



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Identificación de variantes de mRNA en pacientes
pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Daniel Rosas Pérez



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

VOCAL: Profesora: ARACELI MENDIETA RERGIS

SECRETARIO: Profesor: SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

2° SUPLENTE: Profesora: SILVIA KARINA GODINEZ PALMA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA. LABORATORIO DE ONCOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

ASESOR DEL TEMA:

SERGIO JUÁREZ MÉNDEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

VANESSA VILLEGAS RUÍZ

SUSTENTANTE:

DANIEL ROSAS PÉREZ

Contenido

MARCO TEÓRICO.....	4
Leucemia	4
Leucemia linfoblástica aguda	5
Clasificación de la LLA	5
Factores de riesgo asociados a LLA	7
Causas	8
Incidencia y Epidemiología	9
Diagnóstico.....	9
Tratamiento	11
Pronóstico.....	12
BIOLOGIA MOLECULAR Y CANCER.....	12
<i>Splicing</i>	14
<i>Splicing</i> alternativo	16
HMMR (Hyaluronan-Mediated Motility Receptor).....	17
CENPE (Centromere Protein E).....	20
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
Objetivos particulares	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Selección de muestras	24
Obtención de cDNA.....	25
Amplificación de los genes de interés por PCR de punto final.	26
RESULTADOS.....	30
ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA Y PÁGINAS CONSULTADAS (en orden alfabético).....	55
ANEXOS	58
ANEXO 1. BASE DE DATOS.....	59
ANEXO II. RESULTADOS PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	63

MARCO TEÓRICO

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial pues representa una de las primeras causas de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares. En la actualidad se conocen más de 100 tipos diferentes, los cuales se clasifican dependiendo de su origen y su capacidad de metástasis. Los principales son: carcinoma, sarcoma, del sistema nervioso central y neoplasias hematológicas (NCI, 2014).

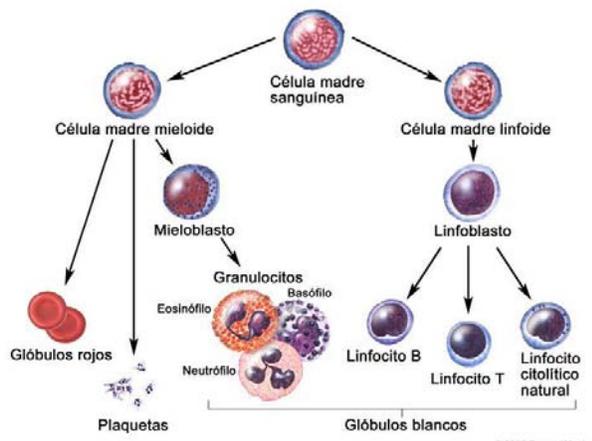


Figura 1. Diferenciación celular hematopoyética. Las células principalmente afectadas para la línea mieloide son los mieloblastos no maduros, mientras que para la linfoide se afectan principalmente el tipo T y B, siendo estas últimas las más comunes.

Existen dos tipos de neoplasias hematológicas, los linfomas y las leucemias. La principal diferencia entre estos, es que los linfomas se pueden considerar una neoplasia sólida pues afecta directamente a los ganglios, mientras que las leucemias se consideran tumores no sólidos pues afectan a las células que circulan a través del torrente sanguíneo.

Leucemia

Es un tipo de neoplasia hematológica que afecta a las células que se producen en la médula ósea, en donde se producen en exceso y no funcionan correctamente. Además adquieren características que las células normales no poseen permitiéndoles sobrevivir y acumularse en su lugar de origen. Con el paso del tiempo estas células entran en el torrente sanguíneo, se propagan y se infiltran en otros órganos (NCI, 2014).

Existen diversos tipos de leucemias dependiendo del tipo de línea celular hematopoyética afectada (figura 1) así como el grado de madurez de las células es decir, si se detectan células inmaduras se le llama leucemia aguda, mientras que si hay un grado de madurez se clasifica como crónica (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación general de las leucemias con base en el tipo de línea hematopoyética afectada y la madurez con la que se observan las células al momento de realizar el diagnóstico.

Línea celular afectada	Linfoide	Mieloide
Madurez de las células		
Aguda (células inmaduras)	Leucemia Linfoblástica Aguda	Leucemia Mieloide Aguda
Crónico (células con cierto grado de madurez)	Leucemia Linfoblástica Crónica	Leucemia Mieloide Crónica

Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia aguda linfoblástica (LLA) es una neoplasia que afecta a las células hematopoyéticas de la línea linfoide, produciendo linfocitos inmaduros en exceso y no funcionales por lo que, el organismo no es capaz de combatir las infecciones de manera adecuada. Esta neoplasia es la más común de las leucemias y principalmente afecta a personas en edad escolar y edad adulta (Belson, Kingsley, & Holmes, 2007).

En algunos casos, cuando se diagnostica por primera vez, se encuentran linfocitos neoplásicos tanto en la médula ósea como en los ganglios linfáticos y esto dificulta saber si se trata de leucemia o de linfoma. Es por lo anterior que, si más del 25% de la médula ósea contiene linfocitos neoplásicos, usualmente la enfermedad se considera leucemia. También es importante el tamaño de los ganglios linfáticos, pues ganglios de mayor tamaño del normal se relaciona con un linfoma.

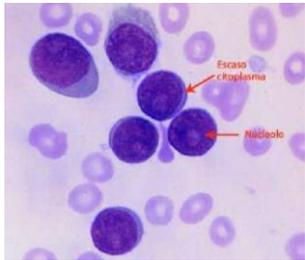
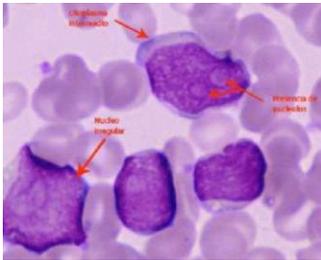
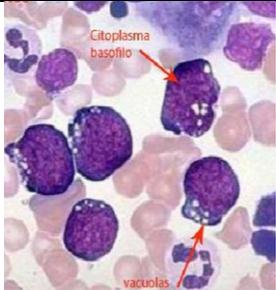
Clasificación de la LLA

Basada en la morfología de las células.

Algunos médicos usan la clasificación francesa-americana-británica (FAB) para dividir la LLA en tres grupos importantes con base en la morfología de las células en el microscopio (Hurtado Monroy, Solano Estrada, & Vargas Viveros, 2012).

- L1 -> Leucemia Aguda Linfoblástica típica
- L2 -> Leucemia Aguda Linfoblástica atípica
- L3 -> Leucemia similar al linfoma de Burkitt

Tabla 2. Clasificación de la leucemia linfoblástica con base en la maduración y apariencia de los linfoblastos al microscopio.

CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA	L1	L2	L3
TAMAÑO CELULAR	Pequeño	Grande	Grande
FORMA NUCLEAR	Regular, puede tener hendiduras o picaduras	Irregular, puede tener hendiduras o picaduras	Regular oval o redondo
NUCLEÓLO	Indistinguible	Uno o más por célula, grande, prominente	Regular oval a redondo
BASOFILIA CITOPASMÁTICA	Leve	Leve	Prominente
VACUOLAS CITOPASMÁTICAS	Ausentes	Ausentes	Presentes
IMAGEN AL MICROSCOPIO			

Basada en el inmunofenotipo

Las pruebas citogenéticas, la citometría de flujo y otras pruebas de laboratorio proporcionan información más detallada sobre el subtipo de LLA y el pronóstico del paciente (American Cancer Society, 2013). Estas pruebas ayudan a dividir la LLA en grupos (tabla 3) con base en el *inmunofenotipo* de la célula leucémica (Correa González, y otros, 2005)

Tabla 3. Principales Subtipos de LLA según el tipo de linfocito afectado y el nivel de madurez del mismo

Subtipo	Inmunofenotipo	Frecuencia
Células PreB tempranas	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24	60% - 65%
Células PreB	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC	20% - 25%
Células B maduras	HLA-DR, TDT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC, IgS	2% - 3%
Células T	CD1a, CD2, CD3, CD5, CD7	15% - 18%

Estudios recientes han relacionado diversas alteraciones biológicas con el aumento en la probabilidad de desarrollar Leucemia y en específico, de tipo T (figura 2a). Por ejemplo, se sabe que el virus Linfotrópico del Humano Tipo 1 (HTLV-1) es el agente etiológico de la

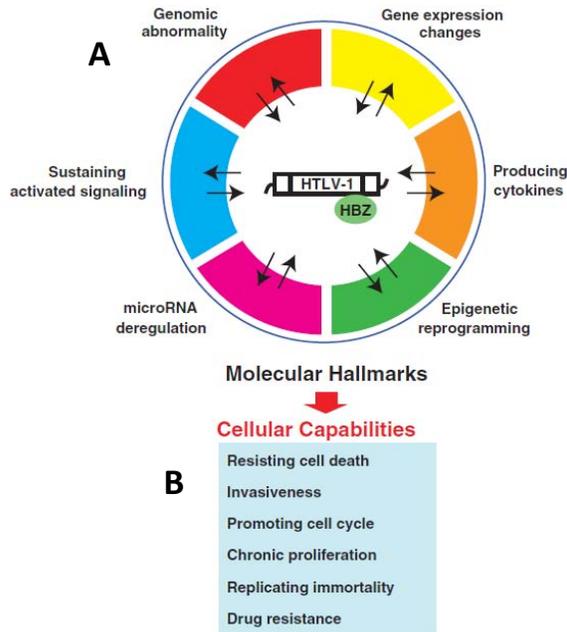


Figura 2. Marcadores de Leucemia de Tipo T. a) La interacción de las células con el HTLV-1 produce cambios en la expresión genética, anomalías genómicas, reprogramación epigenética, entre otros. b) Los cambios producidos permiten que la célula genere habilidades que las células normales no poseen como resistencia a la muerte celular, invasividad, proliferación crónica, etc. las cuales otorgan a la célula la característica neoplásica.

Leucemia de Células T, las cuales representan cerca del 10% en niños. Aquellos pacientes que son infectados con este virus, sufren el tipo de alteraciones antes mencionadas.

Como consecuencia de los cambios en la biología de la célula, ésta desarrolla capacidades que una célula normal no posee (figura 2b).

Factores de riesgo asociados a LLA

Un factor de riesgo es cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión (OMS). Actualmente se conocen pocos factores de riesgo directamente asociados a la LLA (Belson, Kingsley, & Holmes, 2007), algunos de los cuales se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Principales factores de riesgo asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda.

Factor de riesgo	Ejemplo
Exposición a la radiación	Tratamientos previos de otros tipos de cáncer con radioterapia aumentan el riesgo de desarrollar leucemia.
Infecciones virales	HTVL-1 (virus Linfotrópico del Humano Tipo 1) puede causar LLA de células T. La mayoría de los casos ocurren en Japón y el Caribe. EBV (Virus de Esptein-Barr) se relaciona con una forma de LLA en África. En E.U.A.

	es más frecuente que cause mononucleosis infecciosa
Síndromes hereditarios	Cambios genéticos pueden elevar el riesgo de LLA, por ejemplo: - S. Down - S. Klinefelter - S. Blomm - Anemia de Fanconi - Neurofibromatosis - A. telangiectasia
Factores ambientales	Se ha visto una mayor relación de pacientes de raza Hispana que en Caucásicos, mayor incidencia en niños que en niñas. Por otro lado bebés que han pesado más de 4kg al nacer tienen mayor riesgo de padecer LLA.

Si bien los factores ambientales aumentan ligeramente el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia, no se cuenta con suficiente evidencia científica que lo pruebe y aún son factores controversiales.

Causas

No se sabe la causa exacta de la mayoría de los casos de la leucemia infantil. En la actualidad se ha determinado que el riesgo de padecer este tipo de cáncer aumenta si se tiene algunas de las afecciones genéticas enlistadas en la tabla 4. Sin embargo cabe señalar que la mayoría de los niños con leucemia no tienen algún factor de riesgo relacionado.

Como se sabe, en muchos casos las neoplasias son originadas por mutaciones en el DNA que alteran directamente el ciclo celular, uno de estos cambios son las translocaciones. En la LLA se ha visto que el cambio del cromosoma 9 por el 22, conocido como *cromosoma filadelfia*, puede contribuir al desarrollo de este tipo de neoplasia. Por otro lado, una mutación en el gen supresor de tumores TP53, conocido como síndrome de *Li-Fraumeni*, también favorece el desarrollo de la leucemia.

Basados en los factores de riesgo antes mencionados, se han formulado hipótesis etiopatogénicas con suficiente rigor científico para explicar el origen de un reducido número de pacientes con LLA, pero actualmente las causas de la mayoría de los casos

son desconocidas (Slander & Ross, 1997). Existen dos grupos de investigación, Children's Cancer Group en EE.UU y United Kingdom Acute Leukemia en Gran Bretaña, los cuales se encuentran realizando dos extensos trabajos epidemiológicos con análisis moleculares que aportarán datos para un mejor conocimiento de los mecanismos etiológicos y poder desarrollar una prevención eficaz.

Incidencia y Epidemiología

De acuerdo a la OMS, la LLA es la neoplasia más común diagnosticada en pacientes menores de 15 años, a nivel mundial constituye la cuarta parte de las neoplasias en este grupo de edad y 76% de todas las leucemias. En la ciudad de México, una de las más altas a nivel nacional, representan alrededor de 40 % de las neoplasias (Fajardo, Juárez, González, Palma, Carreón, & Mejía, 2007). De acuerdo con el INEGI en 2008 representó la mayor tasa de mortalidad en México en niños de 0 a 14 años de edad (INEGI, 2011) con un tasa de 2,55 por cada 100,00 habitantes.

La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) reporta que entre 2008 y 2010, la LLA ocupó el tercer lugar en mortalidad en México de personas de 1 a 15 años, en un 6.98%, precedidas por accidentes en transporte terrestre así como malformaciones y enfermedades congénitas. En 2011, 59 de cada 100 personas menores de 20 años con neoplasias malignas las presentaron en órganos hematopoyéticos, siendo las leucemias agudas linfoblásticas las más representativas.

La LLA es más común entre la raza blanca que entre la afroamericana, aunque no son claras las razones. Aunado a esto, se ha visto que la LLA es ligeramente más común entre los hombres que entre las mujeres; se desconoce la razón de esto (Fajardo, Juárez, González, Palma, Carreón, & Mejía, 2007).



Figura 3. Síntomas asociados a la Leucemia Linfoblástica Aguda.

Diagnóstico

Los primeros síntomas que presenta un paciente son cansancio, piel pálida, infecciones recurrentes, fiebre, hematomas, dolor de hueso o articulaciones, pérdida de apetito y

peso, ganglios linfáticos inflamados, dolor de cabeza, entre otros (figura 3). Por si solos, estos síntomas se pueden atribuir a diversas causas sin embargo, en conjunto pueden ser un gran indicativo del desarrollo de LLA. Por lo anterior, el primer abordaje que se toma para diagnosticar a un paciente con LLA es un examen físico en el que se evalúan diversos parámetros. Dado que este examen es muy general, posteriormente se pueden realizar pruebas de diagnóstico algunas de las cuales se describen en la tabla 5 (Ortega Sánchez, Osnaya Ortega, & Rosas Barrientos, Leucemia Linfoblástica Aguda, 2007).

Tabla 5. Pruebas para el diagnóstico de LLA

Prueba	Descripción
Biometría Hemática Completa	Conteo de glóbulos (rojos y blancos) y plaquetas.
Frotis de sangre	Observación de la apariencia de las células.
Química sanguínea	Apoya el diagnóstico. Un incremento en la LDH implica desarrollo de masa tumoral, ayuda a detectar uremia, hiperuricemia, causados por la propagación de las células leucémicas o el tratamiento.
Microscopia de médula ósea	Se observa el tamaño, forma y grado madurez de los glóbulos blancos.
Citoquímica	Se hace una tinción con colorantes que reaccionan con moléculas en las células. Se puede diferenciar LLA de LMA.
Inmunohistoquímica	Se basa en la reacción Ag – Ac para la detección de proteínas o receptores en las células y determinar el inmunofenotipo de las células.
Citogenética	Se observan los cromosomas para detectar translocaciones, deleciones o aneuploidias.

Tratamiento

Las opciones de tratamiento de cada paciente se basan en el subtipo de leucemia y en ciertas características del diagnóstico (Larson, 2011). Los principales tipos son enlistados en la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos de primera elección para pacientes con LLA

Tratamiento	Descripción
Quimioterapia	<p>Administración de medicamentos que destruyen o impiden la multiplicación de las células neoplásicas antes de que generen resistencia. Se inicia con la administración de fármacos esteroides para disminuir la cantidad de células inmaduras en el cuerpo, conocido como Ventana de esteroides. Si el paciente responde se inicia la quimioterapia, la cual está dividida en 3 etapas:</p> <p>Inducción a la remisión. Eliminación de toda célula leucémica detectable (<5% de blastos en MO).</p> <p>Consolidación. Terapia adicional con dosis altas de fármacos con la finalidad de eliminar toda célula leucémica no detectable en la fase anterior y evitar su propagación.</p> <p>Mantenimiento. Evita el crecimiento de nuevas células neoplásicas en MO</p> <p>Remisión completa. Es cuando el paciente se declara sano.</p>
Radioterapia	<p>Utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir las células leucémicas o impedir que crezcan</p>
Trasplante de médula ósea	<p>Se extraen células madre de un donante y se inyectan en el paciente una vez que ha finalizado la quimioterapia para restituir aquellas células que pudieron haber muerto durante el tratamiento.</p> <p>Los niños con enfermedad resistente al tratamiento o en recaída posiblemente sean candidatos para un trasplante con un donante compatible emparentado o no.</p>
Enfermedad residual mínima (MDR)	<p>Este enfoque de tratamiento puede usarse si las células de leucemia (presentes en pequeñas cantidades) tienen una anomalía molecular detectable. También puede permitir un seguimiento más sensible de los pacientes en remisión y puede ayudar a determinar si es necesario administrar un tratamiento adicional.</p>

Pronóstico

La mayoría de los pacientes logran una remisión completa si son tratados a tiempo y con el esquema de tratamiento adecuado sin embargo, se sabe que existe un porcentaje el cual no responde adecuadamente al tratamiento y fallece o sufre al menos una recaída (presencia de >5% de blastos en MO) durante o después del tratamiento, lo que implica que debe ser sometido a tratamiento de nuevo y a veces estos deben ser más agresivos.

Anteriormente el diagnóstico, tratamiento y pronóstico se basaba en técnicas que en ocasiones no aportaban al médico las suficientes herramientas para tratar a los pacientes, hoy en día se utilizan técnicas más específicas en el diagnóstico de la LLA. Estas técnicas se han perfeccionado gracias al avance que se ha tenido en la biología molecular y se espera, ayuden a disminuir la mortalidad e incluso, prevenir se desarrolle este tipo de neoplasia en niños sanos.

BIOLOGIA MOLECULAR Y CANCER

Como ya se mencionó anteriormente, la OMS define al cáncer como “un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo”. Sin embargo, lo que mayoritariamente no se sabe es que el cáncer podría también definirse como una enfermedad del DNA, y como producto del daño en el DNA se afecta la proliferación celular con todas las consecuencias frecuentemente conocidas.

Como se sabe, el DNA es el responsable de transmitir la herencia, y es la molécula que contiene todas aquellas instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los seres vivos. Sin embargo, poco se sabe de las alteraciones que puede sufrir el DNA, de sus repercusiones, o de los mecanismos que utiliza el organismo para defenderse o reparar los daños a los que habitualmente una persona está expuesta (Encina, 2013).

Los procesos mediante los cuales las células se transforman progresivamente en malignas, son causadas por daños en el genoma producidos por errores endógenos en el DNA, la inestabilidad intrínseca de las bases que forman al DNA, y la interacción con radicales libres generados durante el metabolismo. Por otro lado, el daño al DNA puede producirse también por factores exógenos como radiaciones ionizantes y UV así como químicos carcinogénicos (Bertram, 2000).

Entendiendo los tipos de alteraciones y/o daños que puede sufrir el DNA es posible comprender el proceso de carcinogénesis desde un punto de vista molecular, pero a la vez amplio. Esto es posible gracias a las técnicas de biología molecular que permiten un mejor entendimiento de cómo funciona y se constituye el DNA.

Gracias a los avances científicos que se han generado con la biología molecular, se sabe que la unidad funcional del DNA conocida como “gen”, se define como un segmento de DNA que codifica para cualquier molécula con actividad biológica (proteínas, tRNA, miRNA o RNA regulador, etc.) (Gerstein, Bruce, & Rozowsky, 2007).

Funcionalmente los genes se encuentran divididos en dos regiones:

1.- Región promotora. Es la parte principal del gen que regula la expresión del mismo, se encuentra localizada “río arriba” de la región codificante. Su función es regular la expresión o supresión de un gen.

2.- Región codificante. Contiene la información necesaria para codificar el producto con actividad biológica. Constituido por los exones y los intrones, donde los primeros contienen toda la información genética que será utilizada para la formación de la proteína.

Es de suma importancia que la información contenida en DNA se traduzca de manera adecuada, ya que se sabe que el correcto funcionamiento de una célula depende de la expresión de numerosos RNA's que codifican para diversas proteínas (mRNA) así como RNA's no codificantes (figura 4), y que desempeñan funciones cruciales en la célula (Morceau, Chateauvieux, Gaigneaux, Dicato, & Diederich, 2013). Estos RNA's participan en la transcripción, el procesamiento de RNA (snRNAs, snoRNAs) y traducción de DNA a RNA (rRNAs, tRNAs, miRNAs). Así como muchos otros RNAs los cuales no conoce del todo su función o aún no ha sido descrita (Cooper, Wan, & Dreyfuss, 2009).

Uno de los tipos de RNA más estudiados es el mRNA, pues su función en la célula es de vital importancia para la codificación de un sinnúmero de proteínas. En caso de presentarse una alteración durante el proceso de maduración del mRNA la célula se ve afectada ya sea de manera positiva o de forma negativa. Esto es debido a que en varias ocasiones las alteraciones en el mRNA provocan que no se codifique alguna proteína, producen proteínas no funcionales o como sucede en la mayoría de los casos, a partir de un solo gen se produce más de una proteína funcional y con un papel importante en los procesos biológicos (Faustino & Cooper, 2003). Es por esto que es de suma importancia que la

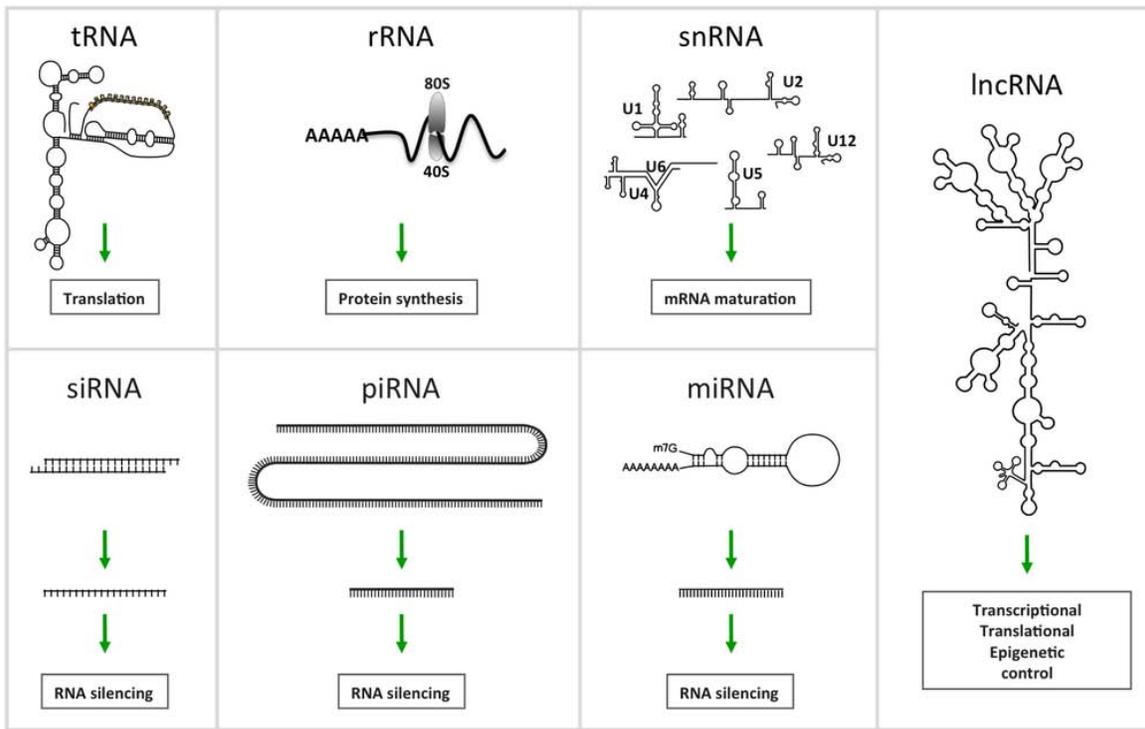


Figura 4. Tipos de RNA no codificantes presentes en la célula. Existen diversos tipos de RNA los cuales no codifican para proteínas sin embargo, su presencia en la célula es de vital importancia para procesos como la traducción DNA-RNA, maduración de mRNA, control epigenético, etc.

maduración del RNA se realice de manera adecuada mediante la remoción de los intrones a través del proceso conocido como *splicing*

Splicing

La cantidad de genes presentes en el cuerpo humano es relativamente pequeña comparada con la extensa variedad de secuencias codificantes que se obtienen durante la transcripción de DNA a RNA (Venter, y otros, 2001), a partir de las cuales se generan las proteínas. Hoy en día y con ayuda de biología molecular se sabe que uno de los procesos involucrados en la obtención de los fragmentos que contienen únicamente las secuencias codificantes, es el *splicing*.

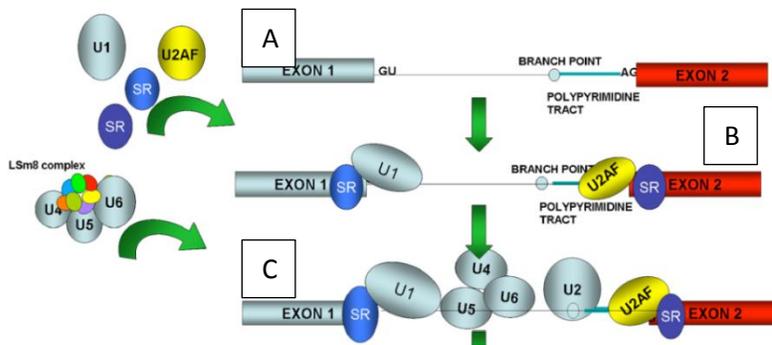


Figura 5. Formación del Spliceosoma. A. El intrón a ser removido contiene en su extremo 5' un dinucleótido GU cercano al exón. En el extremo 3' contiene un dinucleótido AG y un sitio *Branch*. B. La ribonucleoproteína U1 se une en el extremo 5' del intrón a remover, mientras que en el extremo 3' el factor U2AF es quien se une a la secuencia AG. C. El resto del complejo ribonucleoprotéico se une completando la formación del *spliceosoma*

En la transcripción la información genética pasa del ADN al ARN y se produce un ARN inmaduro (pre-RNA) que contiene una copia exacta del gen, con exones e intrones. Los intrones son removidos de la cadena de pre-RNA, mediante un proceso de corte y empalme conocido como *splicing*, uniendo los exones que serán utilizados en el proceso de maduración del RNA (Black, 2003), y es aquí cuando la cadena sale del núcleo celular para continuar con el proceso de transcripción.

A pesar de ser removidos, los intrones no son secuencias basura, ya que en ellos se encuentran las secuencias que funcionan como sitio de reconocimiento para la maquinaria encargada de realizar el *splicing* y de igual forma mantener el marco de lectura abierto (ORF) y las regiones no traducidas (UTR's).

El *splicing* en el premRNA está regulado en parte por el *spliceosoma* (figura 5), un complejo macromolecular de cinco ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs), U1, U2, U4, U5 y U6, conocido como *Spliceosoma* (Watson & Watson, 2010). El sitio en el cual se une cada una de estas RNPs es específico y el proceso de corte y empalme se completa una vez que cada una de ellas se encuentra unida a la secuencia correcta dentro del intrón (Srebrow & Kornblihtt, 2006). La principal función de las snRNPs es permitir que las cadenas de nucleótidos adopten la orientación necesaria para que se puedan llevar a cabo las reacciones de transesterificación (Clancy, 2008).

Químicamente el *splicing* se lleva a cabo a través de dos reacciones de transesterificación (figura 6), en las que intervienen los grupos hidroxilo (OH^-) y fosfato (PO_4^{3-}) presentes en los exones que se unirán para formar el mRNA (Black, 2003). Para que estas reacciones ocurran es necesario que las RNP favorezcan la interacción entre estos grupos. Es por esto que es de vital importancia que los sitios de *splicing* sean bien reconocidos en los

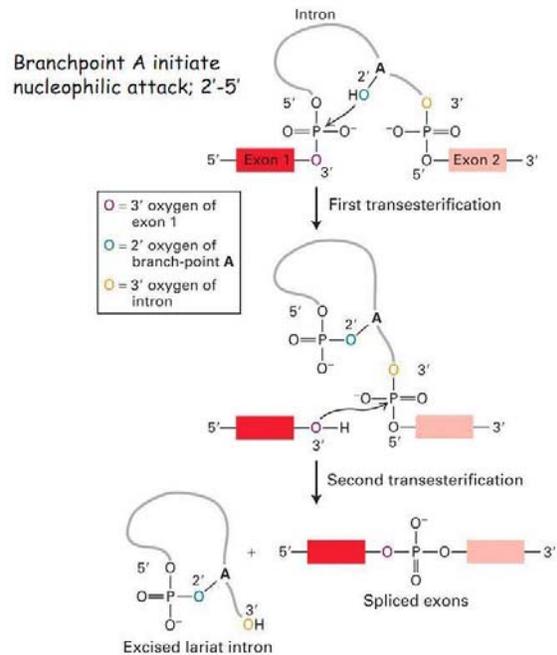


Figura 6. Reacciones de transesterificación en el *splicing*. En la primera reacción el grupo OH de la adenina en el sitio Branch ataca al fosfato en el extremo 5' del exón produciendo un grupo OH libre. Es en la segunda reacción cuando el OH libre del exón 5' ataca al fosfato en el exón 3' produciendo una horquilla con el intrón que será removido, posterior a esto los exones en extremo 5' y 3' se unen entre sí formando el mRNA maduro.

intrones y exones, y se evite que la escisión se dé en algún sitio diferente al que debería o que no pertenezca al exón si no a la secuencia que forma parte del intrón (Lodish, y otros, 2008),

Sin embargo en ocasiones las proteínas encargadas del reconocimiento de los sitios de *splicing* pueden unirse en una parte de la cadena diferente a la que debería unirse en condiciones normales, esto origina que se produzca un mRNA maduro distinto y el cual puede o no tener suficiente información para codificar alguna proteína, este proceso se conoce como *splicing* alternativo.

***Splicing* alternativo**

El *splicing* alternativo (SA) es un mecanismo crucial para generar la gran diversidad de proteínas, a través de este proceso un solo gen magnifica la capacidad codificante expresando una gran diversidad de proteínas (Black, 2003). Las variantes de una misma proteína pueden realizar funciones biológicas diferentes e incluso antagonistas o en su defecto, se genera una secuencia no codificante como producto del SA.

Este proceso conduce a cambios específicos de las células o los tejidos en el mRNA de un solo gen, a través de cambios en el sitio de *splicing* elegido; pareciera ser más una regla que una excepción, pues se estima que alrededor del 80% de los genes pueden atravesar por este proceso de SA (Faustino & Cooper, 2003). Se ha observado que existen diversos tipos de cáncer como el de mama, ovario y leucemia, en los cuales procesos de SA contribuyen al desarrollo de la enfermedad al modificar la secuencia de las proteínas que intervienen directamente en el ciclo celular, motilidad y otros procesos implicados en la carcinogénesis (Pajares, Ezponda, Catena, Calvo, Pio, & Montuenga, 2007).

Uno de estos mecanismos se debe a que las mutaciones pueden ocurrir en las secuencias de genes que afectan a la unión de factores de *splicing*, en el potenciador o el inhibidor de secuencias. Cambios en la expresión o mutaciones en los componentes del *spliceosoma* también dan lugar a cambios en el patrón de *splicing* de muchos genes relacionados con el cáncer (Srebrow & Kornblihtt, 2006). Se ha estimado que el 15% de las mutaciones puntuales que causan enfermedades genéticas humanas, afectan el *splicing* y hoy en día se conocen al menos 7 tipos de SA dependiendo de la posición donde se haga el corte (figura 7).

Este proceso se ha visto asociado por ejemplo, con cáncer de próstata, hígado, leucemia mieloblástica, cáncer gástrico y de mama. Existen diversos genes que sufren procesos de *splicing* alternativo, los cuales promueven la actividad proliferativa, de resistencia a fármacos e incluso actividad metastásica (Cooper, Wan, & Dreyfuss, 2009), algunos ejemplos de estos genes son p53, CD44, KIT (Srebrow & Kornblihtt, 2006), BRCA, CENPE (Kops, Weaver, & Cleveland, 2005), HMMR (Ishigami, y otros, 2011); estos últimos dos se consideraron para este proyecto de tesis como resultado de un estudio previo que se realizó en el laboratorio de Oncología Experimental y los cuales se describirán a continuación.

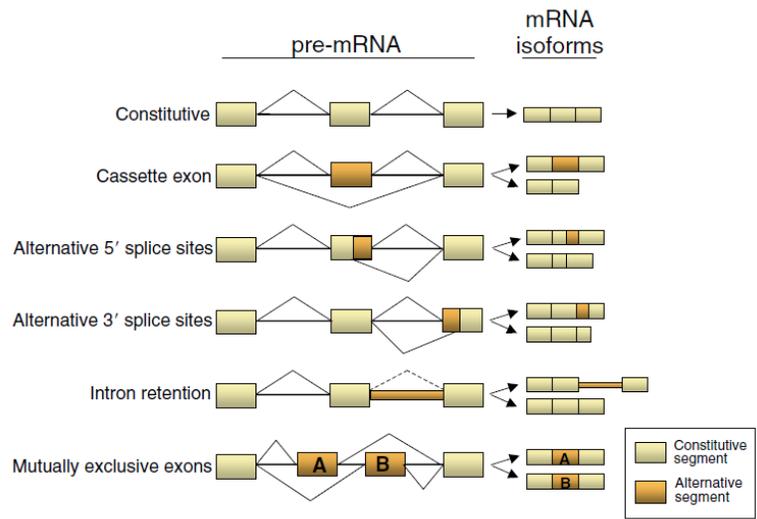


Figura 7. Tipos de *Splicing* Alternativo. **Constitutivo:** todos los exones son incluidos completos en el mRNA maduro, debido a esto únicamente se obtiene una isoforma. **Cassette exón:** se obtienen dos isoformas de mRNA debido a que un exón es completamente removido en una de ellas mientras la segunda lo conserva en la cadena de mRNA maduro. **Sitio de *splicing* 5' alternativo:** la maquinaria de snRNP's reconoce al menos dos sitios diferentes en el extremo 5' obteniendo dos isoformas, una de las cuales contiene sólo un fragmento del exón río abajo. **Sitio de *splicing* 3' alternativo:** en este caso se reconoce un sitio diferente en el extremo 3' produciendo además de la isoforma normal una que contiene sólo un fragmento del exón río arriba. **Retención del intrón:** el intrón que debería ser removido se incluye en el mRNA maduro como si se tratara de un exón más. **Exones mutuamente excluyentes:** el mRNA resultante contiene sólo uno de dos exones es decir. uno de los dos se pierde durante el proceso de

HMMR (Hyaluronan-Mediated Motility Receptor)

Localizado en el brazo corto del cromosoma 5, en la posición 34. Mediante informática se determinan 8 variantes producidas por SA para este gen (figura 8), de las cuales sólo 4 de ellas están descritas y se sabe, son codificantes para proteínas, sin embargo el papel que juegan éstas en la célula, aún no es del todo claro.

Las proteínas codificadas por este gen tienen alrededor de 725, 724, 709 y 638aa respectivamente. Por otro lado, se ha reportado diferentes sitios de localización para 3 de las proteínas codificadas, siendo éstos en la membrana celular, en citoplasma y en la membrana nuclear (figura 8).

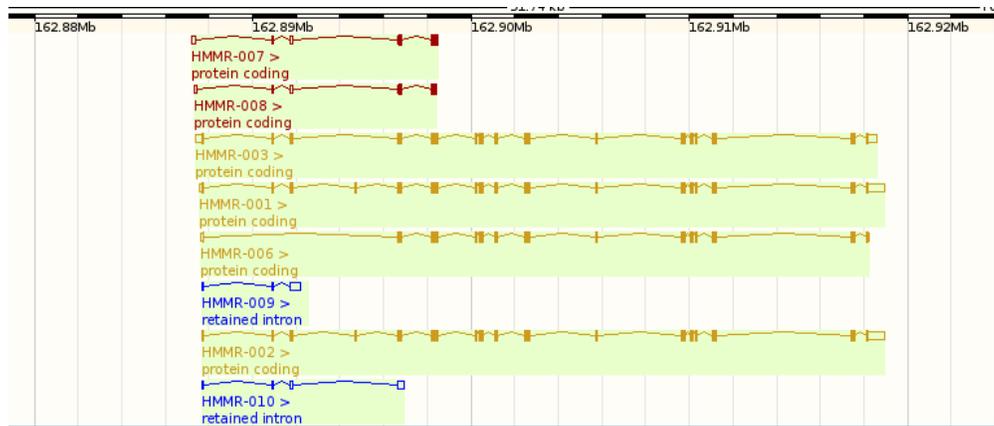


Figura 8. Variantes de HMMR descritas por Bioinformática. Se han descrito 8 variantes para el gen de HMMR, de las cuales únicamente 4 de ellas se conocen codifican para proteínas. Los productos de *splicing* alternativo en este gen varían de unos cuantos nucleótidos a todo un exón escindido.

HMMR se ha visto implicado en la migración, transformación y metástasis de fibroblastos (Assmann, Jenkinson, Marshall, & Hart, 1999). Cuando el hialuronato (HA) se une a HMMR, ocurre la fosforilación de numerosas proteínas incluyendo PTK2/FAK1. Puede estar involucrado en la transformación celular y metástasis regulando la actividad de cinasas extracelulares. Extracelularmente, se asocia HMMR con CD44, y tras la unión a HA, activa vías de señalización intracelular en las cuales se ve implicado el gen Ras y a su vez, se activan efectores de transcripción (figura 9).

Las funciones de hialuronato *in vivo* son extremadamente heterogéneas, incluyendo la regulación de la reparación de tejidos, tales como la activación de células inflamatorias con el fin de inducir una respuesta inmune, así como las respuestas específicas de las células epiteliales y fibroblastos a la lesión.

Es importante destacar que las numerosas funciones biológicas del hialuronato son de tamaño dependiente es decir, depende de la variante a la que se une, la función que desempeña. La variante de mayor tamaño molecular está presente en tejidos intactos y es antiangiogénico, así como inmunosupresor, mientras que la de menor tamaño molecular, se ha propuesto para actuar como una señal endógena para la activación de células T y tiene la capacidad de inducir los procesos de inflamación y angiogénesis (Nikitovic, Kouvidi, Karamanos, & Tzanakakis, 2013). Por otro lado, el Hialuronato exógeno puede inhibir la progresión celular, probablemente en competición con el HA endógeno (Necas, Bartosikova, Brauner, & Kolar, 2008)

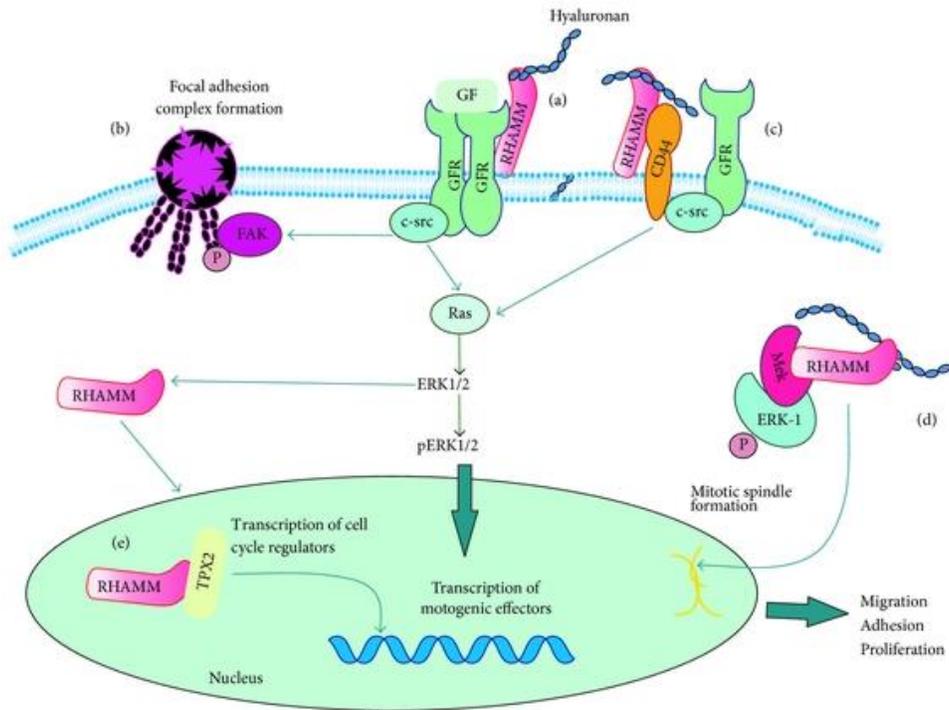


Figura 9. Impacto biológico de las variantes de HMMR en las células (fibrosarcomas). **a)** Cascada de señalización desencadenada por la unión del HA-HMMR extracelular, produce la unión HMMR-GFR/GFR favoreciendo la interacción GFR-c-src activando Ras induciendo proliferación celular. **b)** la activación de c-src induce la unión de FAK con un complejo que produce la adhesión celular y a su vez, aumenta el tamaño del tumor. **c)** La interacción HMMR-CD44/GFR produce un efecto similar a la interacción HMMR-GFR/GFR favoreciendo a su vez la actividad de ERK1/2 y su consecuente fosforilación que activa efectores de la transcripción. **d)** La proteína localizada intracelularmente reconoce al HA y forma un complejo proteico HMMR-McK-pERK1 favoreciendo la formación del huso mitótico y a su vez, la proliferación celular. **e)** La unión HMMR-TPX2 dentro del núcleo forma un complejo proteico que funciona como regulador del ciclo celular, aumentando la actividad proliferativa de la célula.

Las interacciones de la variante 1, presente en la membrana celular, con los receptores del factor de crecimiento (TGF) modulan la transcripción de efectores con actividad mitogénica (figura 9a) pero esta interacción depende de la formación del complejo c-src/ERK1, 2; y las interacciones HMMR/TFG mediante la señalización de c-src inducen la fosforilación de FAK y la formación del complejo de adhesión focal (figura 9b). Por otro lado, estas interacciones en membrana celular de HMMR con CD44 y TFG dependientes de la interacción c-src/ras/ERK1, 2 modulan la transcripción de efectores mitogénicos para regular la motilidad del fibrosarcoma (figura 9c). La variante citoplasmática de HMMR a través del complejo HMMR/MEK/ERK1, 2 regula la formación del huso mitótico que

afecta el crecimiento celular (imagen 9d). La variante nuclear de HMMR activado forma complejos con elementos característicos para la transcripción, por ejemplo, TPX2 para regular la expresión de mediadores del ciclo celular (imagen 8e) y en un tumor se produzcan más células de lo normal.

Se ha demostrado mediante inmunohistoquímica de células tumorales gástricas que existe una co-relación positiva entre la expresión de HMMR y la agresividad del cáncer colorectal (Ishigami, y otros, 2011). Por otro lado, se ha visto que existe una variante tumor-específica en células de astrocitoma (Zhou, Wu, & Skalli, 2002). Este estudio demostró que la variante intracelular es capaz de unirse a los microtúbulos en células normales y de astrocitoma, y ésta unión podría favorecer el desarrollo de la neoplasia es decir, las células tendrían capacidad migratoria.

Estudios recientes indican que la variante 1 de HMMR se expresa en tejido de cáncer de mama y junto a otras proteínas forma un complejo con BRCA1 y BRCA2, el cual está asociado con un alto riesgo de cáncer de mama y su malignidad.

Existen diversos reportes que relacionan a HMMR, junto a otro conjunto de genes, como antígeno asociado a leucemia mieloblástica aguda. Jochen Greiner y su equipo de investigación encontraron expresión de mRNA de HMMR en pacientes con LAM a diferencia de individuos sanos. Fuertes niveles de expresión fueron encontrados solamente en testículos, placeta y timo.

Por lo tanto, terapias inmunológicas dirigidas a HMMR podrían no solo apuntar a un antígeno inmunogénico sino también, a un gen críticamente implicado en el ciclo celular, diferenciación y proliferación celular.

CENPE (Centromere Protein E)

Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 4, en la posición 24-25. Su tamaño es de aproximadamente 92,604bases. Existen reportes de 2 variantes posibles de este gen producidas por *splicing* alternativo de 2701 y 2580 aa respectivamente. Una de proteínas codificadas por este gen pesa aproximadamente 312kDA; es una proteína motora tipo quinesina que se acumula en la fase G2 del ciclo celular. A diferencia de otras proteínas asociadas a centrómeros, no está presente durante la interfase y aparece por primera vez en la región del centrómero de los cromosomas durante la prometafase. Se

propone a CENPE para ser uno de los motores responsables del movimiento de cromosomas de mamíferos y/o alargamiento del huso mitótico.

CENPE se ha visto implicado en el checkpoint mitótico (figura 10) el cual funciona como regulador del ciclo celular en el cual, si los cinetocoros no se encuentran unidos a los microtúbulos, el ciclo celular se detiene y la célula no puede dividirse.

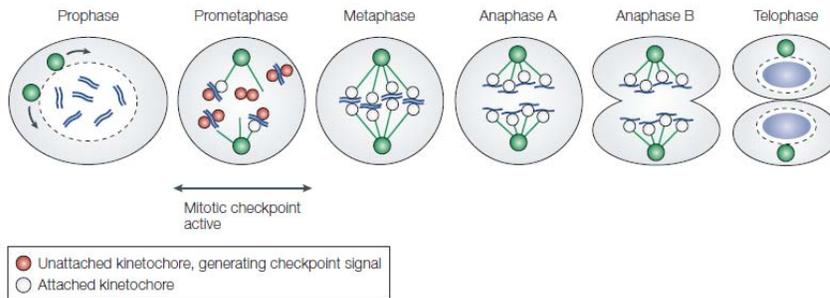
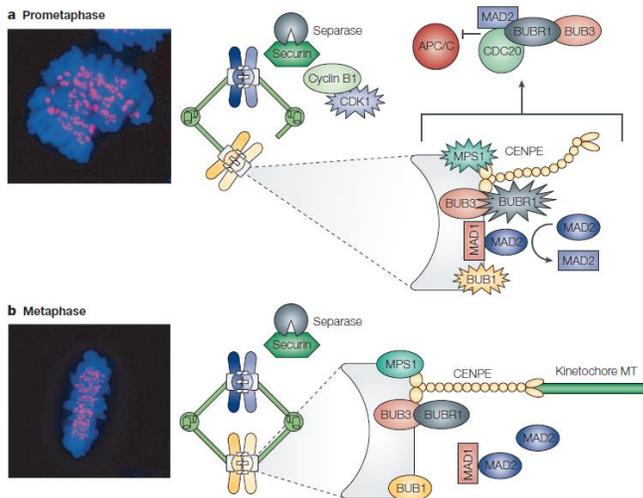


Figura 10. Fases del ciclo celular. En la prometafase los cinetocoros (esferas rojas) se unen de cada lado a las cromatides hermanas (líneas azules) y esto permite que sean captados por los microtúbulos (líneas verdes). En ese momento el *checkpoint* se activa, una vez que los cinetocoros están unidos a los microtúbulos (esferas blancas) el *checkpoint* se desactiva permitiendo a la célula pase a la siguiente fase del ciclo celular.

La proteína de CENPE es la encargada de capturar los cinetocoros que están sueltos (figura 11), lo que aumenta la estabilidad cromosómica y evita la aneuploidia debido a la posible pérdida de un solo cromosoma (Kops, Weaver, & Cleveland, 2005). Se requiere la unión de CENPE con BubR1, MAD1 y MAD2 para el control en el checkpoint mitótico y unir a los cinetocoros que están sueltos (Weaver, Bonday, Putkey, Kops, Silk, & Cleveland, 2003).



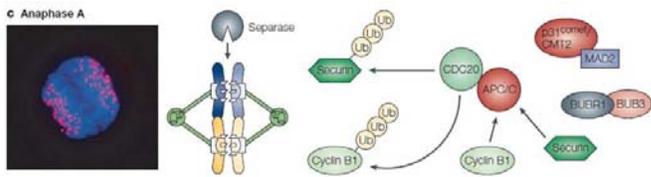


Figura 11. Actividad receptora de CENPE metafase. a) La unión de los cinetocoros en la profase/prometáfase temprana recluta diversas proteínas, entre ellos CENPE, con cinetocoros no unidos. La actividad de cinasa de BUBR1 es esencial para la señalización del *checkpoint* en la profase y es activada al unirse con CENPE. La presencia de CENPE y la funcionalidad del complejo proteico presente en este punto, es vital para la unión de los cinetocoros lo que permitirá a la célula pasar de la profase a la metafase. b) Debido a que cada par de cinetocoros hermanos ataca a los microtúbulos, estos generan tensión que los estira y el inhibidor del *checkpoint* es silenciado por esos mismos cinetocoros. Al menos uno de los conectores transductores de la señal es CENPE, el cual directamente captura los microtúbulos del cinetocoro y al hacerlo silencia la actividad de BURB1. c) Después del silenciamiento de la señalización en cada cinetocoro y la rotación del inhibidor que transmite la señal de espera, APC/c mediada por ubiquitinación de securina y ciclina B1, y la posterior degradación por el proteosoma desencadena la entrada a anafase en el ciclo celular.

Se sabe que la aneuploidía no es un factor determinante en el desarrollo de cáncer, sin embargo es un factor muy influyente, pues los productos mutados de los alelos de la mayoría de los oncogenes o genes supresores de tumores tienen efectos sobre la proliferación y supervivencia celular. Por otro lado, la capacidad de una célula de redistribuir sus cromosomas enteros facilita la tumorigénesis mediante el aumento de la pérdida de heterocigocidad de un gen supresor de tumores. O esta capacidad podría, en efecto, amplificar un oncogén mediante la duplicación del cromosoma que alberga el alelo mutado (Kops, Weaver, & Cleveland, 2005).

JUSTIFICACIÓN

La LLA es una de las neoplasias más comunes en pacientes pediátricos a nivel mundial pues representa cerca del 30% de las neoplasias pediátricas. Un porcentaje de los pacientes en fase de remisión sufre al menos una recaída, mientras que otro porcentaje fallece a causa de la LLA. En la actualidad se sabe que el desarrollo de esta enfermedad es multifactorial sin embargo, estudios recientes han demostrado que el *splicing* alternativo puede ser una de las causas; debido a la gran cantidad de procesos y funciones biológicas que se ven directamente influenciadas por la presencia, ausencia o cambio de las proteínas codificadas por los genes.

Como resultado de un trabajo previo realizado en el laboratorio de Oncología Experimental del INP, se encontró que los genes HMMR y CENPE están implicados en procesos de *splicing* alternativo y a su vez, en procesos neoplásicos. Sin embargo la influencia de dichos genes en la LLA es aún desconocida. Este trabajo tiene como propósito identificar las variantes de mRNA de dichos genes presentes en este tipo de neoplasia, así como sentar las bases acerca de su potencial como marcadores moleculares.

HIPÓTESIS

Se encontrarán variantes de mRNA de HMMR y CENPE, en muestras de mRNA obtenido de aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA, cuya presencia o ausencia podría tener un potencial papel en el pronóstico de los pacientes ante la neoplasia.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión de variantes de mRNA en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda.

Objetivos particulares

Obtener cDNA mediante RT-PCR de muestras de RNA total, a partir de muestras de aspirado de médula ósea.

Determinar la presencia o ausencia de variantes de mensajero en pacientes con LLA, de los HMMR y CENPE.

Identificar las características clínicas de los pacientes.

Relacionar la expresión de las variantes de HMMR y CENPE en las muestras de LLA, con los datos clínicos de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de muestras

A partir de la relación de muestras de RNA obtenidas de médula ósea en el laboratorio, se seleccionaron todos aquellos pacientes con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica tipo B, así como aquellos cuyo diagnóstico no estaba especificado y se realizó una revisión de los expedientes clínicos de dichos pacientes.

Se revisaron los expedientes vaciando los datos en una base que se diseñó para el estudio (tabla 7). Los diagnósticos se corroboraron para evitar que se incluyeran pacientes con diagnóstico diferente a LLA y poder actualizar la base de datos del laboratorio de aquellos cuyo diagnóstico no se conocía. Las muestras consideradas para el estudio, fueron aquellas que contaban con el expediente clínico completo para nuestra base de datos.

Tabla 7. Información contenida en la base de datos

1) Vial (ID del laboratorio)	2) Número de expediente	3) Género (M o F)
4) Edad al momento del diagnóstico	5) Fecha de diagnóstico	6) Diagnóstico
7) Edad de defunción	8) Fecha de defunción	9) Respuesta a la aplicación de la Ventana de Esteroides
10) %Blastos	11) Inducción a remisión	12) Reinducción (Si o No)
13) Número de Reinducciones (recaídas)	14) Fecha inicio Ventana de Esteroides.	15) Fecha 1ra reinducción
16) Días a la 1ra reind.	17) Fecha 2da reinducción	18) Días a la 2da reinducción
19) Fecha 3ra reinducción.	20) Días a la 3ra reinducción.	21) Fecha 4ta reinducción
22) Días a la 4ta	23) Fecha última	24) Días a la última consulta

reinducción.	consulta	
25) Días a la defunción		

Obtención de cDNA

Se cuantificó la concentración de RNA en las muestras de los pacientes seleccionados (aquellos con diagnóstico de LLA y expediente clínico completo). Dichas muestras de RNA se extrajeron por el personal del banco de tejidos a partir de muestras de aspirado de médula ósea, que se hizo a los pacientes como proceso de rutina para el diagnóstico diferencial del tipo de LLA.

Las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro (NanoDrop1000) de acuerdo a las instrucciones de uso del equipo. La concentración de las muestras se midió en ng/μL. Se consideró la relación 260/280 para descartar impurezas como DNA o moléculas residuales del proceso de extracción y asegurar que las muestras estuvieran lo más puras posibles. De todas las muestras que se cuantificaron, se incluyeron aquellas cuya concentración de RNA fuera mayor o igual a 100ng/μL, esto fue debido a la sensibilidad del proceso de retrotranscripción. Es decir, en nuestro estudio se incluyeron las muestras con expediente clínico completo y con suficiente RNA para la obtención de cDNA.

Una vez seleccionadas las muestras de RNA, se obtuvo cDNA mediante una RT-PCR de dos pasos con kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pasos en la RT-PCR se señalan en la tabla 8.

Tabla 8. Pasos de RT-PCR

PASO	ALÍCUOTAS	CONDICIONES
DNAsa	1μL de enzima (DNAsa 5u/μL), 1μL buffer de DNAsa (10X) volumen necesario de RNA para obtener 2μg/μL de cDNA. H2O inyetable cbp 10μL	37°C/30min
DNAsa (detener reacción)	1μL de EDTA a cada tubo	65°C/10min
Retrotranscripción	Buffer RT10x (2μL), mix de dNTP's 25x (0.8μL),	25°C/10min, 37°C/120min, 85°C/5min

	MultiScribe RT (1µL) y agua inyectable (3.2µL)	
--	--	--

Todas las muestras se homogenizaron después de agregar cada alícuota, para esto se colocaron en el Vórtex 3seg y se centrifugaron 5seg/3000rpm.

Por último se duplicó el volumen de cada tubo con agua inyectable para llevar la concentración final del cDNA a 2µg/µL.

Para asegurar que el cDNA fuera amplificable, y así evitar falsos negativos, se hizo una PCR de punto final para un gen constitutivo (RPL4) para las muestras y un control negativo con las condiciones indicadas en la tabla 9. Las muestras y el control negativo, se corrieron un gel de agarosa (2%, 70v, 60min).

Amplificación de los genes de interés por PCR de punto final.

Amplificación de HMMR

Para evaluar la expresión de HMMR en las muestras de leucemia, se hizo una PCR de punto final. Los primers fueron diseñados previamente en el laboratorio con herramientas bioinformáticas, las secuencias de los primers que se utilizaron fueron:

<p>Forward 5' ATC CGC ATT CAG TTG TCG AGG AGT 3'</p> <p>Reverse 5' AGT GC GCA TTT AGC CTT GCT TCC 3'</p>
--

El fragmento amplificado del gen se muestra en la figura 12, dicho fragmento fue seleccionado, pues en trabajos previos en el laboratorio se determinó que era una de las zonas con alta actividad de *splicing*.

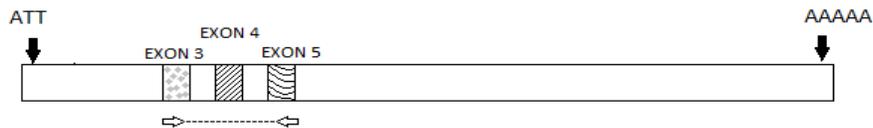


Figura 11. Localización de los primers para HMMR dentro del cDNA. Las flechas blancas indican el sitio de reconocimiento de los primers utilizados. Los codones en los extremos representan las secuencias de inicio y término del gen completo.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos eppendorf (200µL) con las alícuotas y a las condiciones indicadas en la tabla 9, y se etiquetaron respectivamente.

Amplificación de CENPE

Por otro lado la PCR de punto final para la expresión de CENPE se realizó con las siguientes secuencias de primers, los cuales fueron previamente diseñados en el laboratorio.

Forward 5' GGA AGA CCA GAT TAA GAA GCT ACA GG 3'

Reverse 5' CTC TTT CCT CAG CCT TTC TAC TTC AG 3'

La secuencia amplificada del cDNA con los primers, se muestra en la figura 13.

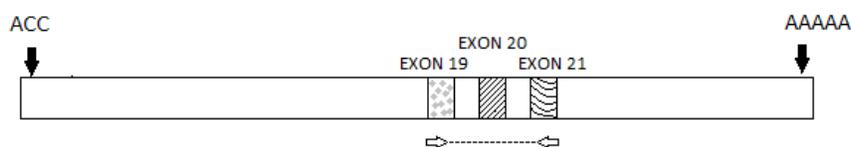


Figura 13. Localización de los primers para CENPE dentro del cDNA. Las flechas blancas representan el sitio reconocido por los primers diseñados. Los codones en los extremos representan las secuencias de inicio y término del gen completo.

Todos los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa que se prepararon con Buffer TBE al 2%(m/v) y se corrieron a 70v durante 60min.

Tabla 9. Condiciones para la PCR utilizados.

GEN	ALÍCUOTAS	CONDICIONES TERMOCICLADOR
RPL4	3µL de buffer, 2.5µL de MgCl (1mM), 1µL de dNTP's (10mM), 0.5µL de Primers (Forward/Reverse, 25mM), 0.15µL de Taq Pol (5u/µL) y agua inyectable c.b.p. 23µL	94°C/7min, [94°C/1min, 61°C/1min, 72°C/75seg] 40 ciclos, 72°C/10min
HMMR	3µL de buffer, 2.5µL de MgCl (1mM), 1µL de dNTP's (10mM), 0.5µL de Primers (Forward/Reverse, 25mM), 0.15µL de Taq Pol	94°C/7min, [94°C/1min, 61°C/1:15min, 72°C/75seg] 40 ciclos, 72°C/10min

	(5u/μL) y agua inyectable c.b.p. 23μL. Se agregaron 2μL de cDNA (200 ng)	
CENPE	3μL de buffer, 4μL de MgCl (1mM), 1μL de dNTP's (10mM), 0.5μL de Primers (Forward/Reverse, 25mM), 0.15μL de Taq Pol (5u/μL) y agua inyectable c.b.p. 23μL	94°C/7min, [94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/75seg] 40 ciclos, 72°C/10min

Secuenciación

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis al 2% mediante un kit de extracción de geles. Los productos se parados se marcaron con el kit de secuenciación BigDye Terminator 3.1 y posteriormente se corrieron en el secuenciador automatizado de *Applied Biosystems* de acuerdo a lo reportado en la literatura.

Cuantificación relativa

Se realizó una cuantificación relativa de DNA en los geles de agarosa, utilizando el programa ImageJ, de la expresión de HMMR respecto a la de RPL4, el cual utiliza la imagen en escala de grises y mediante un algoritmo basado en la intensidad de la imagen (banda) obtiene el área bajo la curva de dicho fragmento de la imagen.

Cuantificamos la expresión del gen RPL4 de cada una de las muestras como control. Posteriormente se cuantificó la expresión de cada una de las muestras positivas a HMMR

Una vez que se obtuvieron las áreas para ambos genes, la cuantificación relativa se calculó con el cociente del área de HMMR respecto al de RPL4, con la fórmula:

$$C_R = \frac{HMMR}{RPL4}$$

Análisis estadístico

Para determinar el impacto que tiene la expresión de HMMR y CENPE sobre los pacientes, se comparó la expresión de los genes con los siguientes datos empleando las pruebas estadísticas:

- **Estatus del pacientes (vivo o fallecido) a los 3 años posteriores del diagnóstico**

- **Estado de la enfermedad (vse, vce) a los 3 años posteriores del diagnóstico.**
- **Pronóstico del paciente.**
- **Número de recaídas.**

Debido al tamaño muestral y el tipo de variables, se realizó una prueba exacta de Fisher con chi cuadrada, en la que se consideró la expresión de HMMR o CENPE con el estatus del paciente, estado de la enfermedad y el pronóstico.

Para evaluar las recaídas respecto la expresión de los genes, se realizó un análisis de 1 vía con chi cuadrada.

RESULTADOS

Se incluyeron a los pacientes de los cuales se tenía el expediente clínico completo con los datos señalados en la tabla 6. Posteriormente se excluyó a los pacientes cuya muestra de RNA fuera menor a 100ng/ μ L (requerimiento indispensable para la obtención de cDNA).

La tabla 10 es un ejemplo de la base de datos construida con la información de los expedientes clínicos (anexo 1), con las muestras que cumplían con todos los criterios de inclusión, los cuales fueron descritos en la metodología.

Tabla 10. Base de datos (muestra).

Vial	Número de Expediente	Género	Edad Diag.	Fecha Dx	Dx	Estatus	Edad Def	Fecha Def	Resp. Ventana Est.	Blastos (%)	Ind. Remisión	Reinducción	#Reinduccion es
126	452288	M	11	jul-07	LLA L1 PreB	VsE	-	-	No	90	Si	Si	1
128	453254	M	9	ago-07	LLA	McE	12	dic-10	Si	70	Si	Si	4
130	453531	M	19	sep-07	LLA Preb	VsE	-	-	No	80	Si	No	0
132	453796	F	5	oct-07	LLA L1 preB	VsE	-	-	SI	98	SI	Si	4
139	456734	M	4	abr-08	LLA	McE	6	jul-10	Si	36	No	No	1
141	457723	F	3	jul-08	LLA	VsE	-	-	Si	51	Si	Si	4

142	457936	M	13	jun-06	LLA	McE	15	oct-10	Sí	99	No	Si	1
144	457341	F	6	may-08	LLA L1 PreB	VcE	-	-	No	95	No	Si	1

Inicialmente se contaba con 71 muestras de aspirado de médula ósea, conforme se fueron revisando los expedientes clínicos de los pacientes y las concentraciones de RNA, este número se redujo pues en algunos casos, el expediente clínico no estaba completo, el RNA disponible era de mala calidad o insuficiente para obtener 2µg/µL de cDNA. El total de muestras utilizadas en el estudio fue de 31 (tabla 11).

Posterior a la revisión de expedientes clínicos y la cuantificación de RNA total presente en las muestras, se obtuvo cDNA mediante RT-PCR y se verificó la expresión del gen RPL4, un gen constitutivo, que ayudaría a confirmar que las muestras fueran amplificables y evitar falsos negativos. Como se puede observar en la imagen del gel (figura 14), la expresión de este gen varía de una muestra a otra. Esto puede deberse principalmente a la cantidad de transcritos presentes en las muestras, lo que podría sugerir que existe heterogeneidad de las células transformadas. Sin embargo se puede observar una clara expresión en cada una de las muestras.

La tabla 12 señala la cantidad de muestras que resultaron positivas, al menos para una variante, para HMMR, CENPE y las muestras que resultaron positivas a ambos genes.

Tabla 11. Relación de la cantidad de muestras.

Muestras	Cantidad
Totales de LLA (antes de la revisión de expedientes)	71
Incluidas en el estudio (después de la revisión de expedientes y que cumplieron con los requisitos de inclusión)	31

Tabla 12. Resultados de la expresión por gen.

Expresión	(+)	%	(-)	%
HMMR	11	35.48	20	64.52
CENPE	12	38.71	19	61.29
HMMR-CENPE	7	22.58	24	77.42

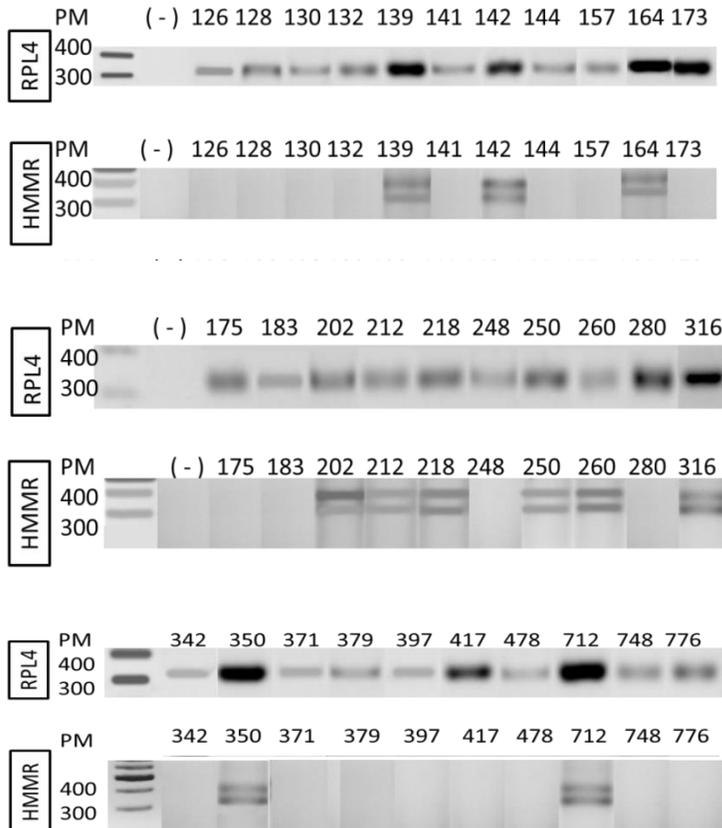
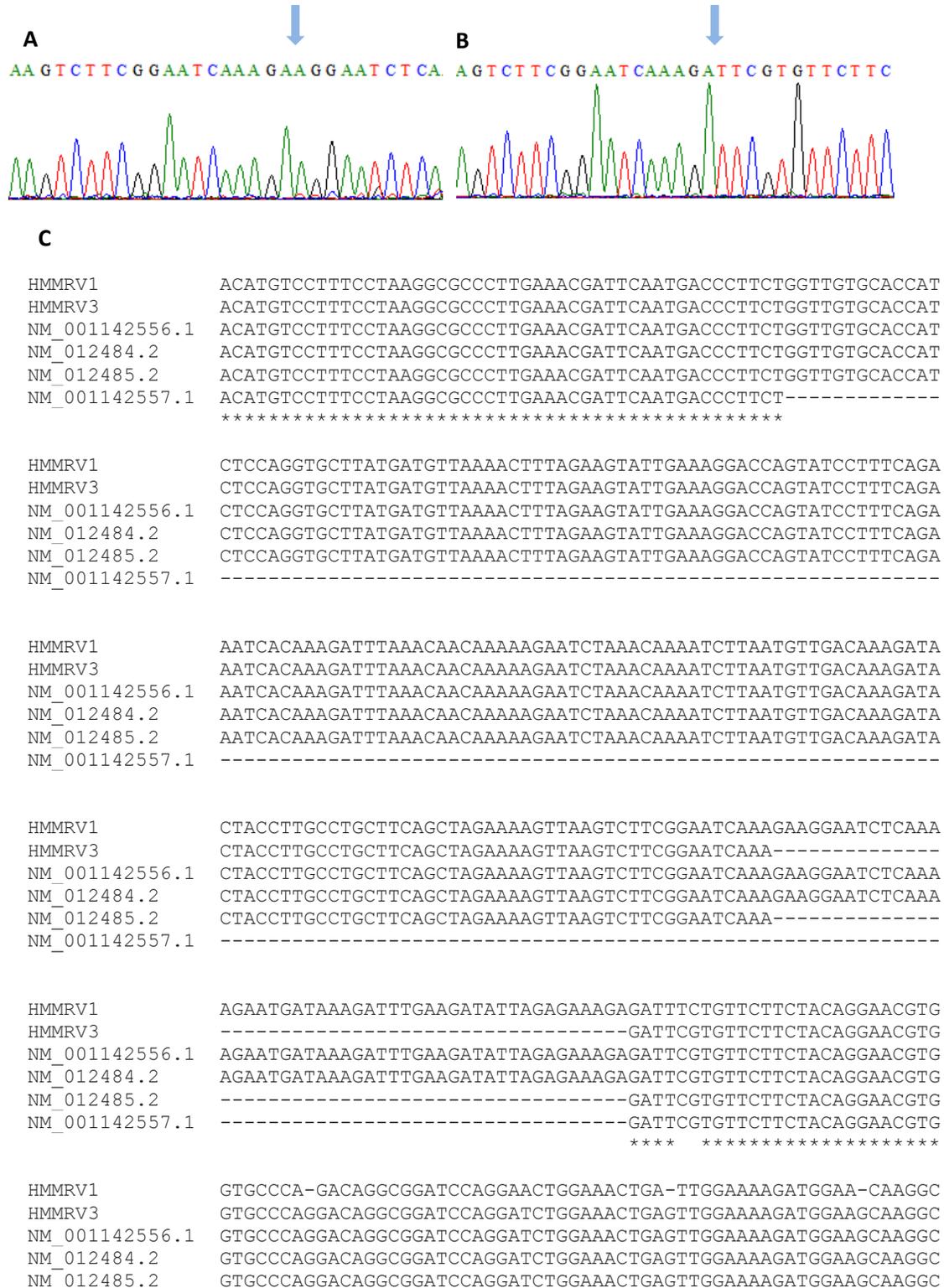


Figura 14. Productos de PCR de HMMR. Expresión de genes de las 31 muestras utilizadas en el estudio. Productos corridos en geles de agarosa al 2%, 70v, 60min. Se puede observar la variedad en la expresión entre cada muestra.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2%/70v/60min y se revelaron en el transiluminador. La expresión (ausencia o presencia) se notó claramente, pues en el caso de HMMR no todas las muestras fueron positivas y observamos para aquellas que si lo fueron, todas presentaron dos bandas siendo la superior de mayor intensidad que la banda inferior. A continuación, las bandas expresadas de HMMR fueron purificadas del gel y secuenciadas. Las dos bandas obtenidas por expresión de HMMR mostraron que los amplicones pertenecen a dos variantes de mRNA, las cuales se alinearon con respecto a

las secuencias reportadas en el NCBI. El resultado del alineamiento muestra que el amplicón de mayor tamaño corresponde a la variante 1, mientras que el más pequeño corresponde a la variante 3 del gen (figura 15).



```

NM_001142557.1  GTGCCAGGACAGGCGGATCCAGGATCTGGAAACTGAGTTGGAAAAGATGGAAGCAAGGC
*****
HMMRV1          TAAATGCTGCACTA-----
HMMRV3          TAAATGCTGCACT-----
NM_001142556.1  TAAATGCTGCACTAAGGGAAAAAACATCTCTCTCTGCAAATAATGCTACACTGGAAAAAC
NM_012484.2     TAAATGCTGCACTAAGGGAAAAAACATCTCTCTCTGCAAATAATGCTACACTGGAAAAAC
NM_012485.2     TAAATGCTGCACTAAGGGAAAAAACATCTCTCTCTGCAAATAATGCTACACTGGAAAAAC
NM_001142557.1  TAAATGCTGCACTAAGGGAAAAAACATCTCTCTCTGCAAATAATGCTACACTGGAAAAAC
*****

```

Figura 15. Secuenciación de los productos de PCR para la expresión de HMMR. **A)** Secuencia perteneciente a la variante 1 de HMMR, la flecha indica el sitio de *splicing* constitutivo (unión de exones 1 y 2). **B)** Secuenciación del amplicón de menor tamaño, que pertenece a la variante 3 de HMMR, la flecha indica el sitio de *splicing* alternativo donde se corta un exón (unión de exones 3 y 5). **C)** Alineamiento de las secuencias reportadas en el NCBI de HMMR y las secuencias expresadas en los pacientes con LLA.

Ya que se tenía identificadas las secuencias de cada amplicón, y comparando las secuencias se realizó el modelo de *splicing* alternativo que presentan los pacientes con LLA para HMMR (Figura 16).

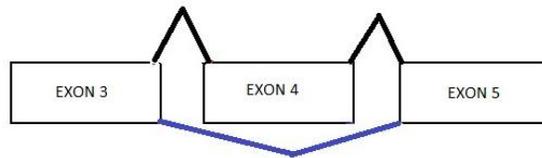


Figura 16. Modelo de *splicing* alternativo de HMMR en pacientes con LLA. **A)** La línea negra representa el *splicing* constitutivo para HMMR permitiendo la unión de los exones 3,4 y 5 lo cual corresponde a la variante 1. El *splicing* alternativo (línea azul) promueve la unión de los exones 3 y 5.

Al igual que para HMMR, se corrieron los productos de PCR para CENPE en las mismas condiciones, en este caso se observó una heterogeneidad en la expresión del gen pues algunas muestras únicamente expresaron una banda, ambas bandas o en otros casos ninguna (figura 17).



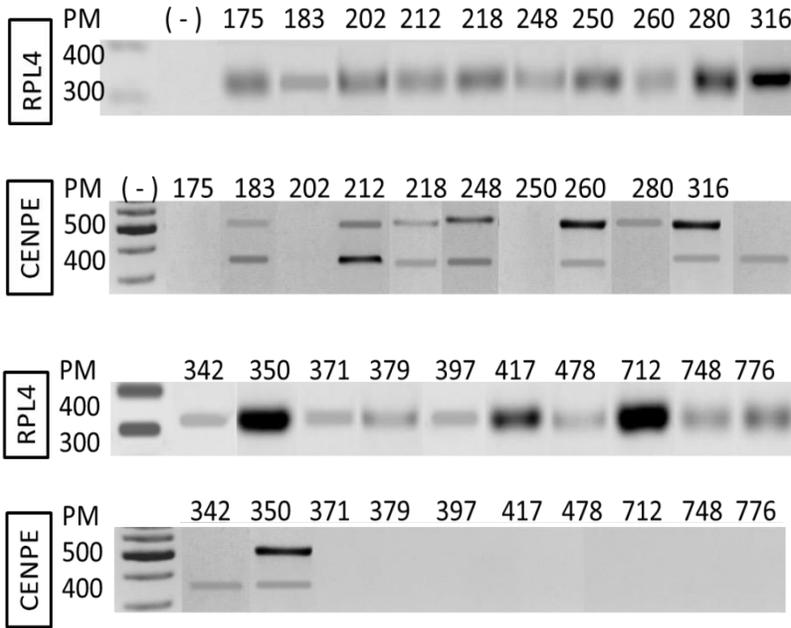
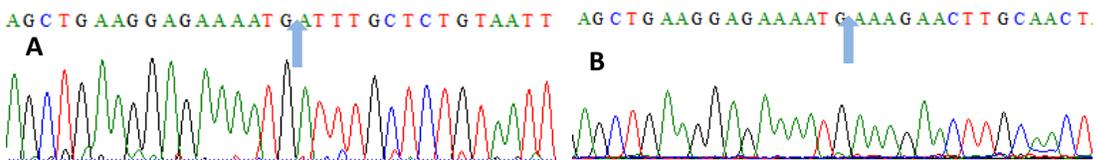


Figura 17. Productos de PCR de CENPE. Expresión del gene de las 31 muestras utilizadas en el estudio. Productos corridos en geles de agarosa al 2%, 70v, 60min. Se puede observar la variedad en la expresión entre cada muestra.

A continuación, las bandas de expresión de CENPE fueron purificadas del gel y secuenciadas. En lo que respecta a CENPE, es importante señalar que el diseño previo de los primers se realizó considerando la identificación únicamente de una variante del gen, sin embargo nuestros resultados revelan la presencia de dos amplicones, sugiriendo así la presencia de un transcrito no reportado. Debido a esto, los productos de PCR encontrados en las muestras se purificaron y después se secuenciaron. Las secuencias revelaron la presencia de dos transcritos del gen; el mayor un tamaño de 500 pb y el menor de 400 pb aproximadamente (figura 18).



C

CENPE	TCATACTCATTGGAA-GCATTGAAGACCCAAAACAAATGAAGCAGACTCTGTTTGATGCT
C500	TCATACTCATTGGAAAGCATTGAAGACCCAAAACMAATGAAGCAGACTCTGTTTGATGCT
NM_001813	TCATACTCATTGGAAAGCATTGAAGACCCAAAACAAATGAAGCAGACTCTGTTTGATGCT
NM_001286734	TCATACTCATTGGAAAGCATTGAAGACCCAAAACAAATGAAGCAGACTCTGTTTGATGCT

```

CENPE          GAAACTGTAGCCCTTGATGCCAAGAGAGAATCAGCCTTTCTTAGAAGTAAAAATCTGGAG
C500           GAAACTGTAGCCCTTGATGCCAAGAGAGAATCAGCCTTTCTTAGAAGTAAAAATCTGGAG
NM_001813     GAAACTGTAGCCCTTGATGCCAAGAGAGAATCAGCCTTTCTTAGAAGTAAAAATCTGGAG
NM_001286734  GAAACTGTAGCCCTTGATGCCAAGAGAGAATCAGCCTTTCTTAGAAGTAAAAATCTGGAG

CENPE          CTGAAGGAGAAAAT-----
C500           CTGAAGGAGAAAATGAAAGAACTTGCAACTACATACAAGCAAATGGAAAATGATATTCAG
NM_001813     CTGAAGGAGAAAATGAAAGAACTTGCAACTACATACAAGCAAATGGAAAATGATATTCAG
NM_001286734  CTGAAGGAGAAAATGAAAGAACTTGCAACTACATACAAGCAAATGGAAAATGATATTCAG

CENPE          -----
C500           TTATATCAAAGCCARTTGGAGGCCAAAAAGAAAATGCAAGTTGATCTGGAGAAAAGAATTA
NM_001813     TTATATCAAAGCCAGTTGGAGGCCAAAAAGAAAATGCAAGTTGATCTGGAGAAAAGAATTA
NM_001286734  TTATATCAAAGCCAGTTGGAGGCCAAAAAGAAAATGCAAGTTGATCTGGAGAAAAGAATTA

CENPE          -----
C500           CAATCTGCTTTTAATGAGATAACAAAACCTCACCTCCCTTATAGATGGCAAAGTTCCAAAA
NM_001813     CAATCTGCTTTTAATGAGATAACAAAACCTCACCTCCCTTATAGATGGCAAAGTTCCAAAA
NM_001286734  CAATCTGCTTTTAATGAGATAACAAAACCTCACCTCCCTTATAGATGGCAAAGTTCCAAAA

CENPE          GATTTGCTCTGTAATTTGGAATTGGAAGGAAA-----
C500           GATTTGCTCTGTAATTTGGAATTGGAAGGAAAAGATTACTGATCTTCARAAAGAACTAAAT
NM_001813     GATTTGCTCTGTAATTTGGAATTGGAAGGAAAAGATTACTGATCTTCAGAAAGAACTAAAT
NM_001286734  GATTTGCTCTGTAATTTGGAATTGGAAGGAAAAGATTACTGATCTTCAGAAAGAACTAAAT

CENPE          -----
C500           AA-----
NM_001813     AAAGAAGTTGAAGAAAATGAAGCTTTGCGGGAAGAAGTCATTTTGCTTTCAGAATTGAAA
NM_001286734  AAAGAAGTTGAAGAAAATGAAGCTTTGCGGGAAGAAGTCATTTTGCTTTCAGAATTGAAA

```

Figura 18. Secuenciación de los productos de PCR para la expresión de CENPE. A) Secuencia del producto mayor de PCR; muestra la expresión constitutiva de CENPE. Las flechas azules indican el sitio de *splicing* donde se unen los exones y se produce el *splicing* constitutivo, mientras que en la figura de la izquierda se da el corte del exón produciendo el *splicing* el alternativo mediante la unión de los exones 19 y 20. **B)** Producto de la secuenciación del producto de menor tamaño, la flecha indica el sitio alternativo de *splicing* y la unión de los exones 19 y 21. **C)** Alineamiento de secuencias reportadas en el NCBI y las secuencias obtenidas de los productos de PCR en muestras con LLA.

Posterior al alineamiento de las secuencias, y una vez identificado el sitio donde se producía el *splicing* alternativo, se diseñó el modelo de *splicing* para estas dos variantes de CENPE (figura 19).

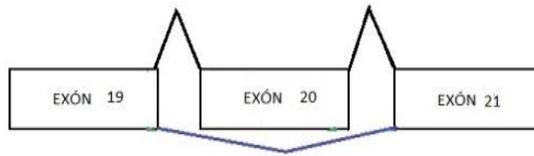


Figura 19. Modelo de *splicing* alternativo de CENPE en pacientes con LLA. El *splicing* constitutivo para CENPE (línea negra) promueve la unión entre los exones 19, 20 y 21 correspondiente a la variante 1, la de mayor tamaño. La unión de los exones 19 y 21 corresponde al *splicing* alternativo (línea azul) dando origen a la variante de menor tamaño.

Una vez identificadas las variantes en las muestras de LLA para ambos genes, nos preguntamos si la ausencia o presencia, así como la diferencia en la expresión de las variantes de mRNA, tendría un impacto directo con las características clínicas de los pacientes, obtenidas a partir de los expedientes clínicos.

Para ello, a partir de los datos en nuestra base, seleccionamos aquellos que resultan más representativos tanto en el diagnóstico como el pronóstico de los pacientes; dichos datos son: sexo del paciente, estatus del paciente al momento de la revisión, respuesta a la ventana de esteroides, inducción a la remisión y número de reinducciones (Figuras 20 a 25).

El primer dato a considerar fue el sexo, ya que se sabe que la LLA se presenta con mayor frecuencia en hombres, quisimos evaluar si existe alguna relación entre la expresión de los genes con el género masculino y por ende, la frecuencia en la epidemiología de la enfermedad. Para esto realizamos una gráfica comparativa de la expresión de HMMR y CENPE con el género de los pacientes (figura 20). Aunado a esto, consideramos la expresión de ambos genes al mismo tiempo (H-C, en la gráfica).

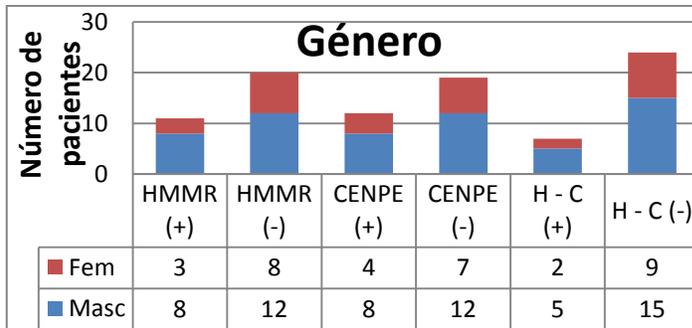


Figura 20. Relación de pacientes por sexo respecto la expresión de HMMR, CENPE y HMMR-CENPE. Se puede observar mayor cantidad de pacientes masculinos en relación con las mujeres. (+) Expresión positiva de las variantes del gen, (-) expresión negativa de alguna variante; H-C expresión simultánea de ambos genes.

Al momento de realizar la revisión de los expedientes clínicos, pudimos notar que había algunos pacientes que habían fallecido. Por lo que además del género del paciente quisimos evaluar el impacto de la expresión de HMMR y CENPE en la mortalidad de la enfermedad (figura 21), evaluando la condición que presentaban los pacientes en los 3 años posteriores al haberse diagnosticado la neoplasia o en su defecto, si ya había fallecido. Por lo que comparamos la ausencia (-) o presencia (+) de las variantes con la condición de los pacientes (vivo o muerto).

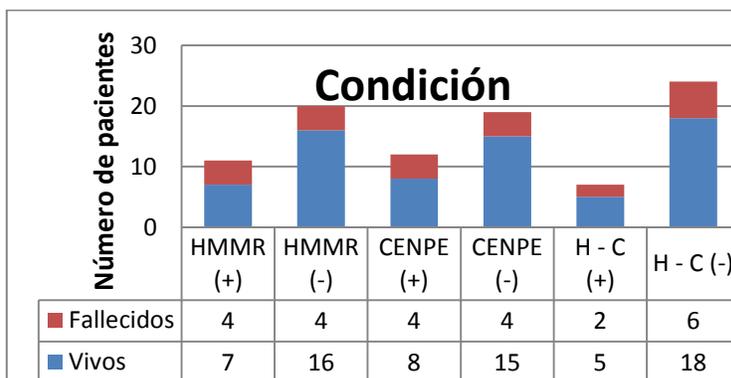


Figura 21. Relación de pacientes vivos y fallecidos respecto la expresión de HMMR, CENPE Y HMMR-CENPE. Se observa una mayor cantidad de pacientes vivos HMMR y CENPE negativos. (+) Expresión positiva de las variantes del gen, (-) expresión negativa de alguna variante; H-C expresión simultánea de ambos genes.

Dado que la condición general de los pacientes no reflejaba una influencia contundente con la expresión de las variantes, evaluamos de manera más específica la relación con el estatus de los pacientes en los 3 años posteriores al diagnóstico. Por lo que

consideramos si los pacientes que ya habían fallecido en ese lapso de tiempo, lo hicieron a causa de la enfermedad (McE), posterior a su remisión completa (MsE) y en el caso de los pacientes vivos si habían alcanzado la remisión completa (VsE) o aún no (VcE). Como resultado de la comparación se puede observar a primera instancia que aquellos pacientes que no expresan ninguno de los dos genes (por separado o al mismo tiempo) presentan un mejor pronóstico frente a la enfermedad (Figura 22).

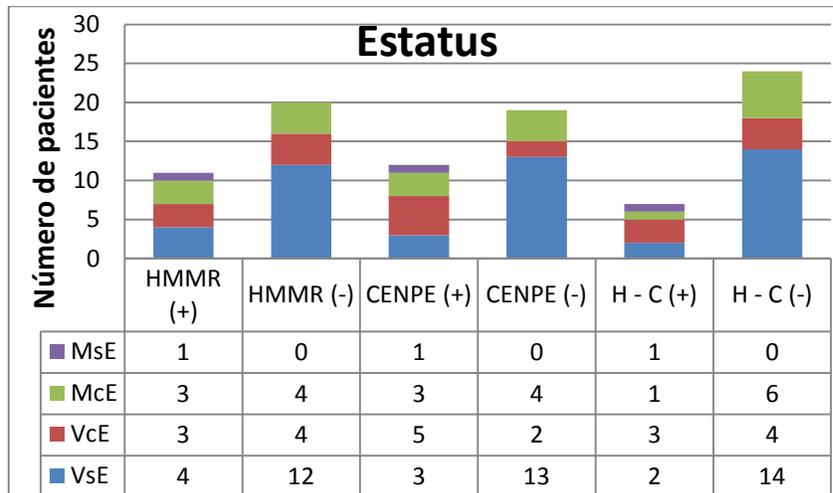


Figura 22. Relación del estatus del paciente, al momento de la revisión de expedientes, respecto la expresión de los genes HMMR, CENPE y HMMR-CENPE. MsE: Muerto sin enfermedad, McE, muerto a causa de la enfermedad, VcE: vivo con enfermedad, VsE: vivo con remisión completa (sano). Se presenta una mayor cantidad de pacientes VsE para HMMR y CENPE negativos.

Por otro lado evaluamos la relación de la expresión de los genes con la respuesta a la ventana de esteroides. Esta etapa del tratamiento es importante ya que da una idea al médico sobre el tipo de tratamiento quimioterapéutico que se aplicará a los pacientes. Como ya se mencionó anteriormente, la ventana de esteroides es un tratamiento inicial que se aplica a los pacientes con la finalidad de disminuir los blastos presentes en MO. Una vez que se logra disminuir el porcentaje de células inmaduras se inicia el esquema de tratamiento quimioterapéutico elegido por el médico.

Cerca del 80 al 85% de los pacientes que expresan alguno de los dos genes tuvieron una respuesta a la dosis de esteroides, sin embargo esta relación se mantiene para aquellos pacientes que no expresan ninguno de los dos genes (figura 23). El análisis de la expresión de ambos genes se puede observar que la relación cambia en forma considerable sin embargo, al compararla con la relación de aquellos que no expresan los genes al mismo tiempo no se observa mucho cambio.

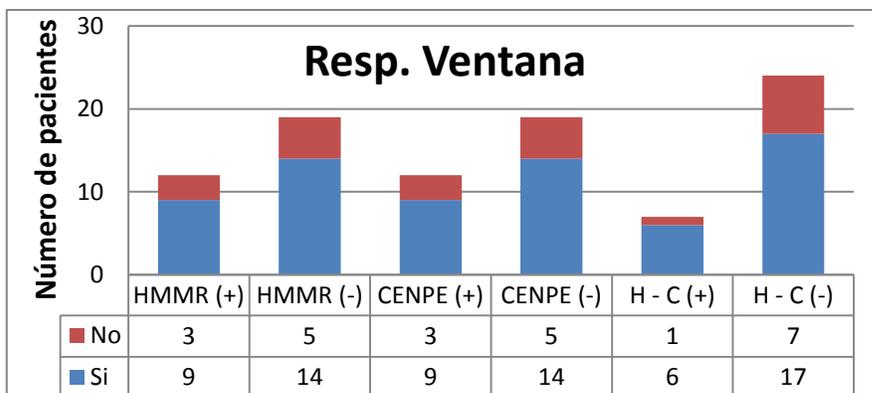


Figura 23. Expresión de HMMR, CENPE y HMMR-CENPE respecto a la respuesta a la ventana de esteroides. La mayoría de los pacientes respondieron adecuadamente al tratamiento con esteroides.

La primera etapa del tratamiento es la inducción a remisión la cual tiene por objetivo la desaparición completa de la leucemia detectable en la medula ósea es decir, que menos del 5% de los “blastos” de la leucemia permanecen en la medula ósea y el conteo sanguíneo se considera normal. Es por esto que se evaluó la relación de la expresión de variantes de mRNA con este dato clínico; y observamos que la mayoría de los pacientes que no expresaron ninguna de las dos variantes de HMMR o CENPE, lograron en un 75% disminuir la cantidad de blastos (figura 24).

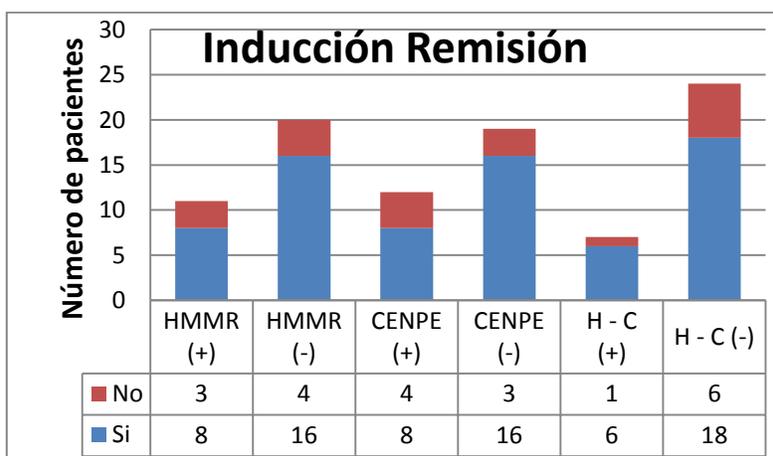


Figura 24. Relación de pacientes con inducción a la remisión con la expresión de los genes de interés. Los pacientes que presentan inducción a la remisión son en general, aquellos que no presentaron expresión de ningún gen.

Por último evaluamos uno de los factores que refleja la evolución del paciente ante el tratamiento e indica el pronóstico del mismo, la presencia de una o más reinducciones. Al realizar la gráfica comparativa entre la expresión y la presencia de al menos una

reinducción (figura 25), pudimos observar que cerca del 70% de los pacientes HMMR y CENPE negativos presentaron al menos una reinducción durante el periodo de estudio. Por otro lado observamos que este porcentaje disminuye para aquellos pacientes positivos a la expresión de los genes, otorgando quizá, un factor protector ante las reinducciones.

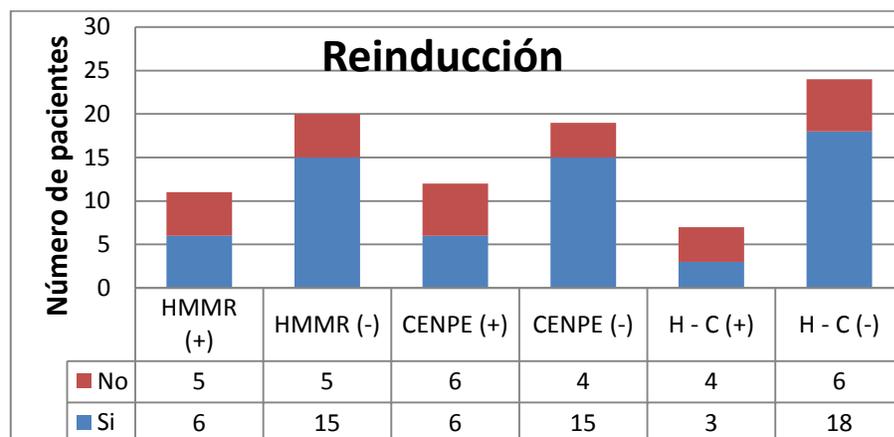


Figura 25. Relación de reinducción respecto positividad o negatividad de la expresión de los genes.

Existe una relación casi del 50% de pacientes que expresaron alguno de los dos genes y presentaron o no alguna reinducción, por otro lado, la proporción de pacientes.

Posterior a esto se realizó la cuantificación relativa de DNA en los geles de agarosa, utilizando el programa ImageJ, se determinó la expresión relativa de HMMR respecto a la de RPL4, el cual utiliza el área bajo la curva de la banda expresada en el gel. Se cuantificó la expresión del gen RPL4 de cada una de las muestras y se utilizó como control para realizar la cuantificación relativa. Cuantificamos la expresión de cada una de las muestras positivas a HMMR y se calculó la cuantificación relativa. Cabe señalar que la cuantificación se realizó considerando ambas bandas debido a que todas las muestras las expresaron (tabla 13).

Tabla 13. Área de la banda en el gel de agarosa. Expresión de RPL4 y HMMR

Muestra	RPL4	HMMR
126	3677.841	0
128	4579.426	0
130	11730.841	0
196	11626.598	0
156	4951.719	0

154	3470.477	0
139	8012.305	5110.986
141	12183.355	0
142	26012.702	14799.326
148	4926.598	0
149	11618.891	0
157	13990.698	0
158	3408.234	0
161	2381.234	0
164	28520.882	0
173	54665.028	6625.619
183	3373.426	0
193	17988.489	0
202	13111.719	10882.861
212	13540.305	6674.326
218	14812.012	5707.305
250	15947.184	3486.326
260	13122.77	6194.175
316	30160.51	11272.489
350	30656.832	25720.225
371	32445-34	0
379	15358.90	0
397	23723.45	0
417	9568.56	0
468	32421.67	0
712	26457.64	11272.489
748	23592.89	0
776	32824.56	0

La tabla 14 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación relativa. Como se puede observar, la mayoría de las muestras presenta una expresión relativa menor al 50% de intensidad para HMMR respecto a RPL4.

Tabla 14. Cuantificación relativa HMMR/RPL4

MUESTRA	HMMR/RPL4
139	0.5689269
142	0.12120398
164	0.83001024
202	0.49292287
212	0.38531599
218	0.21861703
250	0.47201734
260	0.37374995
316	0.83897204
350	0.63787808
712	0.42605799

Debido a la heterogeneidad en la expresión de CENPE no fue posible realizar la cuantificación relativa. Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron generar una idea acerca de cuáles eran los datos clínicos potencialmente más significativos, y nos permitió descartar los que no presentaron una relación aparente con la expresión de los genes y el pronóstico de los pacientes, como el sexo.

Ya que se tenía la cuantificación relativa de los genes de interés, nos preguntamos si existía la correlación entre la expresión y las características clínicas de los pacientes.

Con base en los datos de expedientes clínicos, el número de muestras y el tipo de datos experimentales, optamos por utilizar χ^2 con el método de prueba exacta de Fisher en nuestro análisis estadístico. Esta prueba, se eligió ya que permite analizar tamaño de muestras pequeños y nos permite analizar si dos variables categóricas, resultado de clasificarlos de diferente manera, están asociadas entre sí. Es decir, nos permitirá evaluar la asociación de la presencia o ausencia de las variables, respecto al dato clínico elegido.

El primer dato que evaluamos respecto la expresión de los genes fue la condición del paciente, es decir si había fallecido en los primeros 3 años posteriores al inicio de tratamiento o pasado este lapso de tiempo aún se encontraban vivos. Los parámetro a considerar en el análisis fue la expresión dicotómica (si = 1 o no = 0) de ambas variantes

del gen, respecto a si estaba vivo o muerto de acuerdo al dato obtenido del expediente clínico.

El resultado del análisis para HMMR no mostró relación alguna entre la expresión de ambas variantes con la supervivencia de los pacientes en los primeros 3 años. La tabla 15 (anexo II) muestra el resultado de la prueba de ji cuadrada la cual refleja un resultado de 0.3 y, al no encontrar significado estadístico es necesario evaluar la prueba exacta de Fisher, esto debido a que nuestro tamaño muestral no es muy grande, como se observa en los 3 casos, dado el valor de p mayor a 0.05 en todos los casos, es necesario descartar la hipótesis de que haya asociación directa entre la expresión de las variantes con la condición del paciente.

Al igual que para HMMR, realizamos la prueba estadística con los resultados de CENPE para determinar el significado estadístico respecto al estado, considerando de igual manera la expresión dicotómica (si = 1 o no = 0). Cabe señalar que debido al número de muestras que expresaron una sola variante, se manejaron los datos tomando en cuenta únicamente si hubo o no expresión de cualquiera de las dos variantes (tabla 16, anexo II). No es posible determinar un significado estadístico de la prueba ji cuadrada pues $p > 0.05$, por lo que es necesario considerar el resultado de Fisher en donde no se observa tampoco alguna relación entre CENPE y la supervivencia de los pacientes a 3 años posterior al inicio de tratamiento pues los valores para $p > 0.05$.

El segundo de los datos clínicos que analizamos fue el estado en que se encontraba el paciente a los 3 años a partir del inicio del tratamiento, es decir si el paciente se halló enfermo o había alcanzado la remisión completa en este lapso de tiempo (tabla 17, anexo II).

Como resultado de la prueba de ji cuadrada para HMMR observamos que el valor de $p > 0.05$ para la evaluación de relación entre la condición (enfermedad o sanidad) de los pacientes dentro del lapso a los tres años. Dado el tamaño muestral es necesario considerar también el resultado de la prueba de Fisher para confirmar lo anterior. Se obtuvo una $p > 0.05$ para la hipótesis de enfermedad del paciente con relación a la expresión del gen corroborando así el resultado obtenido de la prueba de ji cuadrada por lo tanto, no es posible establecer la relación entre la expresión y la enfermedad.

A continuación se procedió a hacer el mismo análisis para CENPE (tabla 18).

A diferencia del resultado anterior, CENPE mostró un valor de p es cercano a 0.05 como resultado de la prueba de χ^2 cuadrada, lo cual implica que existe una mayor probabilidad de que los pacientes que expresan ambas o alguna de las variantes, no alcancen la remisión completa a los 3 años después del diagnóstico. De igual forma se corroboró el resultado anterior con la prueba de Fisher y puede observar que el resultado de p es cercano a 0.05 en el caso de que la expresión (si = 1) de las variantes del gen se encuentra relación con el estado de enfermedad a los 3 años posteriores al inicio del tratamiento.

Tabla 18. Resultado pruebas estadísticas CENPE – enfermedad a 3 años

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	3.709	0.0541
Pearson	3.656	0.0559

Prueba exacta de Fisher	Prob.	Hipótesis alternativa
Izquierda	0.9893	Prob (ENF3A_N=1) es mayor para CENPE_di=0 que para 1
Derecha	0.0613	Prob (ENF3A_N=1) es mayor para CENPE_di=1 que para 0
Bilateral	0.0751	Prob (ENF3A_N=1) es distinta en CENPE_di

El siguiente factor que consideramos fue el pronóstico a 3 años, el cual incluyó el estatus y el estado de los pacientes. Consideramos así, el hecho de que estuvieran vivos o hubieran fallecido junto con el hecho de presentar o no enfermedad al momento de la defunción en este periodo de tiempo.

Los resultados para HMMR no muestran una diferencia significativa entre los pacientes positivos y negativos a la expresión de ambas variantes respecto al pronóstico en los primero 3 años (tabla 19, anexo II). Sin embargo, cabe señalar que el resultado de esta prueba es debatible pues un 20% de los grupos formados contienen a menos de 5 pacientes por lo que no es posible asociar este parámetro y no fue requerida ya la prueba de Fisher.

Para el caso de CENPE se presentó algo similar pues 20% de los grupos contenían un rango menor de pacientes sin embargo, se observa una $p < 0.05$ por lo que podemos decir que existe un significado estadístico entre la expresión de las variantes de CENPE con el pronóstico. En relación con el resultado obtenido de evaluar solamente la condición de enfermedad a los 3 años (tabla 18)

Tabla 20. Resultado prueba ji cuadrada para la relación CENPE – estatus del paciente

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	6.472	0.0393*
Pearson	6.275	0.0434*

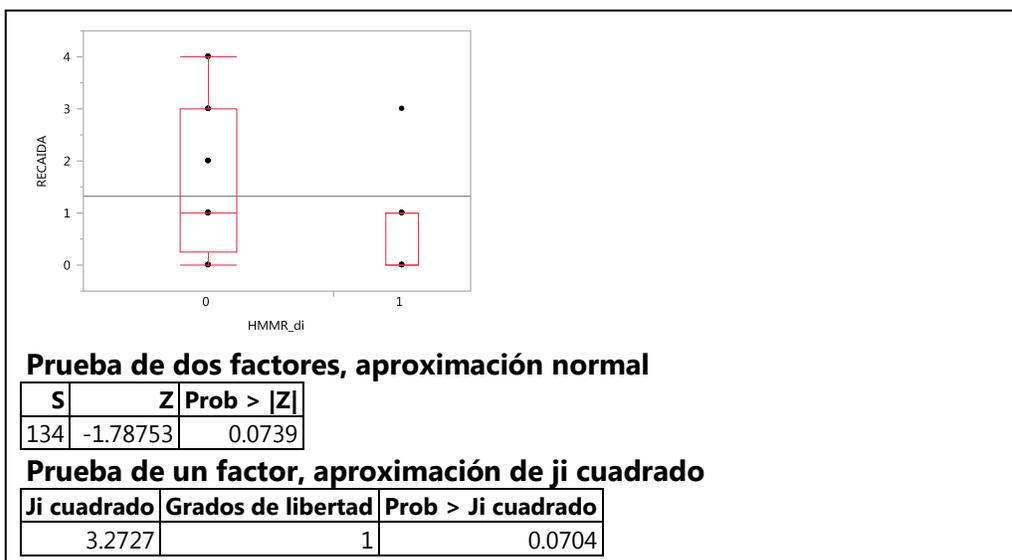
Advertencia: el 20% de las celdas tienen un conteo esperado inferior a 5, ji cuadrado problemático.

De acuerdo con estos resultados podemos inferir que aquellos pacientes que expresan alguna de las variantes de CENPE presentan un peor diagnóstico que aquellos pacientes que no lo hacen. Es decir, con base en estos resultados la expresión de CENPE en pacientes con LLA y considerando los resultados de la enfermedad a 3 años, se puede atribuir a CENPE como un marcador de mal pronóstico para los pacientes. Sin embargo es necesario aumentar el número de muestras para esclarecer este primer acercamiento y establecer un mayor impacto estadístico.

Otro factor muy importante para el pronóstico de los pacientes, son las posibles recaídas que presenten los pacientes pues éstas se consideran como de mal pronóstico (Ortega Sánchez, Osnaya Ortega, & Rosas Barrientos, Leucemia Linfoblástica Aguda, 2007); lo que provoca que se deba re-inducir el tratamiento con dosis o medicamentos más fuertes. Una recaída (reinducción) se considera cuando el conteo de blastos en médula ósea sobrepasa el 5% (Campbell B., Ferreiro C., Tordecilla C., Joannon S., Rizzardini L. , & Rodríguez Z., 1999).

Para evaluar la relación entre la expresión de los genes (HMMR y CENPE) con el número de recaídas que presentaron los pacientes, utilizamos la prueba estadística de Wilcoxon y Kruskal con ji cuadrada. En dicha prueba las variables a considerar fue la expresión dicotómica del gen (si = 1, no = 0) respecto la cantidad de recaídas, este número se obtuvo tras la revisión de los expedientes clínicos.

Tabla 21. Resultado prueba relación HMMR – Recaídas.



Primero evaluamos la relación entre las recaídas y la expresión de HMMR, como se puede observar en la gráfica 21 los pacientes con LLA que expresan ambas variantes del gen presentan un menor número de recaídas, si bien el valor de p para esta prueba es de **0.07** siendo cercano a 0.05 puede sugerir un efecto protector de HMMR hacia aquellos pacientes que expresan ambas variantes, disminuyendo el número de recaídas dentro de los primeros 3 años posteriores al inicio del tratamiento.

Posteriormente evaluamos la relación entre las recaídas de los pacientes con respecto a la expresión de alguna o ambas variantes de CENPE encontradas en las muestras de LLA (tabla 22, anexo II).

Como se puede observar en el valor de probabilidad no existe una diferencia significativa, al obtener un valor de 0.1, entre los pacientes con LLA que expresan alguna o ambas variantes de CENPE y aquellos que no lo hacen.

Los resultados anteriores muestran una probable relación entre la expresión de los genes y al menos un dato clínico del paciente.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial muy importante, siendo la Leucemia Linfoblástica Aguda uno de los tipos más comunes a nivel pediátrico. Es importante contar con suficientes herramientas para poder contribuir al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta neoplasia y así, poder disminuir la tasa de mortalidad. Pues es un hecho que aproximadamente el 20% de los pacientes no responde adecuadamente al tratamiento y el resto de ellos, podrá presentar recaídas frecuentes.

Hoy en día se han podido determinar diversos factores y eventos biológicos que podrían ser los causantes del tipo de respuesta que tienen los pacientes ante los tratamientos anticancerígenos, uno de ellos es el *splicing* alternativo.

El proceso de *splicing* alternativo puede dar origen a dos o más variantes y generar diversas secuencias de mRNA, que a su vez codifican para diferentes proteínas que pueden presentar diversas funciones en el organismo. Dichas variaciones pueden ir desde la pérdida de funcionalidad o influir directamente en la actividad de otras proteínas.

La selección de los genes de estudio, surgió a partir de un trabajo realizado previamente en el laboratorio en el que se efectuó un análisis de microarreglos de diversos genes encontrándose HMMR y CENPE como genes potencialmente significativos en un proceso neoplásico (Juárez Méndez, Zentella Dehesa, Villegas Ruiz, Pérez González , & Salcedo, 2013). Se partió de muestras de RNA total el cual incluye todas las variantes posibles de un gen, pues de acuerdo a la literatura estos genes se ven involucrados en el proceso de *splicing* alternativo por lo que la presencia de una o más variantes podría verse directamente involucrada en el proceso neoplásico (Villegas Ruiz, Salcedo, Zentella Dehesa, Montes de Oca , & Juárez Méndez, 2014).

El principal objetivo de este trabajo fue identificar las variantes de mensajero de dos genes que sufren *splicing* alternativo en muestras de pacientes con LLA, y que pudieran tener influencia en la respuesta al tratamiento y a su vez el pronóstico de los pacientes.

De acuerdo al diseño previo de los primers para HMMR (Villegas Ruiz, Salcedo, Zentella Dehesa, Montes de Oca , & Juárez Méndez, 2014), se sabe que estos debían detectar las tres variantes codificantes del gen sin embargo, dado que la diferencia entre las variantes 1 y 2, producida por *splicing* alternativo, es de tres nucleótidos, es posible que las bandas en el gel de agarosa no se pudieran separar, lo que causó que sólo se vieran dos bandas.

Cabe señalar que para cada una de las muestras positivas a la expresión muestran el mismo patrón, la banda superior con mayor intensidad y la banda inferior con menor. Debido a lo anterior y para descartar que la variante 1 y 2 no se pudieran separar, las bandas encontradas en los geles donde se utilizaron los primers para HMMR, secuenciadas y alineadas con el fin de determinar con mayor precisión que variantes se encontraban presentes en las muestras. El resultado del alineamiento nos arrojó un 100% de similitud entre la banda superior en el gel y la variante 1 del gen; mientras que la banda inferior presenta una similitud del 100% a la variante 3 descrita previamente (Villegas Ruiz, Salcedo, Zentella Dehesa, Montes de Oca, & Juárez Méndez, 2014) por lo que podemos deducir que los pacientes incluidos en el estudio no presentan la expresión de la variante 2, permitiéndonos centrarnos en la variante 1 y 3.

Como se puede observar en la figura 16, el resultado del *splicing* alternativo en HMMR que da origen a estas dos variantes, origina la pérdida completa del exón 4 en la variante 3 por lo que corresponde al tamaño observado en el gel de agarosa. La pérdida de dicho exón ocasiona la diferencia en el tamaño y organización de ambas proteínas codificadas por cada mRNA. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con la localización de las proteínas en la célula, pues de acuerdo a la literatura la proteína codificada por la variante 1 se encuentra en la membrana celular, mientras que la proteína de menor tamaño se encuentra dentro del núcleo (Nikitovic, Kouvidi, Karamanos, & Tzanakakis, 2013).

Como se puede observar en la figura 9, la activación de la proteína localizada en la membrana, desencadena después de diversos procesos, la activación de la proteína codificada por la variante 3 en el núcleo de la célula. Por lo que se podría explicar el motivo por el cual, todas las muestras positivas para la expresión de la variante 1, presentan la co-expresión de la tercer variante, sin embargo la diferencia en la intensidad de las bandas puede estar sujeta a otros factores como la cantidad de transcritos presentes en la célula.

Para el caso de CENPE, es importante mencionar que el diseño de los primers inicial se realizó para la identificación de una sola variante del gen de acuerdo al trabajo previo, sin embargo la presencia de una segunda en algunas de las muestras, nos hace pensar que dentro de la secuencia seleccionada del gen se encuentra una variante no identificada causada por SA y dado que no se expresó en todas las muestras, se generó una mayor diversidad de posibilidades respecto al papel que podría tener CENPE en la LLA.

Debido a lo anterior, purificamos y secuenciamos las bandas, las secuencias resultantes se alinearon con las reportadas en el NCBI (figura 18) y observamos que la banda de mayor tamaño corresponde a una de las variantes previamente reportada en la literatura, realizamos un modelo de *splicing* comparativo entre ambas variantes encontradas en las muestras y observamos la remoción completa del exón 20 en la variante de menor tamaño. Sin embargo para la banda de menor tamaño no se encontró similitud con ninguna de las reportadas por lo que será necesario investigar el papel funcional de dicha variante en la célula.

La gráfica comparativa de la relación entre la expresión y el género del paciente (Figura 20), muestra para HMMR que tanto mujeres como hombres presentan una expresión positiva en menos del 50% de los casos, siendo ésta un 27% y 40% respectivamente por lo que podríamos suponer que la expresión de estas variantes de HMMR no está relacionada con el sexo de los pacientes. Para CENPE se observó que la expresión positiva para las mujeres el 36% y en hombres 40%. Es por esto que optamos por no incluir el sexo de los pacientes al momento de realizar el análisis estadístico para poder así, incluir factores que fueran más relevantes y contribuyeran de manera más oportuna al estudio.

Uno de estos factores son las recaídas, la cual se presenta cuando el conteo de blastos en médula ósea sobrepasa el 5% (Campbell B., Ferreiro C., Tordecilla C., Joannon S., Rizzardini L. , & Rodríguez Z., 1999) pues éstas se consideran de mal pronóstico (Ortega Sánchez, Osnaya Ortega, & Rosas Barrientos, Leucemia Linfoblástica Aguda, 2007); lo que provoca que se deban administrar medicamentos más potentes y/o dosis más fuertes (reinducción). De acuerdo a los expedientes clínicos se puede observar que cerca del 70% de los pacientes presentó al menos una recaída durante el lapso de tiempo considerado en el estudio. Del análisis estadístico podemos destacar que la expresión de ambas variantes de HMMR en el 35.48% de los pacientes, presentan una relación con el número de recaídas que presentaron en los primeros 3 años de inicio del tratamiento.

Se puede observar en la tabla 22, que aquellos pacientes con LLA, que presenten una expresión positiva a ambas variantes del gen, sufren un menor número de recaídas, aunado a esto, la prueba estadística apoya lo antes mencionado. Si bien el valor de p para esta prueba es de 0.07 siendo cercano a 0.05, se pudiera sugerir que aquellos pacientes positivos a la expresión de ambas variantes probablemente tendrán un menor

número de recaídas sin embargo, es importante considerar que este factor depende de muchas otras variables.

Se sabe que la Leucemia Aguda Linfoblástica es causada por un amplio espectro de expresión de diferentes moléculas provocada por la complejidad de la enfermedad misma, se ha observado que un incremento en la concentración del HA extracelular pudiera competir con el HA intracelular (Necas, Bartosikova, Brauner, & Kolar, 2008), esto pudiera explicar porque se observa una mayor intensidad en la banda correspondiente a la variante 1 (presente en la membrana) al expresarse en presencia del hialuronato.

Por otro lado, otra razón por la cual los pacientes que tienen expresión de HMMR presentan menos variante, pudiera ser ocasionado por una diferencia en la estructura secundaria y/o terciaria de las proteínas presentes en los pacientes con LLA a diferencia de otros tipos de neoplasias. Lo anterior, pudiera ocasionar que las proteínas presenten una disminución o cambio en su función evitando la unión de las proteínas en la cascada de señalización (figura 9) y, favoreciendo que los pacientes presenten menos recaídas durante el tratamiento. Sin embargo, debido a que la función del hialuronato en la célula es muy variada, es necesario hacer estudios funcionales para determinar porque se observa una mayor intensidad en la banda superior y por otro lado, determinar la similitud en las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas presentes en la LLA respecto a otros tipos de neoplasias. Aunado a esto, incrementar el número de muestras favorecerá a incrementar el significado estadístico de la prueba.

Por otro lado, evaluamos para ambas variantes de CENPE la relación respecto al estatus que presentaba el paciente, es decir si se encontraba sano o aún con enfermedad en el lapso de los 3 años posteriores al inicio del tratamiento. Una vez que el paciente responde positivamente al tratamiento, se procede a inducir al paciente a remisión, es decir una de las etapas finales en las que se ha observado una mejoría en el estado del paciente con el fin de lograr la remisión completa continua y así describir al paciente como sano.

El resultado de la prueba estadística en cuanto a la expresión de las variantes de CENPE en los pacientes con LLA, sugiere un mal pronóstico; ya que de acuerdo al análisis se observa que los pacientes que presentan la expresión, no alcanzan la remisión completa dentro de los 3 primeros años en contraste con los pacientes que no lo hacen y que logran alcanzar la remisión en este periodo de tiempo. Por lo que podría ser indicio de que si el paciente expresa alguna de las variantes de CENPE no responderá de manera

favorable ante la enfermedad y la remisión de la misma pudiera tardar más o incluso podrían no alcanzarla.

Si bien, se sabe poco sobre el papel que juega CENPE en las células, se sabe que está presente en el checkpoint mitótico por lo que, la presencia de la proteína se ve involucrado en el ciclo celular favoreciendo así, la proliferación celular y a su vez, el mal pronóstico de los pacientes al no poder alcanzar la remisión completa en su tratamiento. No obstante es necesario realizar pruebas que permitan encontrar la función específica de la nueva variante y su relación con la LLA.

En lo que respecta a los otros datos clínicos como el sexo, la respuesta a la ventana de esteroides, inducción a la remisión, el estado del paciente, no se observó una diferencia estadística, esto puede deberse al tamaño de muestra entre cada uno de los grupos.

Cabe señalar que con los resultados obtenidos en esta tesis, se abre la posibilidad a realizar otros experimentos que permitan aclarar algunas de las interrogantes que se generaron durante el desarrollo de la misma. De igual manera, contribuir con una mayor aportación a la medicina pues, la leucemia aguda linfoblástica es una de las neoplasias más comunes en el mundo así como de mayor complejidad.

CONCLUSIONES

- Se encontró la expresión positiva para HMMR en el 35.5% de las muestras de LLA en las que se presentó la co-expresión de dos variantes del gen. De acuerdo al alineamiento de las secuencias, se muestra la presencia de las variantes 1 y 3 reportadas para este gen.
- La expresión de HMMR se relaciona con una disminución en la cantidad de recaídas que sufren los pacientes, favoreciendo a su vez, el pronóstico del paciente. Sin embargo, esta relación muestra un bajo impacto estadístico por lo que es necesario incrementar el número de muestras para determinar si esta hipótesis es cierta.
- Para CENPE se observa la expresión en el 38.7% de las muestras de LLA en donde, el 16% de ellas únicamente expresó la variante 1 reportada en el NCBI.
- El 84% de los pacientes presentó para CENPE una segunda variante la cual, de acuerdo al resultado obtenido en la secuenciación, mostró la presencia de una nueva banda no reportada en el NCBI, por lo que se deberá caracterizar dicha variante y determinar su función, localización celular, etc.
- La presencia de las variantes de CENPE en las muestras, de acuerdo al análisis estadístico se puede asociar con el mal pronóstico en los pacientes con LLA; ya que refleja que los pacientes que expresan las variantes no alcanzan la remisión completa dentro de los 3 primeros años respecto a los pacientes que no lo hacen.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo buscan sentar las bases para proponer a HMMR y CENPE como potenciales marcadores en LLA, los cuales se relacionan con el pronóstico de los pacientes diagnosticados con dicha neoplasia. Sin embargo, debido a que el impacto estadístico no es suficiente, es necesario incrementar el número de muestras y de esta forma dilucidar la importancia de la detección de HMMR y CENPE al momento de diagnosticar la enfermedad.

Por otro lado, es necesario caracterizar la nueva variante de CENPE, determinar su función biológica y las vías de señalización en las que interviene.

BIBLIOGRAFÍA Y PÁGINAS CONSULTADAS (en orden alfabético)

- American Cancer Society. (11 de 11 de 2013). *American Cancer Society*. Recuperado el 07 de 12 de 2013, de <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002289-pdf.pdf>
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F., & Hart, I. R. (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *Journal of Cell Science*, *112*, 3943 - 3954.
- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (Enero de 2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children. *Environmental Health Perspectives*, *115*(1), 138 - 145.
- Bertram, J. S. (2000). The Molecular Biology of Cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, *21*(6), 167 - 223.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, *72*, 291 - 336.
- Campbell B., M., Ferreiro C., M., Tordecilla C., J., Joannon S., P., Rizzardini L., C., & Rodríguez Z., N. (1999). Leucemia Linfoblástica Aguda. Características al diagnóstico en 100 niños. *Revista Chilena de Pediatría*, *70*(4), 288 - 293.
- Clancy, S. (2008). RNA Splicing: Introns, Exons and Spliceosome. *Nature Education*, *1*(1), 31.
- Cooper, T. A., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2009). RNA and Disease. *Cell*, *136*, 777 - 793.
- Correa González, L. C., Mandeville, P. B., Manrique, D. J., Alejo González, F., Salazar Martínez, A., Pérez Ramírez, O. D., y otros. (2005). Valor pronóstico del inmunofenotipo en la respuesta temprana de la leucemia aguda linfoblástica pre-B en niños. *Gac. Méd. Méx*, *141*(6), 477 - 482.
- Encina, G. (2013). Molecular Biology in Oncology: what a physician should know. *Rev. Med. Clin. Condes*, *24*(4), 563 - 570.
- Fajardo, G. A., Juárez, O. S., González, M. G., Palma, P. V., Carreón, C. R., & Mejía, A. J. (2007). Incidencia general y específica de cáncer en niños derechohabientes del IMSS. *Revista Médica del IMSS*, *45*(6), 579 - 592.
- Faustino, N. A., & Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development*, *17*, 419 - 437.
- Gerstein, M. B., Bruce, C., & Rozowsky, J. S. (2007). What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *GENOME RESEARCH*, *17*, 669 - 681.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*(144), 646 - 674.
- Hurtado Monroy, R., Solano Estrada, B., & Vargas Viveros, P. (Marzo - Abril de 2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM*, 55(2), 11 - 25.
- INEGI. (2011). *INEGI*. Recuperado el 12 de febrero de 2014, de <http://www.inegi.org.mx/>
- Ishigami, S., Ueno, S., Nishizono, Y., Matsumoto, M., Kurahara, H., Arigami, T., y otros. (2011). Prognostic impact of CD168 expression in gastric cancer. *BMC Cancer*, 11(106), 1 - 5.
- Juárez Méndez, S., Zentella Dehesa, A., Villegas Ruíz, V., Pérez González, O. A., & Salcedo, M. (2013). Splice variants of zinc finger protein 695 mRNA associated to ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 61(6), 10 p.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2005). ON THE ROAD TO CANCER: ANEUPLOIDY AND THE MITOTIC CHECKPOINT. *Nature Reviews Cancer*, 5, 773 - 785.
- Larson, R. A. (2011). Leucemia Linfoblástica Aguda. *Leukemia & Linfoma Society*, 13 - 22.
- Lodish, H., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., y otros. (2008). *Molecular Cell Biology* (6a ed.). Nueva York, EUA: W. H. Freeman Publishers.
- Morceau, F., Chateauvieux, S., Gagneaux, A., Dicato, M., & Diederich, M. (2013). Long and Short Non-Coding RNAs as Regulators of Hematopoietic Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14744 - 14770.
- NCI. (2014). *National Cancer Institute*. Recuperado el 20 de Mayo de 2014, de <http://www.cancer.gov/>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 8(53), 397 -411.
- Nikitovic, D., Kouvidi, K., Karamanos, N., & Tzanakakis, G. (2013). The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression. *BioMed Research International*, 2013(929531), 12.
- Ortega Sánchez, M. A., Osnaya Ortega, M. L., & Rosas Barrientos, J. V. (2007). Leucemia Linfoblástica Aguda. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26 - 33.
- Ortega Sánchez, M. A., Osnaya Ortega, M. L., & Rosas Barrientos, J. V. (2007). Leucemia Linfoblástica Aguda. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26 - 33.
- Pajares, M. J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R., & Montuenga, L. M. (2007). Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *The Lancet Oncology*, 8(4), 349 - 357.

- Slander, D., & Ross, J. (1997). Epidemiology of Acute Leukemia in children and adults. *Semin Oncol*, 24, 3 - 16.
- Srebrow, A., & Kornblihtt, A. (2006). The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science*, 119(13), 2635 - 2641.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Médica Panamericana.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., y otros. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291, 1304.
- Villegas Ruiz, V., Salcedo, M., Zentella Dehesa, A., Montes de Oca, E., & Juárez Méndez, S. (2014). A case of cervical cancer expressed three mRNA variant of Hyaluronan-mediated motility receptor. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(5), 2256 - 2264.
- Watson, P. M., & Watson, K. (2010). Alternative Splicing in Prostate and Breast Cancer. *The Open Cancer Journal*(3), 62 - 76.
- Weaver, B. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J., Silk, A. D., & Cleveland, D. W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *The Journal of Cell Biology*, 162(4), 551 - 563.
- WHO. (2014). *World Health Organization*. Recuperado el 13 de Junio de 2014, de <http://www.who.int/en/>
- Zhou, R., Wu, X., & Skalli, O. (2002). The hyaluronan receptor RHAMM/IHABP in astrocytoma cells: expression of a tumor-specific variant and association with microtubules. *Journal of Neuro-Oncology*, 59, 15 - 26.

ANEXOS

ANEXO 1. BASE DE DATOS

Vial	Número de Expediente	Género	Edad Diag.	Fecha Dx	Dx	Estatus	Edad Def	Fecha Def	Resp. Ventana a Est.	Blastos (%)	Ind. Remisión	Reinducción	#Reinduccion
126	452288	M	11	jul-07	LLA L1 PreB	VsE	-	-	No	90	Si	Si	1
128	453254	M	9	ago-07	LLA	McE	12	dic-10	Si	70	Si	Si	4
130	453531	M	19	sep-07	LLA Preb	VsE	-	-	No	80	Si	No	0
132	453796	F	5	oct-07	LLA L1 preB	VsE	-	-	SI	98	SI	Si	4
139	456734	M	4	abr-08	LLA	McE	6	jul-10	Si	36	No	No	1
141	457723	F	3	jul-08	LLA	VsE	-	-	Si	51	Si	Si	4
142	457936	M	13	jun-06	LLA	McE	15	oct-10	SÍ	99	No	Si	1
144	457341	F	6	may-08	LLA L1 PreB	VcE	-	-	No	95	No	Si	1
157	454271	M	8	oct-07	LLA	McE	8	nov-07	No	96	No	No	0
164	457206	F	2	may-08	LLA L1 AR	VsE	-	-	No	88	Si	Si	3
173	458373	M	8	jul-08	LLA	VsE	-	-	Si	81	Si	Si	3
175	458826	M	12	ago-08	LLA	McE	13	sep-09	Si	80	No	Si	3
183	457792	F	9	jun-08	LLA preB	VsE	-	-	Si	87	Si	Si	1
202	458161	M	3	jul-08	LLA L1 AR	VsE	-	-	SÍ	91	No	No	0
212	458335	M	3	jul-08	LLA preB	VcE	-	-	No	80	Si	Si	3
218	458359	M	5	jul-08	LLA	VsE	-	-	Si	90	Si	No	0

248	459679	M	15	oct-08	LLA-L1	VsE	-	-	Si	90	No	No	0
250	459846	M	3	oct-08	LLA pre B	McE	6	ene-12	SÍ	90	sí	Si	2
260	456051	F	9	mar-08	LLA L1	MsE	11	ago-09	Si	28	SI	No	0
280	460428	F	11	dic-08	LLA L1 DE AR	VsE	-	-	No	100	SÍ	No	0
316	460847	F	2	ene-09	LLA.L1	VcE	-	-	SÍ	99	Sí	Si	1
342	461351	M	9	may-07	LLA-L1 DE AR	Vse	-	-	Sí	72	Sí	Si	2
350	457757	M	14	jun-08	LLA	VcE	-	-	Si	88	Si	No	0
371	461771	F	4	mar-09	LLA L1	Vse	-	-	Si	70	si	Si	1
379	461887	M	8	mar-09	LLA preB AR	McE	10	ago-11	Si	100	Si	Si	1
397	462189	F	4	abr-09	LLA preB AR	VsE	-	-	Si	91	Si	Si	1
417	462524	M	4	ene-09	LLA L1	Vse	-	-	Si	100	Si	Si	1
468	462647	F	4	may-09	LLA L1	VsE	-	-	Si	79	Si	No	0
712	464129	M	8	ago-09	LLA PreB	VsE	-	-	Si	57	Si	Si	1
748	464885	M	1	ago-09	LLA L1	VsE	-	-	No	ND	Si	Si	3
776	465227	M	4	sep-09	LLA L1	VsE	-	-	No	57	Si	Si	0

ANEXO 1. BASE DE DATOS (continuación)

Vial	Número de Expediente	Inicio de Ventana	Fecha 1ra reinducción	Días a la 1ra reinducción	Fecha defunción	Días a la defunción	HMMR	CENPE	CENPE Banda 1	CENPE Banda 2
126	452288	11 07 07	27 03 08	260			-	-	-	-
128	453254	24 08 07	15 10 08	418	04 12 10	1198	-	-	-	-
130	453531	07 09 07					-	-	-	-
132	453796	03 10 07	20 10 08	383			-	-	-	-
139	456734	09 04 08	02 07 08	84	21 07 10	833	+	-	-	-
141	457723	04 07 08	22 04 09	292			-	-	-	-
142	457936	24 06 08	20 03 09	273	14 10 10	842	+	-	-	-
144	457341	20 05 08	14 12 09	573			-	+	+	-
157	454271	29 10 07			05 11 2007	7	-	+	+	+
164	457206	13 05 08	27 01 09	259			+	-	-	-
173	458373	29 07 08	08 01 10	528			-	-	-	-
175	458826	19 08 08	13 05 09	267	06 09 09	394	-	+	+	+
183	457792	26 06 08	25 04 09	303			-	-	-	-
202	458161	10 07 08					+	+	+	+
212	458335	22 07 08	26 03 09	247			+	+	+	+
218	458359	23 07 08					+	+	+	+
248	459679	09 10 08					-	-	-	-
250	459846	27 10 08	01 08 10	612	22 12 12	1517	+	+	+	+
260	456051	25 02 08			16 08 09	538	+	+	+	-
280	460428	03 12 08	16 02 11	805			-	+	+	+
316	460847						+	+	-	+
342	461351	15 05 07	03 12 08	568			-	+	-	+

350	457757	25 06 08					+	+	+	+
371	461771	12 03 09	01 10 09	203			-	-	-	-
379	461887	16 03 09	16 02 11	702	08 08 11	875	-	-	-	-
397	462189	03 04 09	30 10 09	241			-	-	-	-
417	462524	29 04 09	15 07 11	807			-	-	-	-
468	462647	01 07 09					-	-	-	-
712	464129	10 08 09					+	-	-	-
748	464885	30 09 09	19 05 10	231			-	-	-	-
776	465227	20 10 09					-	-	-	-

ANEXO II. RESULTADOS PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Tabla 15. Resultado de las pruebas estadísticas, relación HMMR-Muerte a 3 años

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	0.967	0.3255
Pearson	0.992	0.3191

Prueba exacta de Fisher	Prob.	Hipótesis alternativa
Izquierda	0.9213	Prob (MUE3ANS=1) es mayor para HMMR_di=0 que para 1
Derecha	0.2814	Prob (MUE3ANS=1) es mayor para HMMR_di=1 que para 0
Bilateral	0.4055	Prob (MUE3ANS=1) es distinta en HMMR_di

Tabla 16. Resultado de las pruebas estadísticas para la relación CENPE – Muerte a 3 años

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	0.570	0.4502
Pearson	0.579	0.4466

Prueba exacta de Fisher	Prob.	Hipótesis alternativa
Izquierda	0.8807	Prob (MUE3ANS=1) es mayor para CENPE_di=0 que para 1
Derecha	0.3625	Prob (MUE3ANS=1) es mayor para CENPE_di=1 que para 0
Bilateral	0.6757	Prob (MUE3ANS=1) es distinta en CENPE_di

Tabla 17. Resultado pruebas estadísticas para la relación HMMR – enfermedad a 3 años

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	0.606	0.4364
Pearson	0.606	0.4362

Prueba exacta de Fisher	Prob.	Hipótesis alternativa
Izquierda	0.8760	Prob (ENF3A_N=1) es mayor para HMMR_di=0 que para 1
Derecha	0.3435	Prob (ENF3A_N=1) es mayor para HMMR_di=1 que para 0
Bilateral	0.4775	Prob (ENF3A_N=1) es distinta en HMMR_di

Tabla 19. Resultado prueba estadística relación HMMR – estatus del paciente

Prueba	Ji cuadrado	Prob > Ji cuadrado
Razón de verosimilitud	1.678	0.4321
Pearson	1.671	0.4337

Advertencia: el 20% de las celdas tienen un conteo esperado inferior a 5, ji cuadrado problemático.

Tabla 22. Resultado estadístico CENPE – Recaídas.

