Reuter N., Davezac N. and Witko V. (2012). Nuclear-to-cytoplasmic relocalization of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33812-33825.

Boyer L., Lee T., Johnstone S., Levine S., Zucker J., Guenther M., Kumar R., Murray H., Jenner R., Gifford D., Melton D., Jaenisch R. and Young R. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947-956.

Campos E., Toboso A., Romero I., Barajas M., Sánchez I. and Cobaleda C. (2011). Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: a crucial interrelationship. *Cell Cycle*, 10(20), 3473-3486.

Chen M. and Manley J. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature*, 10(November), 741-754.

Chen J., Olatoyosi O and Janet R. (2010). Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nature*, 10(January), 23-36.

- Chen L., Tovar J. and Urrutia A. (2012). Alternative splicing: a potential source of functional innovation in the eukaryotic genome. *International Journal of Evolutionary Biology*, 1-10.
- Chen J. and Weiss W. (2014). Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, January, 1-14.
- Choi B., Choi H., Ko K., Cho Y., Zhu F., Kang B., Ermakova S., Ma W., Bode A. and Dong Z. The tumor suppressor p16^{INK4a} prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(July), 699-707.
- Cooper S. and Brown P. (2015). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62, 61-73.
- De Biasio A. and Blanco F. (2013). Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: too many partners for one dancer? *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 91, 1-36.
- Dieckman L., Freundenthal B. and Washington T. (2013). PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. In: MacNeill (Ed.), *The eukaryotic replisome: a guide to protein structure* (pp. 281-299). USA: Subcellular Biochemistry.
- Feldhahn N., Klein F., Mooster J., Hadweh P., Sprangers M., Wartenberg M., Bekhite M., Hofman W., Herzog S., Jumaa H., Rowly J. and Müschen M. (2005). Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), 1837-1852.
- Feng Y., Valley M., Lazar J., Yang A., Bronson R., Firestein S., Coetzee W. and Manley J. (2009). SRp38 regulates alternative splicing and is required for Ca²⁺ handling in the embryonic heart. *Developmental Cell*, 16, 528-538.

- Fu X. and Ares M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature*, 15(October), 689-701.
- Gallegos M., Borjas C., Zúñiga G., Figueroa L., Puebla A. and García J. (2013). Pathophysiology of acute lymphoblastic leukemia. In: Mejía J. (Ed.), *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia, from the molecules to the clinic* (pp. 43-73). USA: InTech.
- GeneCards. Disponible en Internet <<http://www.genecards.org>> [Fecha de acceso: 13 de noviembre, 2014]
- Gramatges M. and Rabin K. (2013). The adolescent and young adult with cancer: state of the art, acute leukemias. *Current Oncology Reports*, 15, 317-324.
- Graux C. (2011). Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfusion and Apheresis Science*, 44(2), 183-189.
- Harrison C. (2011). Acute lymphoblastic leukemia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31, 631-647.
- Harrison C. (2013). Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *American Society of Hematology*, 2013(1), 118-125.
- Hatano M., Umemura M., Kimura N., Yamazaki T., Takeda H., Nakano H., Takahashi S. and Takahashi Y. (2013). The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress. *The FEBS Journal*, 280, 4693-4707.
- Iacobucci I., Lonetti A., Messa F., Cilloni D., Soverini S., Paoloni .F, Arruga ., Ottaviani E., Chiaretti S., Messina M., Vignetti M., Papayannidis C., Vitale A., Pane F., Piccaluga P., Paolini S., Berton G., Baruzzi A., Saglio G., Baccarani M., Foa R. and Martinelli. (2010). Different isoform of the B-cell mutator activation-induced cytidine deaminase are aberrantly expressed in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Nature*, 24(September), 66-73.

- Inaba H., Greaves M. and Mullighan C. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 381(June), 1943-1955.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2014. *Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de febrero), datos nacionales*, 1-11.
- Jan M. and Majeti R. (2013). Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Nature*, 32(February), 135-140.
- Juárez S., Zentella A., Villegas V., Alberto O., Salcedo M., López R., Román E., Lazos M., Montes de Oca E., Vázquez G. y Moreno J. (2013). Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 6(61), 1-10.
- Jumaa H., Bossaller L., Portugal K., Storch B., Lotz M. and Flemming A. (2003). Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 423, 452-456.
- Kalsotra A. and Cooper T. (2011). Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nature*, 12(October), 715-729.
- Kalsotra A., Xiao X., Ward A., Castle J., Johnson J., Burge C. and Cooper T. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing of heart. *PNAS*, 102, 2850-2855.
- Kelley L. and Sternberg M. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocol*, 4(3), 363-371.
- Keren H., Maor G. and Ast G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature*, 11(May), 345-355.
- Kim E., Goren A. and Ast G. (2007). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays*, 30, 38-47.

- Kind T., Gotdsby R and Osborne B (Eds.). (2007). *Inmunología de Kuby*. 6° edición. McGraw Hill. México. pp. 23-29.
- Klein F., Felhahn N., Herzog S., Sprangers M., Mooster J., Jumma H. and Müschen M. (2006). *Nature*, 25(October), 1118-1124.
- Kornblihtt A., Schor I., Alló M., Dujardin G., Petrillo E. and Muñoz M. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature*, February, 1-13.
- Labardini J., Cervera E., López O., Corrales C., Balbuena M., Barbosa A., Espinoza J., Medina C., Ojeda J., Ramírez A., Rivas S., Sánchez S., Siñani M., Zapata N., Hernández M. y Cortés J. (2011). Oncoguía: leucemia linfoblástica aguda. *Instituto Nacional de Cancerología*, 6, 111-115.
- Li Q., Lee J. and Black D. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature*, 8(November), 819-831.
- Liu L., Dilworth D., Gao L., Monzon J., Summers A., Lassam N. & Hogg D. (1999). Mutation of the CDKN2A 5'UTR creates an aberrant expression initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature Genetics*, 21, 128-132.
- Mahler M., Miyachi K., Peebles C. and Marvin F. (2012). The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Autoimmunity Reviews*, 11, 771-775.
- Mailand N., Seymour I. and Jensen S. (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nature*, 14(May), 269-282.
- Marshall G, Carter D, Cheung B, Liu T, Mateos M, Meyerowitz J and Weiss W. (2014). The prenatal origins of cancer. *Nature*, 14(April), 277-289.

- Matlin A., Clark F. and Smith C. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature*, 6(May), 386-398.
- Mejía J. (2013). Model for identifying the etiology of acute lymphoblastic leukemia in children. In: Mejía J. (Ed.), *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia, from the molecules to the clinic* (pp. 3-17). USA: InTech.
- Moore M., Wang Q., Kennedy C. and Silver P. (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 142, 625-636.
- Mullighan C. (2010). Genetic variation and the risk of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 34, 1269-1270.
- Morales A., Olsson A., Celsing F., Österborg A., Jondal M. and Osorio L. (2004). Expression and transcriptional regulation of functionally distinct Bmf isoforms in B-chronic lymphocytic leukemia cell. *Nature*, 18(October), 41-47.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponible en Internet <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> [Fecha de acceso: 10 de noviembre, 2014]
- Necsulea A. and Kaessmann H. (2014). Evolutionary dynamics of coding and non-coding transcriptomes. *Nature*, 15(November), 734-748.
- Nielsen T. and Graveley B. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463(January), 457-463.
- Nigro L. (2013). Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 35, 245-252.
- Pickering B. and Willis A. (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(February), 39-47.

Protein Data Bank. Disponible en Internet < <http://www.rcsb.org>> [Fecha de acceso: 4 de diciembre, 2014]

Pui C. and Evans W. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, 50(3), 185-196.

Pui C, Mullighan C, Evans W and Relling M. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 120(6), 1165-1174.

Raynolds P. (2002). In sickness and in the health: the importance of translational regulation. *Archives of Disease in Childhood*, 86(5), 322-324.

Ribera J. (2011). Advances in acute lymphoblastic leukemia in adults. *Current Opinion in Oncology*, 23, 692-699.

Rivera L. (2010). Generalidades del cáncer infantil. En: Rivera L. (Ed.), *Protocolos técnicos en cáncer en niños*. (pp.1-8). México: Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia.

Rivera L. (2010). Leucemia aguda linfoblástica de alto riesgo. En: Rivera L. (Ed.), *Protocolos técnicos en cáncer en niños*. (pp.31-43). México: Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia.

Rose H. and Kuehl D. (2014). Acute leukemia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32, 579-596.

Salesse S, Dylla S and Verfaillie C. (2004). p210 BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*, 18(14), 727-733.

Sangeeta C. and Pal J. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*, 101(5), 251-262.

- Scheper G., Van der Knaap M. and Proud C. (2007). Translation matters: protein synthesis defects in inherited disease. *Nature*, 8(9), 711-723.
- Schor I., Gómez L., Acuña G. and Kornhblitt A. (2013). Coupling between transcription and alternative splicing. In: Wu J. (Ed.), RNA and cancer, treatment and research (pp. 1-24). Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Schwerk C. and Schulze K. (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 19, 15-27.
- Signori E., Bagni C., Papa S., Primerano B., Rinaldi M., Amaldi F. and Fazio V. (2001). A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. *Oncogene*, 20(33), 4596-4600.
- Srinivasan S, Erkenez A and Hemenway C. (2003). The mixed lineage leukemia fusion partner AF9 binds specific isoforms of the BCL-6 corepressor. *Nature*, 22(December), 3395-3406.
- Stoimenov I. and Helleday T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions*, 37, 605-613.
- Stoneley M., Paulin F., Le Quesne J., Chappel S. & Willis A. (1998). c-myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, 16, 423-428.
- Teachey D. and Hunger S. (2013). Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 162(June), 606-620.
- Thiery J. and Sleeman J. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature*, 7, 131-142.
- UniProt. Disponible en Internet <<http://www.uniprot.org>> [Fecha de acceso: 13 de noviembre, 2014]

- Villegas V., Salcedo M., Zentella A., Montes de Oca E., Román E., Mantilla A., Dávila V. and Juárez S. (2014). A case of cervical cancer expressed three mRNA variant of Hyaluronan-mediated motility receptor. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(5), 2256-2264.
- Wang, S. (2014). PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Cell Press, Trends in Pharmacological Science*, 35(4), 178-186.
- Wang S. and Cooper T. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature*, 8(October), 749-761.
- Wang X. and Dai J. (2010). Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells*, 28, 885-893.
- Warzecha C., Jiang P., Amirikian K., Dittmar K., Lu H., Shen S., Guo W., Xing Y. and Carstens R. (2010). An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Journal*, 29, 3286-3300.
- Young H., Ry C. and Shin H. (2014). Advancements in the treatment of pediatric acute leukemia and brain tumor: continuous efforts for 100% cure. *The Korean Journal Pediatric Society*, 57(10), 434-439.
- Zhao Y, Huang H and Wei G. (2013). Novel agents and biomarkers for acute lymphoid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(40), 1-11.
- Zuckerman T. and Rowe J. (2014). Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F100 Prime Reports*, 6(59), 1-5.