



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

*TESIS*

*ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/MTOR ASOCIADA AL DESARROLLO  
DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LINFOCITOS B*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ANA MARÍA HERNÁNDEZ JIMÉNEZ**

**ASESOR DE TESIS**

**DRA. REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS  
**VOCAL:** Profesora: REBECA PÉREZ CABEZA DE VACA  
**SECRETARIO:** Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ  
**1er. SUPLENTE:** Profesora: MARISOL HERNÁNDEZ SALAS  
**2º SUPLENTE:** Profesora: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE”, INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO. LABORATORIO DE ONCOINMUNOLOGÍA**

**ASESOR DEL TEMA:**

Rebeca Pérez Cabeza de Vaca

**SUSTENTANTE:**

Ana María Hernández Jiménez



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 LINFOCITOS	12
1.2 ONTOGENIA DE LINFOCITOS	15
1.3 LINFOCITOS B	16
1.4 RECEPTOR DE CÉLULAS B/SEÑALIZACIÓN DE LINFOCITOS B	18
1.5 LEUCEMIA	22
1.6 ETIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA	23
1.7 CLASIFICACIÓN DE LEUCEMIAS	24
1.8 ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS	27
1.9 DATOS DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LEUCEMIA	27
1.10 TRATAMIENTO DE LEUCEMIAS	28
1.11 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	29
1.12 VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/mTOR EN LEUCEMIA	31
2. ANTECEDENTES	35
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	39
5. OBJETIVO GENERAL	40
6. OBJETIVOS PARTICULARES	40
7. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO	41
8. ASPECTOS ÉTICOS	43
9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	44
10. RESULTADOS	52
11. DISCUSIÓN	67
12. CONCLUSIONES	74
13. PERSPECTIVAS	76
14. REFERENCIAS	77
15. ANEXOS	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del proceso de linfopoyesis mediante el cual se genera a partir de un progenitor linfoide común (PLC) un precursor linfoide que terminará su diferenciación en célula NK, célula dendrítica, linfocito T o bien, un linfocito B.	17
<b>Figura 2.</b> Receptor de células B y su co-receptor CD21-CD19 necesario para la señalización dependiente de este receptor	20
<b>Figura 3.</b> Cascada de señalización de la vía de señalización de la vía PI3K/Akt/mTOR dependiente de la señalización del receptor de célula B mediada por la molécula CD19	33
<b>Figura 4.</b> Citometría de flujo de muestras de sangre periférica de Controles Clínicamente Sanos (CCS)	54
<b>Figura 5.</b> Citometría de flujo de muestras de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B (LLA-B)	55
<b>Figura 6.</b> Citometría de flujo de muestras de médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B (LLA-B)	56
<b>Figura 7.</b> Citometría de flujo para la identificación de linfocitos B en las muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9)	57
<b>Figura 8.</b> Citometría de flujo para la identificación del porcentaje de células positivas para el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 y el anticuerpo monoclonal	59

anti-fosfo Akt en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9)

**Figura 9.** Citometría de flujo para la identificación del porcentaje de células positivas para el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 y el anticuerpo monoclonal anti-fosfo S6 en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9)

60

**Figura 10.** Citometría de flujo en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-fosfo Akt para la identificación de linfocitos B maduros en los que se encontrara la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activada al estar unidas las proteínas específicas con el anticuerpo específico

61

**Figura 11.** Citometría de flujo en muestras de sangre periférica (SP) de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-fosfo S6 para la identificación de linfocitos B maduros en los que se encontrara la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activada

62

**Figura 12.** Citometría de flujo en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) utilizando los anticuerpos monoclonales

64

anti-CD19 y anti-CD20 para identificar la población de células pre-B y células B maduras, respectivamente

**Figura 13.** Citometría de flujo en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) para la identificación de células pre-B en las que se encontrara activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR al estar presente la unión de ambos anticuerpos en las células de linfocitos B inmaduras

65

**Figura 14.** Citometría de flujo para la identificación de células B maduras en las que se encontrara activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B)

66

#### *ÍNDICE DE CUADROS*

**Cuadro 1.** Clasificación morfológica de Leucemia Linfoblástica Aguda de inmunofenotipo B

26

#### *ÍNDICE DE TABLAS*

**Tabla 1.** Características Sociodemográficas de la Población de estudio

52



## **ABREVIATURAS**

<b>Akt</b>	Proteína cinasa de serina/treonina
<b>Ara-C</b>	Citarabina
<b>BCR</b>	Receptor de Células B
<b>BCR/ABL</b>	Gen de fusión que se forma con la translocación del cromosoma 9 al 22
<b>CCS</b>	Controles Clínicamente Sanos
<b>CD4</b>	Correceptor para la activación de células T restringidas a MHC clase II
<b>CD8</b>	Correceptor para la activación de células T restringidas a MHC clase I
<b>CD19</b>	Parte del correceptor de linfocitos B junto con CD21 y CD81
<b>CD20</b>	Glucoproteína que participa en proliferación y diferenciación de linfocitos B
<b>CD21</b>	Parte del correceptor de linfocitos B junto con CD19 y CD81
<b>CD23</b>	Receptor para IgE de baja afinidad
<b>CD34</b>	Molécula de adhesión, interviene en la inhibición de la diferenciación hematopoyética.
<b>CD79</b>	Componente del receptor para antígeno de célula B análogo a CD3; necesario para la expresión en superficie celular y transducción de señales
<b>CD81</b>	Parte del correceptor de linfocitos B junto con CD19 y CD21
<b>CD90</b>	Glucoproteína coestimuladora de linfocitos
<b>CD117</b>	Receptor de factor de crecimiento hematopoyético
<b>CD133</b>	Marcador de Célula Troncal Hematopoyética sin función conocida
<b>CK2</b>	Cinasa 2
<b>CMN</b>	Centro Médico Nacional
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>CPH</b>	Células Progenitoras Hematopoyéticas

<b>CTH</b>	Células Troncales Hematopoyéticas
<b>CXCL2</b>	Ligando 2 de quimiocina
<b>EBF</b>	Factor de linfocito B Temprano
<b>E2A</b>	Factor que controla la iniciación de la linfopoyesis de linfocitos B
<b>IL-3</b>	Interleucina 3
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>IgD</b>	Inmunoglobulina D
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>GC</b>	Glucocorticoides
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda.
<b>LLA-B</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B.
<b>mTOR</b>	Proteína blanco de rapamicina en células de mamífero.
<b>NK</b>	Célula <i>Natural Killer</i>
<b>pAkt</b>	Proteína cinasa de serina/treonina fosforilada
<b>PAX-5</b>	Factor de transcripción expresado a través de la maduración de linfocitos B (del inglés <i>Paired box protein</i> )
<b>PI3K</b>	Proteína de fosfatidil inositol 3 cinasa.
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>pS6</b>	Proteína cinasa I ribosomal S6 fosforilada
<b>PTEN</b>	Proteína de fosfatidilinositol 3, 4, - trifosfato 3- fosfatasa.
<b>S6</b>	Proteína cinasa I ribosomal S6
<b>SCF</b>	<i>Stem Cell Factor</i>

## RESUMEN

Leucemia es el término general que se usa para referirse a algunos tipos de cáncer de la sangre. Existen cuatro tipos principales de leucemia: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Leucemia Mieloide Aguda (LMA) Leucemia Linfoblástica Crónica (LLC) y Leucemia Mieloide Crónica (LMC). La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y comprende menos del 1% de casos en adultos a nivel mundial, conforme a la Agencia Internacional del Cáncer (IARC). En la LLA hay hasta un 80% de alteraciones cromosómicas presentes, de las cuales, las traslocaciones son las causas más frecuentes, ya que provocan la activación de protooncogenes. La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR está relacionada con la regulación de procesos que involucran el crecimiento y proliferación celular, como son: progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la migración y la síntesis de proteínas. En los últimos años se ha demostrado que la desregulación de esta vía de señalización conlleva su hiperactivación en varios tipos de cáncer y se asocia con la etiología de varios eventos neoplásicos (supervivencia de la célula, proliferación y crecimiento celular). La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR involucra la fosforilación de proteínas como S6 y Akt, esta última fosforilación está asociada con un diagnóstico pobre y resistencia a fármacos en pacientes pediátricos con LLA-B. Por ello, esta vía de señalización ha comenzado a estudiarse como potencial blanco terapéutico en muchos tipos de cáncer, incluyendo la Leucemia Linfoblástica Aguda. En este proyecto se cuantificaron los linfocitos pre-B (CD19+) y maduros (CD20+), donde se obtuvo mayor porcentaje de estas células en pacientes con LLA-B con respecto a CCS (35.76% vs 27.13% y 2.88% vs 2.23%, respectivamente). Además, se determinó la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes con LLA-B y CCS mediante la cuantificación de las proteínas Akt y S6 en su forma fosforilada en linfocitos pre-B y B maduros.

Encontramos que esta vía de señalización se encuentra más activada en pacientes con LLA-B con respecto a CCS, lo cual empata con resultados ya reportados por otros grupos de investigación.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 LINFOCITOS**

El sistema inmune está constituido por células y moléculas responsables de la inmunidad; su respuesta coordinada y colectiva para introducir sustancias del medio exterior se le conoce como respuesta inmune [1]. Una respuesta inmunitaria que resulte exitosa en contra de algún patógeno depende de las diferentes células que lo constituyen, así como de su coordinación para actuar. Esta respuesta se puede dividir en respuesta inmunitaria innata y adaptativa; las células de la inmunidad innata son la primera línea de defensa contra el agente infeccioso, estos mecanismos preexisten en los individuos y actúan de forma inmediata, participan células como macrófagos y granulocitos. La inmunidad adaptativa genera células de memoria que evitan infecciones posteriores, este tipo de inmunidad se produce a lo largo de la vida de un individuo como adaptación a una infección cuando un agente exógeno logra evadir la respuesta inmunitaria innata y es dependiente de la expansión clonal de linfocitos antígeno-específicos; en este tipo de respuesta participan los linfocitos B y T [2].

Los linfocitos forman parte del sistema inmune adaptativo y proporcionan un medio de defensa más versátil y de mayor protección contra reinfección del mismo agente. La inducción de una respuesta inmune adaptativa se da de la siguiente manera: la respuesta comienza cuando un patógeno es ingerido por una célula dendrítica inmadura en el tejido infectado, esta célula dendrítica lleva receptores en su superficie que reconocen las características comunes de muchos patógenos (por ejemplo, proteoglicanos de la pared celular de una bacteria). Al igual que ocurre con los macrófagos y los neutrófilos, la unión de una bacteria o péptidos derivados de éstas a los receptores (comúnmente receptores de

tipo Toll), la célula dendrítica se estimula y degrada el agente exógeno intracelularmente. Una vez que esto ocurre, la célula dendrítica se activa y se traslada hacia un ganglio linfático que se encuentre cercano. En la activación, la célula dendrítica va a madurar convirtiéndose en una célula presentadora de antígenos (CPA) bastante efectiva. Además, experimenta cambios que le permiten activar linfocitos específicos en contra de agentes patógenos que se encuentran en el ganglio linfático [1,2,3].

Los linfocitos se desarrollan a partir de progenitores linfoides inmaduros y se dividen en dos grupos dependiendo de la región donde maduran, si ocurre en la médula ósea se le llama linfocitos B, o bien, en el timo y son llamados linfocitos T. Los linfocitos B son células que se especializan en la producción de anticuerpos mientras que los linfocitos T son las células responsables de las respuestas inmunes adaptativas [1,3].

Cada linfocito *naive* que entra en el torrente sanguíneo tiene receptores de antígeno específicos. La especificidad de dichos receptores está determinada por un mecanismo genético único presente durante el desarrollo de linfocitos para generar millones de variantes diferentes de los genes que codifican para las moléculas receptoras.

Los linfocitos B, también conocidos como células B son un componente esencial del sistema inmunitario adaptativo (antes llamado sistema inmunitario humoral). Son células fisiológicamente importantes ya que sus funciones principales son la producción de anticuerpos y citocinas, también funcionan como células presentadoras de antígeno profesionales a los linfocitos T [4] y en algunas ocasiones, transformarse en linfocitos B o T de memoria después de ser activadas por la interacción con un antígeno. Molecularmente se definen por tener reordenados los genes para el receptor de las células B (BCR) [5].

Desde un enfoque fisiopatológico, los linfocitos B son de suma importancia para la salud, ya que si hay defectos en su función pueden representar consecuencias clínicas como alteraciones por defecto o alteraciones por hiperactividad. En el primer grupo los linfocitos B causan inmunodeficiencias humorales, mientras que en el segundo grupo los linfocitos B pueden presentar autoinmunidad o hipersensibilidad (alergias). Por otro lado, cabe resaltar, que las neoplasias en estas células son frecuentes, posiblemente por los eventos de traslocación génica y las fases en las que los linfocitos B proliferan de manera activa [5,6].

El proceso de maduración de los linfocitos B tiene como resultado la producción de células B plasmáticas y de memoria. Dicho proceso puede dividirse en tres etapas: 1) Generación de células B maduras inmunocompetentes (maduración), 2) Activación de células B maduras cuando interactúan con antígeno y 3) Diferenciación de células B activadas en células plasmáticas y de memoria [1,2].

La maduración y diferenciación de los linfocitos B se lleva a cabo mediante dos procesos. El primero de estos se produce en la médula ósea, por lo tanto, las células no están expuestas a los antígenos y el segundo proceso de maduración se produce en el ganglio linfático. En esta última etapa es donde las células B se diferencian en células plasmáticas o en células B de memoria. El primer proceso de maduración es independiente del antígeno, al producirse en la médula ósea al igual que las demás células sanguíneas. Por el contrario, el segundo proceso de maduración se conoce como dependiente del antígeno porque se produce después de que se activan los linfocitos B al llevarse a cabo la unión de antígenos y una co-estimulación en el ganglio linfático. Pueden producirse dos tipos de células B en este proceso de maduración, las células plasmáticas y las células B de memoria.

El origen y diferenciación de las células B ocurre en el embrión entre la semana 8 y 9 en el saco vitelino, el hígado fetal y la médula ósea, y estos procesos continúan a lo largo de la vida en la médula ósea [2,7]

## **1.2 ONTOGENIA DE LINFOCITOS**

La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se generan y proliferan los componentes celulares del tejido sanguíneo (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). Esta formación de células sanguíneas se produce durante el desarrollo embrionario y durante la etapa de adultez con la finalidad de producir y reponer las células del sistema sanguíneo. Este desarrollo de células hematopoyéticas en un proceso ordenado regulado por factores intrínsecos y microambientales que ocurre en la médula ósea [8,9].

El sistema hematopoyético se puede dividir con base al grado de madurez de las células que lo conforman y a los distintos linajes celulares que se generan. De acuerdo con el grado de maduración celular se dividen en Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) y corresponden al 0.01% del total de células con núcleo en médula ósea; estas células son capaces de auto renovarse (al menos una de las células hijas mantiene las propiedades de la célula madre) y son multipotenciales, es decir, pueden dar origen a distintos linajes de células sanguíneas.

Las CTH carecen de expresión de marcadores de linajes maduros. En el humano, el principal marcador del linaje de células troncales hematopoyéticas y progenitores multipotenciales es el antígeno CD34, además de éste, pueden expresar antígenos como CD90, CD117 y CD133.

Las CTH originan a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) que corresponden a menos del 0.5% del total de células en médula ósea. También expresan el antígeno CD34 y marcadores celulares particulares



de acuerdo con el linaje al que pertenecen. Estas células ya no son autorrenovables, pero conservan el potencial proliferativo. Pueden ser multipotenciales, bipotenciales o monopotenciales.

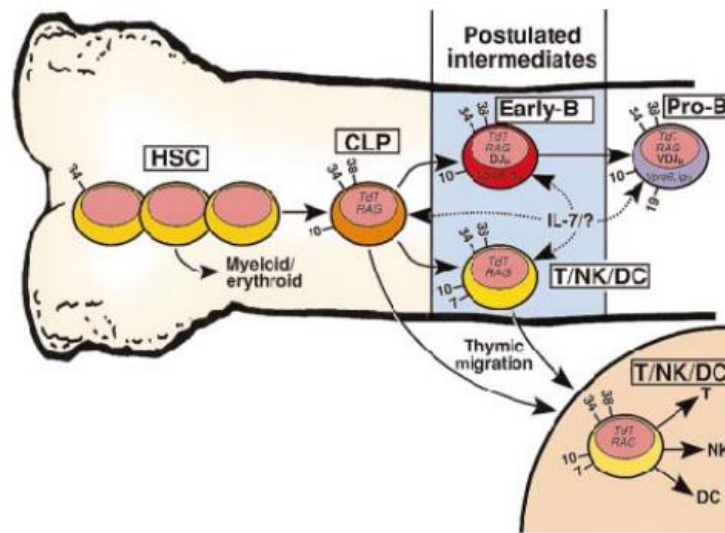
Las CPH dan origen a células precursoras que pueden ser reconocidas por su morfología. Estas células son inmaduras, pero son reconocibles por su morfología al realizar un frotis de médula ósea. Este grupo de células conforma más del 90% de células que se encuentran en la médula ósea. Estos precursores hematopoyéticos originan a las células maduras que conforman el tejido sanguíneo [8].

### **1.3 LINFOCITOS B**

El proceso por el cual se forman los linfocitos se conoce como *linfopoyesis*. A lo largo de éste, la CTH madura y se genera el progenitor linfoide común (PLC) que puede dar origen a linfocitos T, B, células NK (*Natural Killer*) y células dendríticas. El PLC puede generar células B o células T. el progenitor de células B permanece en la médula ósea y expresa los antígenos CD34, CD38, CD10 y CD19. Para su desarrollo y proliferación requieren de la interacción con el estroma de la médula ósea y citocinas como factor de *stem cell* (SCF), interleucina 3 (IL-3), interleucina 7 (IL-7) y CXCL12, estas últimas dos citocinas promueven la diferenciación de los precursores de células B. Además, en los precursores de los linfocitos B los factores de transcripción EBF y E2A inducen el factor de transcripción Pax-5 para iniciar la diferenciación hacia el linaje B [5,7,8,10,11].

El siguiente paso es la generación de los precursores linfoides donde ocurren procesos de recombinación somática para regiones génicas V (variables), D (diversidad), J (unión) que dan lugar a receptores de antígeno y para genes que codifican para inmunoglobulinas en los linfocitos B. Posteriormente, se generan los linfocitos B inmaduros, los cuales tienen en su superficie la inmunoglobulina M (IgM). Una vez que

los linfocitos B presentan en su superficie IgM e inmunoglobulina D (IgD) se conocen como células *naïve* y salen de la médula ósea y migran a circulación sanguínea para alojarse en los órganos linfoides secundarios como ganglios linfáticos, amígdalas y tejido linfoide asociado a mucosas donde continua el proceso de maduración.



*Figura 1. Esquema del proceso de linfopoyesis mediante el cual se genera a partir de un progenitor linfoide común (PLC) un precursor linfoide que terminará su diferenciación en célula NK, célula dendrítica, linfocito T o bien un linfocito B.*

El proceso de maduración puede continuar de dos maneras. La primera ocurre cuando un antígeno se une al BCR y desencadena respuesta antígeno-específica que activa al linfocito B para iniciar la diferenciación y se transforme en célula plasmática secretora de anticuerpos. La segunda, es que la ontogenia de los linfocitos B pueda ser controlada por

el BCR al señalar de manera independiente de antígeno, regulando el desarrollo de estas células [5].

Los linfocitos B producen anticuerpos una vez que se activan. Estos anticuerpos son proteínas específicas en contra de un solo antígeno y son secretados por células plasmáticas, un estadio de diferenciación terminal de los linfocitos B maduros. Las células plasmáticas secretan anticuerpos necesarios para la neutralización de antígenos mediante la unión a éstos. Por otro lado, las células B de memoria, se forman específicamente contra antígenos que fueron encontrados durante la respuesta inmune innata y pueden permanecer en el sistema por mucho tiempo, ya que son importantes para proporcionar inmunidad al responder rápidamente durante una segunda exposición a su antígeno específico [5,7]

Se sabe que los linfocitos B mantienen un rol importante en la modulación de la respuesta inmune sobre el cáncer al ser el segundo linfocito infiltrante en tumor más abundante; suelen estar presentes frecuentemente en muchos tumores en humanos. En algunos tumores pueden impedir la inmunidad antitumoral, mientras que en otras contribuyen a contener el tumor. Por otro lado, estos linfocitos pueden inhibir el desarrollo de tumores a través de la producción de anticuerpos en contra del tumor promoviendo la muerte de éste mediante las células NK, macrófagos y células T CD4+ y CD8+. Sin embargo, también pueden promover el desarrollo de tumores al producir autoanticuerpos y factores de crecimiento tumoral [12].

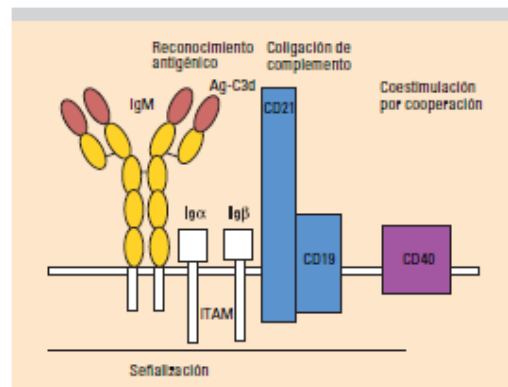
#### **1.4 RECEPTOR DE CÉLULAS B / SEÑALIZACIÓN DE LINFOCITOS B**

Los anticuerpos no sólo son moléculas solubles, también constituyen los receptores de antígeno para los linfocitos B que se encuentran en la superficie de estas células y son capaces de reconocer antígenos y unirse a ellos. El receptor común de Linfocitos T es el llamado BCR que está

presente en su estadio maduro. El BCR está constituido por 2 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Sin embargo, como es una inmunoglobulina, el BCR no tiene la capacidad de transmitir señales al interior de la célula por lo que se asocian a este antígeno otras proteínas, la inmunoglobulina alfa (Iga) y la inmunoglobulina (Igβ), o también llamadas proteínas CD79, las cuales son necesarias para la asociación de los anticuerpos ya que constituyen un complejo supramolecular que funciona como receptor para transducir señales hacia el interior de la célula. La unión del antígeno al receptor genera señales que generan la activación de factores de transcripción nucleares para activar la expresión de un nuevo gen, o bien, desactivar genes típicamente expresados en células en reposo [13,14].

Entonces, en el BCR, las proteínas CD79 medían la transducción posterior de la señal intracelular. Sin embargo, hay otras proteínas implicadas en el proceso de transducción de señales, las cuales constituyen el complejo denominado correceptor y permite al linfocito B activarse. El correceptor se compone de 3 moléculas asociadas de modo no covalente: CD19, CD21 y CD81. La molécula CD21 también es llamada CR2, o receptor del complemento 2, reconoce a la molécula CD23 de las células dendríticas foliculares, o a los fragmentos del componente 3 del complemento. Mientras que la función de CD81 o también llamado TAPA-1 es desconocida hasta el momento. Por otro lado, la molécula CD19 se expresa en todos los linfocitos B maduros y su activación induce la activación de cinasas intracitoplasmáticas [15,16].

El BCR tiene dos papeles en la activación de linfocitos B. El primero es transmitir señales directamente al interior de la célula cuando se une al antígeno a ésta y el segundo, es transportar el antígeno a sitios intracelulares donde se degrada y regresa a la superficie de linfocitos B como péptidos unidos a moléculas de MHC clase II [13].



*Figura 2. Representación del receptor de células B y su co-receptor CD21-CD19 necesario para la señalización dependiente de este receptor.*

La molécula CD19 es una glicoproteína transmembranal de tipo 1 que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Participan en el establecimiento de una respuesta inmune óptima al regular las vías de señalización dependientes e independientes de antígeno del BCR. Además, participan en la activación de los linfocitos B inducidos por inmunoglobulinas. La proteína CD19 está expresada en la mayoría de las enfermedades de linfocitos B, se encuentra en el 80% de las leucemias linfoblásticas agudas, 88% de linfomas de células B y 100% de leucemias con inmunofenotipo B. CD19 se expresa desde el principio hasta el final del desarrollo de células B, es decir, desde los llamados linfocitos pre-B hasta convertirse en células plasmáticas. Además, es un antígeno asociado a tumor contra el cual van dirigidos algunas moléculas anticancerígenas [17].

El antígeno CD20 es una fosfoproteína transmembranal no glicosilada que forma tetrámeros, específica del linaje B, que se expresa durante la diferenciación de células B tanto normales como malignas durante casi todas las etapas de diferenciación a excepción de estadio de células progenitoras y al transformarse en células plasmáticas. Funciona como un canal de calcio y es importante en la progresión del ciclo celular y vías de señalización en la diferenciación de este linaje de linfocitos. CD20 está expresada en la mayoría de las neoplasias de linfocitos B maduros y en algunos casos de leucemias linfoblásticas y linfomas B [18].

Para que inicie la respuesta mediada por el complejo BCR-CD19-CD79 y los linfocitos B se activen, es necesario el contacto directo con el antígeno y el entrecruzamiento de receptores de células B (BCR). Después de dicho entrecruzamiento, y de la activación del correceptor y otras moléculas necesarias para la respuesta, se desencadenan una serie de procesos, que tienen como finalidad enviar señales al núcleo para comenzar activación del linfocito B. Estos procesos involucran una serie de fosforilaciones o defosforilaciones por proteínas tirosina cinasas, entre ellas la cinasa dependiente de inositol trifosfato (PI3K) y algunas otras como Lyn o Syk. Esto conduce a la activación de segundos mensajeros que pueden activar otras cinasas, o bien, unirse a canales de calcio para activarlos, esto incrementa el ión calcio en el citoplasma para activar una serie de proteínas dependientes de  $Ca^{2+}$ . El proceso sigue con una serie de fosforilaciones y defosforilaciones hasta activar determinados factores de transcripción que estaban inactivos. Estos factores de transcripción se translocan al núcleo celular, lo que finalmente conlleva a modificar la expresión de varios genes que permiten el desarrollo de las funciones efectoras de los linfocitos B, así como su reconocimiento y proliferación [19,20].

Durante el proceso de señalización puede ocurrir alguna transformación que conlleve al desarrollo de neoplasias, ya que las vías de señalización involucradas en el desarrollo y proliferación de estas células requieren múltiples eventos de traslocación génica que pueden resultar en transformaciones neoplásicas [5,19].

## **1.5 LEUCEMIA**

La palabra leucemia es un término de origen etimológico griego, donde *leukós* significa *blanco* y *haima* se refiere a *sangre* [20]. El primer caso reportado con esta patología fue descrito en 1845 por John Bennett, cuando realizó la necropsia de un paciente de 28 años y concluyó que había sufrido una transformación en su sistema sanguíneo [21].

Leucemia es el término general que se usa para referirse a algunos tipos de cáncer de la sangre. Existen cuatro tipos principales de leucemia: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Leucemia Mieloide Aguda (LMA) Leucemia Linfoblástica Crónica (LLC) y Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Estos cuatro tipos de leucemias tienen una característica en común: comienzan en una célula en la médula ósea, la cual sufre un cambio que la transforma en una célula neoplásica que al proliferar descontroladamente provoca la leucemia.

Si dicho cambio neoplásico ocurre en una célula de la médula que forma linfocitos, es un tipo de leucemia linfocítica o linfoblástica. Si el cambio celular se da en un tipo de célula de la médula que forma glóbulos rojos, algunos leucocitos (excepto linfocitos) o plaquetas, la leucemia se conoce como mielógena o mieloide. En ambos tipos de leucemias se presentan linfoblastos y mieloblastos, respectivamente, que son las formas inmaduras de las células que están presentes [23,24].

Existen dentro de la clasificación de las leucemias, los términos aguda y crónica. Las formas agudas de leucemia avanzan rápidamente sin tratamiento y en poco tiempo. En cambio, las formas crónicas tienen pocas o ninguna célula blástica, y a menudo progresan lentamente en comparación con las leucemias agudas, incluso sin tratamiento inmediato [23,24].

La Organización Mundial de la Salud, en su clasificación de neoplasias hematopoyéticas y linfopoyéticas, expresa que una leucemia debe identificarse correctamente tomando en cuenta aspectos importantes como la morfología, inmunofenotipo y alteraciones genéticas de las células, sin dejar de lado las manifestaciones clínicas. [25]

## **1.6 ETIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA**

Se han identificado diferentes factores que producen leucemia, entre ellos se encuentra una aberración cromosómica o que ésta involucre la participación de genes mutados. De esta causa, el mecanismo de daño más frecuente es la translocación de cromosomas que ocurre a nivel molecular originando un gen de fusión cuyo producto es una proteína con actividad oncogénica que interfiere con la diferenciación terminal o el gen que puede promover la inducción para la expresión aberrante de protooncogenes [23].

Algunos de los factores involucrados en la aparición de este tipo de cáncer son:

- La radiación ionizante que pudo haber recibido la persona por tratamientos previos con radioterapia.
- Algunos factores genéticos en gemelos univitelinos por inestabilidad cromosómica.



- El Síndrome de Down que aumenta la posibilidad hasta un 20% que en población normal.

Otros factores pueden ser químicos, entre estos se encuentran sustancias químicas como benceno o cloranfenicol y tratamientos previos con quimioterapia donde se utilizan agentes alquilantes (ciclofosfamida, melfalán, bisulfano, clorambucilo) e inhibidores de topoisomerasa (antraciclinas).

O bien, puede presentarse como evolución clonal de enfermedades hematológicas previas de síndromes mielodisplásicos, mieloproliferativos o anemia aplásica [23,24].

## **1.7 CLASIFICACIÓN DE LEUCEMIAS**

Las leucemias se pueden clasificar por etiología o con base en la línea hematológica de origen.

*Etiológica:* pueden ser *de novo*, es decir, de primer diagnóstico; o bien, secundarias como consecuencia de un tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico previo o por la evolución clonal de otra enfermedad hematológica.

*Por su temporalidad:* en agudas o crónicas.

*Según línea hematológica de origen:*

- Leucemia Mieloblástica Aguda. Pertenecen las series eritrocitaria, granulocítica y plaquetaria.
- Leucemia Linfoblástica Aguda: puede ser de linfocitos B o linfocitos T

A su vez, la LLA puede clasificarse de acuerdo con su morfología o marcadores inmunológicos.

*Clasificación morfológica:*

**L1.** Leucemia Aguda de blastos pequeños. Constituye el 75% de las leucemias linfoblásticas agudas. Comprende células pro-B comunes, células pre-B y la presencia de la traslocación t(9;22)BCR/ABL.

**L2.** Leucemia Aguda de blastos grandes. Es el 20% de todas las LLA. se compone del mismo tipo de células y traslocación presente que en la clasificación L1.

**L3.** Leucemia Aguda de tipo Burkitt con citoplasma vacuolado. Es un tipo de LLA madura donde la traslocación t(8;14) está presente y constituye el 5% del total de LLA.

#### *Clasificación inmunológica:*

Se utilizan algunos marcadores inmunológicos que permiten definir la línea linfoide y su estadio de maduración. En esta clasificación se subdividen en:

- **Inmunofenotipo B (LLA-B).** En este inmunofenotipo se encuentran:
  - LALB1. Constituida por células pre-B y pro-B. Es una leucemia en la que se encuentra el precursor linfocitario precoz. Algunos marcadores representativos son: TdT+, CD34+ CD20-
  - LALB2 o común. Estos precursores además son positivos a los marcadores CALLA+ CD10+
  - LALB3. La célula pre-B presenta el estadio con mayor grado de maduración, cadenas pesadas de inmunoglobulinas intracitoplasmáticas que no están presentes en estadios anteriores.
  - LALB4 o de linfocitos B madura (tipo Burkitt). En este tipo de leucemias se encuentran presentes las inmunoglobulinas de superficie positivas, positiva a marcadores de CD20+ (marcador de madurez) y negativos para el marcador TdT.

	CD22 *	CD79a *	CD19	CD45	TdT	CD34	CD10	CD20	Cμ <sup>1</sup>	Sig <sup>2</sup>
B1; pro-B	+	±	+	±	+	+	-	-	-	-
B2; común	+	+	+	±	+	±	++	±	-	-
B3; pre-B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B4; B madura	+	±	+	+	-	-	±	+	-	+

\*citoplasmático

1 cadena pesada de las inmunoglobulinas citoplasmáticas

2 inmunoglobulinas de superficie o cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

*Cuadro 1. Clasificación morfológica de Leucemia Linfoblástica Aguda de inmunofenotipo B*

- **Inmunofenotipo T (LLA-T).** Está definida por marcador citoplasmático CD3+

Los principales marcadores inmunofenotípicos para la LLA-B son CD19, CD20 y CD22. A continuación se presenta una tabla con los marcadores

característicos de cada subclasificación de leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos B.

### **1.8 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS**

En las LLA hay hasta un 80% de alteraciones cromosómicas presentes. Las traslocaciones son más frecuentes ya que provocan la activación de protooncogenes.

Entre las alteraciones citogenéticas presentes en LLA-B se encuentran las numéricas, donde la más frecuente es la hiperploidía (más de 50 cromosomas), la cual se relaciona con pronósticos favorables y es típica en la infancia. Mientras que la hipoploidía se relaciona con un mal pronóstico. Entre las traslocaciones más significativas se encuentran:

- t(9;22) o cromosoma Philadelphia que produce proteína de fusión *BCR-ABL* típica en LMC que confiere peor pronóstico en LLA. Es típica en adultos.
- t(12;21) originan gen de fusión *TEL/AML-1*. Frecuente en LLA infantil y confiere buen pronóstico.
- t(4;11) es típica en población infantil. Está relacionada con la LALB1 o pro-B. Se asocia a un mal pronóstico.
- t(1;19) es frecuente en niños relacionada con mal pronóstico.
- t(8;14) está relacionada con el diagnóstico de la variedad LALB4 o L3.

### **1.9 DATOS DE MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LEUCEMIA**

Algunas de las manifestaciones clínicas que se pueden encontrar son las adenopatías, hepatoesplenomegalia, infiltración en el Sistema Nervioso

Central e infiltración testicular. Esto como consecuencia del desplazamiento progresivo de hematopoyesis normal por los blastos dentro de la médula ósea y otra parte se debe a la infiltración blástica de tejidos u órganos.

Además, al disminuir la hematopoyesis normal se producen citopenias periféricas que culminan en síndrome anémico, neutropenia progresiva con infecciones de repetición y trombopenia con hemorragias.

La infiltración blástica de otros órganos de la LLA produce hepatoesplenomegalia, adenopatías, dolor óseo, infiltración del sistema nervioso central y testicular [24].

Se presentan citopenias en forma de anemias, trombopenias, neutropenias y blastos presentes en sangre periférica. El diagnóstico se basa en una punción medular para determinar la infiltración de blastos superior al 20% [24].

### **1.10 TRATAMIENTO DE LEUCEMIAS**

La finalidad de dar tratamiento a estas leucemias es llegar a una remisión completa, esto quiere decir, se pretende desaparecer signos y síntomas, que la presencia de blastos en medula ósea sea normal, es decir, menor al 5%. Finalmente se espera llegar a la recuperación de la hematopoyesis normal donde no haya blastos circulantes. En la LLA la detección de enfermedad mínima residual tiene importancia pronóstica y decisiones en cuenta a intensificar o modificar el tratamiento, ya que la respuesta que se tenga a la terapia es la variable pronóstica más importante en esta patología [24].

Se consideran de alto riesgo los siguientes factores:

- Niños menores de 1 año o mayores de 9 años
- Adultos mayores de 30 años

- Leucocitosis mayor a 30,000/mm<sup>3</sup> en LLA-B
- Alteraciones genéticas como la traslocación t(9;22) y la hipoploidía t(4;11).
- Respuesta lenta en el día 14 después del tratamiento.
- Enfermedad residual positiva después de haber llevado tratamiento.

El tratamiento se divide en tres etapas

1. **Inducción.** Se da quimioterapia de inducción a la remisión. Los medicamentos utilizados son vincristina, prednisona, L-asparaginasa, antraciclinas, ciclofosfamida.
2. **Consolidación.** Una vez alcanzada la remisión completa se administran fármacos como metotrexato y Ara-C.
3. **Mantenimiento.** Se asocia a medicamentos como 6-mercaptopurina y metotrexato durante dos años. Ocasionalmente se administra vincristina y prednisona.

En el caso de LLA positiva para el cromosoma Philadelphia (Ph+) el tratamiento se asocia con inhibidores de tirosina cinasa con la intención de mejorar la respuesta al tratamiento y supervivencia [24,25].

### **1.11 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

La leucemia aguda es la proliferación clonal de células del sistema hematopoyético caracterizada la mala diferenciación, o bien, el bloqueo de esta característica. Esto tiene como resultado la acumulación de células no diferenciadas en la médula ósea, que reemplazarán a las células hematopoyéticas normales ya que impiden la producción de células sanguíneas de manera normal. En México, la tasa de mortalidad por enfermedades hematooncológicas es de 10%; de ellas, la leucemia aguda

se encuentra entre las primeras 15 causas de mortalidad, que corresponde 5% de causas de mortalidad asociadas con cáncer [26].

Las leucemias agudas constituyen el 3% de todas las neoplasias y el 50% de todas las leucemias. La LLA es más frecuente en niños, la edad a la que se encuentra la mayor cantidad de casos es de 2-3 años. Mientras que la leucemia mieloblástica es más frecuente en adultos a los 60 años en promedio. Por otro lado, dentro de las leucemias linfoblásticas más del 80-85% son de linaje B [25,27].

La leucemia linfoblástica aguda en adultos es un tipo de cáncer que usualmente empeora rápidamente si no se les da algún tipo de tratamiento. En este tipo de cáncer hematopoyético, gran parte de las células hematopoyéticas se convierten en linfoblastos y ya no finalizarán su maduración en algunos de los dos linajes de linfocitos, que pueden ser de linaje B o T. Al aumentar el número de blastos en sangre periférica y la médula ósea, hay menos capacidad para que estos sitios anatómicos sean ocupados por glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas bien desarrollados y diferenciados [28,29].

Algunas de las propiedades que adquieren las células en la leucemia linfoblástica aguda es la ventaja proliferativa por distintos mecanismos, así como la incapacidad para realizar la hematopoyesis normal por lo que persisten estadios inmaduros en forma de blastos. Como parte del diagnóstico se mide la cantidad de blastos en muestra de médula ósea y/o sangre periférica y se considera LLA cuando se encuentran presentes al menos 20% de blastos [28].

También se ha descrito que la proliferación anormal y descontrolada de los progenitores de células B en la LLA-B resulta de la activación

constitutiva de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, ya que esta vía juega un papel central en el crecimiento, proliferación y condiciones fisiológicas y de supervivencia de las células B [29].

### **1.12 VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/Akt/mTOR**

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR está involucrada en la regulación de procesos que involucran el crecimiento y proliferación celular, como son: progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la migración y la síntesis de proteínas. En los últimos años se ha demostrado que la desregulación de esta vía de señalización conlleva a la hiperactivación de ésta en varios tipos de cáncer y se asocia con la promoción de generación de tumores y su relación en la etiología de varios eventos neoplásicos (supervivencia de la célula, proliferación y crecimiento celular, metabolismo, angiogénesis y metástasis) [19, 31].

La fosforilación reversible de lípidos de inositol es un proceso que controla diversas funciones de la célula, tal es el caso del desarrollo y proliferación de los linfocitos B, donde la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR puede activarse cuando un antígeno se une al BCR a través de una serie de fosforilaciones mediadas por proteínas tirosinas cinasas (**Figura 3**). La activación de esta vía por receptor de superficie celular está directamente mediada por las isoformas de clase p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  y p110 $\gamma$ ). Estas subunidades conforman la familia PI3K que consiste en un grupo de enzimas que transducen señales que controlan la proliferación, diferenciación, autorrenovación y supervivencia celular [22,31].

Para que se active esta vía es necesario la presencia de un factor de crecimiento o la unión por receptor de tirosinas cinasas. La unión de un antígeno a los receptores de tirosina cinasa los activa. Una vez que el receptor se activa, la porción intracelular se autofosforila en la subunidad efectora p85 cambiando su conformación para permitir la unión de la



subunidad catalítica p110 (subunidades de PI3K de clase I). Una vez fosforilada la subunidad p110 de PI3K convierte el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) en fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), reclutando una proteína que contenga homología por pleckstrina (PH), esta proteína puede ser la proteína cinasa I dependiente de fosfoinositido (PDK1), la cual fosforila la cinasa de treonina-serina Akt al promover cambios conformacionales en esta proteína, resultando en su fosforilación en el dominio treonina 308. A su vez, Akt activada inicia una cascada de señalización que promueve el incremento en la motilidad, supervivencia y crecimiento de la célula, por lo que Akt puede regular a la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), la cual es el último efector de PI3K. mTOR está conformado por dos complejos: mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 fosforila numerosos sustratos que producen involucrados en el metabolismo anabólico necesarios para el desarrollo y proliferación celular; la cinasa I S6 (S6K1) es el sustrato directo que contribuye a la reprogramación metabólica al incrementar la glucólisis y biosíntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos [30,31,32].

Por otro lado, la proteína PTEN es un gen supresor tumoral, que se encarga de defosforilar PIP3 en PIP2. Sin embargo, la pérdida o disminución de la expresión de PTEN estimula indirectamente la actividad de PI3K, lo que lleva a la activación constitutiva de Akt y a la regulación positiva de la proteína [33].

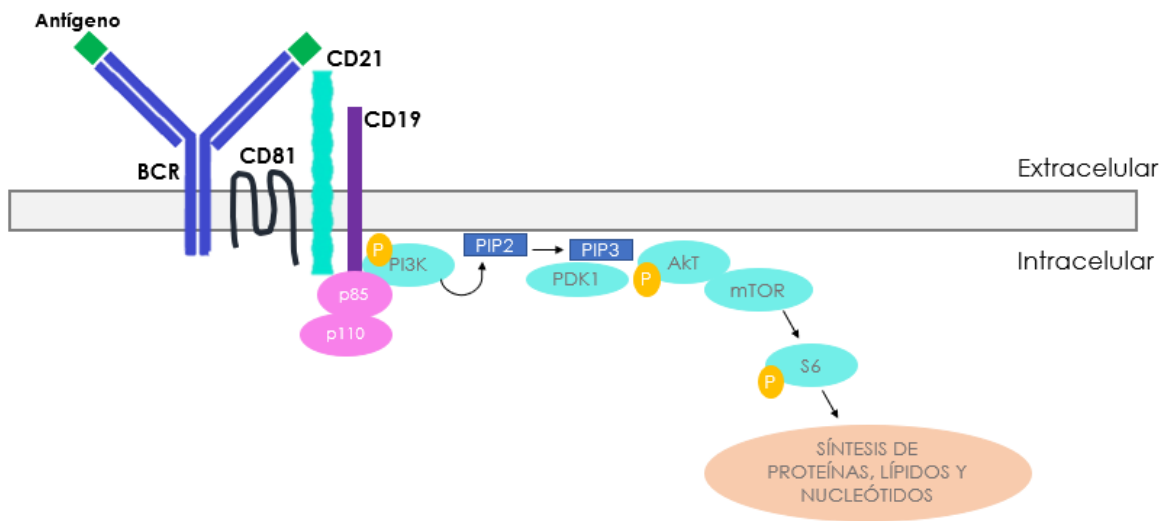


Figura 3. Cascada de señalización de la vía PI3K/Akt/mTOR dependiente de la señalización del receptor de células B mediada por la molécula CD19.

El estudio y evaluación de la vía PI3K/Akt/mTOR así como su activación aberrante se ha descrito en varios tipos de cáncer, debido a que después de p53, es la vía más frecuentemente activada en procesos neoplásicos [22,32,33].

La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR que involucra la fosforilación de la proteína Akt está asociada con un diagnóstico pobre y resistencia a fármacos en pacientes pediátricos con LLA-B. Por ello, la isoforma delta de PI3K, la cual está ligada a hiperactivación de dicha vía al conducir a la hiperproliferación celular, ha comenzado a estudiarse como potencial blanco terapéutico en muchos tipos de cáncer, incluyendo la Leucemia Linfoblástica Aguda. Además, la actividad de PI3K es estimulada por diversos oncogenes y receptores de factores de crecimiento, por lo que el aumento en la señalización de PI3K se considera un *hallmark* de cáncer ya que sus efectores potencian un microambiente que favorece el

desarrollo de tumores para células cancerosas permitiendo su proliferación, progresión y supervivencia [31,32,34].

Se ha encontrado la vía PI3K/Akt/mTOR con frecuencia en estudios a pacientes con LLA-B. Un modelo prominente de activación de PI3K en LLA-B proviene de su activación a través del oncogen *BCR-ABL* en el cromosoma Ph+ LLA-B. En el año de 1995, se demostró que p210 *BCR-ABL* interacciona con la subunidad p85 de PI3K, aumentando así la actividad de PI3K sustancialmente en un modelo de leucemia mieloide crónica. Sin embargo, no quedó claro hasta qué punto estas observaciones podrían transferirse a LLA-B. Se proporcionaron ideas más mecanicistas a través de un modelo murino de Ph + LLA-B con ablación de *Pik3r1* y *Pik3r2*. Sin estos genes que codifican las isoformas reguladoras de PI3K, la transformación mediada por p190 BCR-ABL se vio afectada. Entre las isoformas de la subunidad catalítica de clase I PI3K, p110 $\delta$  es el objetivo más prometedor para la inhibición en LLA-B dada la expresión restringida de la isoforma p110 $\delta$  en leucocitos y su importante papel en la señalización de linfocitos B [30,33,34,35].

La activación de Akt es significativamente más alta en LLA-B en comparación con una médula ósea sana. En pacientes pediátricos con LLA pre-B, el pAkt se correlacionó con una respuesta deficiente a la quimioterapia y la sobreexpresión de pAkt *in vitro* fue suficiente para revertir la inducción de apoptosis por fármacos anti-leucémicos estándar. Por otra parte, en un estudio retrospectivo, pAkt se asoció a la supervivencia general deficiente. Tras la inhibición de mTOR con rapamicina, los blastos de LLA-B demostraron la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo* [22,33].

Las mutaciones PTEN son infrecuentes en LLA-B. PTEN se considera la contraparte de la PI3K oncogénica, pero paradójicamente se encontró que

se sobreexpresaba en blastos de LLA-B. Sin embargo, el aumento de los niveles de PTEN no condujo a una disminución de la fosforilación de Akt sino a un aumento de pAkt. Este efecto paradójico se atribuyó a la disminución de la actividad de la fosfatasa PTEN. CK2 es una cinasa implicada en la fosforilación de PTEN, por lo que el supresor de tumores PTEN está inactivo. En LLA-B, la actividad de CK2 se incrementó y la inhibición restableció la actividad de la fosfatasa de PTEN con la posterior inactivación de Akt. Al igual que la inhibición de PI3K, la inhibición de CK2 fue capaz de inducir apoptosis en LLA-B [35].

## **2. ANTECEDENTES**

El estudio de la vía PI3K/Akt/mTOR en LLA-B ha sido explorado por algunos grupos de investigación. Por ejemplo, en el grupo de Neri utilizaron la molécula RAD001, un inhibidor de mTOR, la cual es citotóxica para las células de diferentes tipos de cáncer incluyendo los diferentes tipos de cáncer hematológicos; el objetivo de esta investigación fue observar si la proteína mTOR que participa durante la activación de la vía PI3K/Akt podía ser un blanco terapéutico. Encontraron que RAD001 disminuyó la viabilidad celular, indujo al arresto del ciclo celular y causó apoptosis en las líneas celulares que utilizaron durante sus experimentos [36].

Otro trabajo relacionado con esta vía de señalización es el de Ye y colaboradores, quienes encontraron que el gen *GZD824*, un inhibidor de la tirosina cinasa de *BCR-ABL*, disminuye la viabilidad celular e induce el arresto del ciclo celular causando apoptosis en los linfocitos B inmaduros en la LLA. Además, este gen inhibe la activación de la vía PI3K/Akt por lo que suprime el crecimiento de células inmaduras de estirpe B [37].

Un problema frecuente en el tratamiento de pacientes con LLA es la resistencia a los fármacos de tipo glucocorticoides (GC) que son

administrados durante esta etapa de la enfermedad. Se sabe que la vía PI3K/Akt/mTOR contribuye en dicha resistencia. Por ello, Evangelisti y su grupo de investigación, analizaron por primera vez el potencial terapéutico que podrían representar los inhibidores de la isoforma de p110 de la proteína cinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K) al usarlos solos o combinados con dexametasona en líneas celulares de LLA-B y células provenientes de muestras de pacientes con LLA-B. Encontraron que un inhibidor de la isoforma p110 tiene efecto citotóxico en las células B de LLA al inducir el arresto de ciclo celular y apoptosis, por lo que podría ser una estrategia potencial de tratamiento para mejorar efectos terapéuticos con GC y/o superar la resistencia a éstos [38].

Dos proteínas involucradas durante la señalización en la vía PI3K/Akt son S6 y Akt, las cuales se encuentran fosforiladas (pS6 y pAkt, respectivamente) cuando está en su forma activa. En el grupo de Simioni administraron diferentes medicamentos de manera sola o en combinación para atacar diferentes blancos terapéuticos conocidos en la LLA-B. Descubrieron las proteínas pAkt y pS6 se desfosforilaron, lo sugiriendo que los compuestos eran citotóxicos para las células de LLA al promover el arresto del ciclo celular y autofagia [39]. Gomes y colaboradores, quienes mediante la técnica de citometría de flujo mostraron que la vía PI3K/Akt se encontraba más activada en pacientes con diagnóstico de LLA-B pues vieron que la actividad de la cinasa CK2 era más elevada mientras que la actividad en la fosfatasa lipídica de PTEN fue más baja en pacientes con la LLA-B en relación con que en los controles sanos. Por lo tanto, dedujeron que la inactivación postraducciona de PTEN está mediada por CK2 que podría estar asociada con la hiperactivación de la vía PI3K/Akt. Por lo tanto, la inhibición de CK2 podría constituir una herramienta terapéutica en la LLA-B [40].

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer provoca alrededor de 8 millones de muertes al año, convirtiéndola en la principal causa de muerte a nivel mundial. Según la agencia de investigación internacional de cáncer (IARC) en su base de datos de incidencia de cáncer en los cinco continentes del año 2003 al 2007, la LLA abarca menos del 1% de cáncer en adultos, mientras que, durante la infancia, se presenta hasta en un 25% de todos los tipos de cáncer y hasta un 80% de las leucemias [41].

En EUA la tasa de incidencia más alta corresponde a la comunidad hispana con 2.7 casos en hombres y 2.2 casos en mujeres por cada 100 000 habitantes. La tasa de mortalidad más elevada se encuentra en la comunidad hispana con 0.8 y 0.6 casos por cada 100 000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. En México hasta el 2014, el cáncer de órganos hematopoyéticos fue la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en pacientes de entre 0 a 19 años con un promedio de 60.15 %. En los pacientes de 0 a 20 años la tasa más alta de mortalidad fue por cáncer de órganos hematopoyéticos -3 casos de cada 100 000 personas [42]. La estimación promedio en la Ciudad de México, fue reportado en 57.6 casos por millón de niños [43], de forma tal que la incidencia de LLA parece ser más alta que en otros países; las defunciones registradas hasta el año 2001, fueron de 2.6 casos por cada 100 000 habitantes, por lo que se consideró la séptima causa de mortalidad, mientras que para el grupo de 5 a 14 años la incidencia de mortalidad fue de 2.6 casos por cada 100 000 y por ende la segunda causa de mortalidad [44].

La leucemia linfoblástica aguda es un tipo de cáncer de órganos hematopoyéticos en el que ocurre una transformación maligna de una célula progenitora linfoide. Se ha encontrado que la vía PI3K/Akt/mTOR con frecuencia en estudios a pacientes con LLA-B está descontrolada y

promueve la proliferación de células malignas de estadio previo CD19 y células B maduras CD20, las cuáles recientemente se están empleando como objetivos terapéuticos para fármacos que podrían regular esta vía y controlar la proliferación de estas células malignas.

#### **4. HIPÓTESIS**

La vía de señalización involucrada con la proliferación celular PI3K/Akt/mTOR de linfocitos B CD19+ y CD20+ de pacientes con LLA-B estará más activada respecto a los linfocitos B de pacientes considerados como controles sanos.



## **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR; dichos marcadores se asociarán con el desarrollo, susceptibilidad y/o protección a Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B.

## **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estandarizar el aislamiento de leucocitos a partir de muestras de sangre periférica y/o médula ósea de pacientes con LLA-B atendidos en el Servicio de Hematología Adultos en el CMN "20 de Noviembre", ISSSTE.
2. Estandarizar el aislamiento de leucocitos a partir de muestras de sangre periférica de Controles Clínicamente Sanos (CCS) obtenidas en el Banco de Sangre del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE.
3. Estandarizar la técnica de citometría de flujo para la identificación de linfocitos B inmaduros (CD19+) y maduros (CD20+), así como aquellos en los que se encuentre activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y que resulten positivas para los anticuerpos anti-fosfo Akt y anti-fosfo S6 en las muestras de pacientes con LLA-B y CCS.
4. Analizar los datos obtenidos a partir de la técnica de citometría de flujo utilizando un software especializado: *FlowJo\_V10*.
5. Relacionar los datos analizados de las muestras de pacientes con LLA-B y CCS con la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, así como con el tipo de cáncer analizado en este estudio (LLA-B).

## **7. DISEÑO Y TIPO ESTUDIO**

El presente es un estudio transversal y analítico.

**Población de estudio:** Pacientes que presenten leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) y un grupo de controles clínicamente sanos (CCS, donadores de banco de sangre). Los candidatos (pacientes y controles) serán invitados a participar en el estudio por medio de una invitación verbal y escrita de los objetivos de investigación, así como lo que implica su participación en ella, posteriormente si aceptan se les pedirá firmar un consentimiento informado, así como aviso de privacidad.

**Universo de trabajo:** Pacientes de cualquier sexo con Leucemia linfoblástica Aguda de linfocitos B (LLA-B) diagnosticados por un especialista, que cuenten con un expediente clínico completo del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE. Debido a que es un estudio pareado se incluirá un grupo de control clínicamente sano tomado del banco de sangre del instituto, del mismo género y edad, de los pacientes.

### **Esquema de selección**

**Definición del grupo control:** Individuos clínicamente sanos que acepten el ingreso al protocolo de estudio y hayan llenado correctamente su consentimiento informado, sin antecedentes familiares de cualquier tipo de cáncer y enfermedades autoinmunes.

**Definición del grupo a intervenir:** Pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B captados en la consulta del Servicio de Hematología en el CMN "20 de Noviembre".

### **Criterios de inclusión**

1. Diagnóstico confirmado de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.
2. Ser paciente del Servicio de Hematología del CMN "20 de Noviembre".
3. Firmar cartas de consentimiento informado y de protección de datos para la inclusión a este protocolo.

### **Criterios de exclusión.**

1. Aquellos pacientes que no cumplan con los criterios de inclusión.
2. Aquellos pacientes que presenten otro tipo de cáncer o tumoración.
3. Aquellos pacientes que no hayan firmado la carta de consentimiento informado y/o el aviso de privacidad.
4. Aquellos pacientes que presenten enfermedades infecciosas como VIH.

### **Criterios de eliminación.**

1. Todo aquel paciente que no desee continuar en el protocolo de investigación o que se reúsen a continuar con el mismo.
2. Aquellos pacientes que no tengan expedientes completos.
3. Todas aquellas muestras que por motivo de toma de muestra o inherente a esta, no puedan procesarse adecuadamente.

**Muestreo no probabilístico:** Muestreo por conveniencia. El reclutamiento será por conveniencia, por la población reducida que se diagnostica y puede considerarse para el presente estudio no se realizó un cálculo de muestra.

## **8. ASPECTOS ÉTICOS**

1. De acuerdo con la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud, se trata de una investigación de riesgo mínimo.
2. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética, Investigación y Bioseguridad del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE (**ANEXO I**).
3. Los pacientes firmarán una carta de consentimiento informado previo a la inclusión del estudio, en donde se les explicará el propósito, los beneficios y riesgos que podrían presentarse en el curso de la investigación, así como también se les informará de sus derechos y responsabilidades al momento de estar incluidos (**ANEXO II**).
4. La decisión de participar en el estudio es responsabilidad solamente de los pacientes o controles, así como de retirarse del estudio cuando así lo deseen, su decisión no afectará de ningún modo la atención que reciben en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE.
5. Los datos recabados se mantendrán de manera confidencial, los datos solo serán manejados por el investigador principal y los investigadores involucrados en el presente protocolo de Investigación del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE. En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley Federal de Protección de Datos: Licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger los datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Toda la información proporcionada se utilizará con fines de investigación y conforme al consentimiento informado (**ANEXO III**).

6. Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud, así como la Declaración de Helsinki.

## **9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

La metodología para este estudio se llevó a cabo mediante un modelo experimental con muestras de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) tomadas de pacientes diagnosticados en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE con LLA-B, de las cuales se separaron los linfocitos B mediante el uso centrifugación diferencial. Se utilizaron anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20, así como un kit de análisis de vías de señalización por citometría de flujo (PI3K/Akt/mTOR) y se probaron la proliferación de las células obtenidas por citometría de flujo y moléculas de señalización intermedias relacionadas a fosforilación involucrados con su capacidad para proliferar y expandirse.

### **Materiales**

- **Material biológico**
  - Muestra de sangre periférica de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfocitos B atendidos en el servicio de Hematología en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.
  - Muestra de médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfocitos B atendidos en el servicio de Hematología en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.
  - Muestra de sangre periférica de donadores voluntarios del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

- **Material de laboratorio**
  - Sistema BD *Vacutainer* ®. Tubos con anticoagulante EDTA-K2.
  - Placa de 96 pozos de cultivo celular con fondo cónico.
  
- **Reactivos**
  - Kit *FlowCelect PI3K-mTOR Signalling Cascade Mapping* kit. Cat. No. FCCS025210
    - *Wash buffer* 1X
    - *Assay buffer* 1X
    - *Permeabilization Buffer* 1X
    - *Fixation Buffer* 1X
  
  - Agua destilada
  - ICF (*Instrument Cleaning Fluid*) Millipore ®
  - PBA 1X (*Protein Blocking Agent*)
  - Buffer de lisis (NH<sub>4</sub>Cl, EDTA, NaHCO<sub>3</sub>)
  - PBS 1X
  - Anticuerpo anti-CD19 (fluorocromo PE)
  - Anticuerpo anti-CD20 (fluorocromo PE)
  - Anticuerpo monoclonal anti-fosfo Akt (fluorocromo PerCP)
  - Anticuerpo monoclonal anti-fosfo S6 (fluorocromo Alexa Fluor 488)

### Preparación de diluciones

- **Dilución 1:10.** Para preparar 10 mL de *Wash Buffer* 1X: 1 mL de *Wash Buffer* 10X + 9 mL de agua destilada.
- **Dilución 1:2.** Para preparar 1 mL de *Fixation Buffer* 1X: 500 µL de *Fixation Buffer* + 500 µL de *Wash Buffer* 1X.

- **Dilución 1:5.** Para preparar 10 mL de *Assay Buffer* 1X: 2 mL de *Assay Buffer* + 10 mL de agua destilada.

## **Equipo**

- Citómetro de flujo *Guava easyCyte TM System de Millipore* ®
- Centrífuga modelo SIGMA 2-5
- Microcentrífuga FORCE MICRO Modelo 1624
- Pipetas marca GILSON de 2 µL, 200 µL y 1000 µL

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

Con previo consentimiento informado y aviso de privacidad firmado por cada paciente con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B y sujeto clínicamente sano se obtuvo una muestra de sangre periférica; en algunos casos se obtuvo muestra de médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.

Las muestras tanto de sangre periférica y médula ósea se recolectaron en tubos del sistema BD *Vacutainer* ® con anticoagulante EDTA-K2 y fueron proporcionadas por un médico residente del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.

Se tomó 1.2 mL de sangre periférica y/o médula ósea del tubo de cada muestra y se depositó en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf) de 1.5 mL. Este tubo se centrifugó a 300 rpm durante 10 minutos.

Se obtuvieron 3 fases después de la centrifugación: plasma, interfase (leucocitos) y paquete globular.

- El plasma se depositó en tubos para microcentrífuga rotulados para su almacenamiento a -80 °C en ultracongelador.
- El paquete globular se desechó correctamente.



- La interfase se separó y depositó en tubo cónico de 50 mL con 25 mL de buffer de lisis, se homogeneizó e incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El tubo con la muestra se centrifugó 1800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y desechó correctamente; el pellet se resuspendió en 10 mL de PBS 1X.

La muestra se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante para desecharlo correctamente. El pellet se resuspendió en 2 mL de PBA 1X y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó la muestra a 1800 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante para desecharlo correctamente. El pellet se resuspendió en 2 mL de PBA 1X. la muestra se separó en dos tubos para microcentrífuga correctamente rotulados para realizar 2 tinciones. Se depositó un mililitro de la muestra en cada uno de los tubos

## **1. TINCIÓN SIMPLE**

La muestra, ya sea sangre periférica o médula ósea de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B o controles clínicamente sanos se dividió de la siguiente manera para realizar una tinción simple con los siguientes anticuerpos: anti-CD19, anti-CD20, anti-fosfo Akt y anti-fosfo S6.

200  $\mu$ L de la muestra de sangre periférica y/o médula ósea para anticuerpo anti-CD19.

200  $\mu$ L de la muestra de sangre periférica y/o médula ósea para anticuerpo anti-CD20.

El volumen restante de la muestra de sangre periférica y médula ósea se juntó para hacer un pool, el cual se dividió en tubos para microcentrífuga de la siguiente manera:

200  $\mu$ L de pool para el anticuerpo anti-fosfo S6

200  $\mu$ L de pool para el anticuerpo anti-fosfo Akt

400  $\mu$ L de pool sin tinción

Se agregó a cada tubo con muestra 2  $\mu$ L del anticuerpo correspondiente. Se incubaron las muestras con el anticuerpo durante 1 hora 30 minutos en oscuridad.

Se centrifugaron las muestras a 1800 rpm durante 5 minutos. Después se decantó y desechó correctamente el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 mL de PBA 1X y se repitió el lavado una vez más. Al final del lavado el pellet se resuspendió en 2 mL de PBA 1X.

Se agregó 30  $\mu$ L de cada uno de los tubos con muestra y 170  $\mu$ L de PBA 1X para depositarlos en una placa de 96 pozos para ser leída en el citómetro de flujo.

## **2. *TINCIÓN CON FlowCollect™ PI3K-mTOR Signaling Cascade (KIT)***

Se centrifugó la muestra a 1800 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de *Wash Buffer* 1X.

La muestra se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de *Fixation Buffer* 1X. Posteriormente se incubó 20 minutos en hielo.

Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de *Wash Buffer* 1X.

La muestra se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ L de *Permeabilization Buffer* 1X y se incubó 20 minutos en hielo.

Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ L de *Wash Buffer* 1X.

La muestra se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500  $\mu$ L de *Assay Buffer* 1X.

Se dividió la muestra en 5 tubos Eppendorf diferentes con 100  $\mu$ L de muestra cada uno. A cada tubo se le adicionaron 2  $\mu$ L de anticuerpo como se indica a continuación:

Tubo 1: anti-CD19/anti-fosfo Akt

Tubo 2: anti-CD19/anti-fosfo S6

Tubo 3: anti-CD20/anti-fosfo Akt

Tubo 4: anti-CD20/anti-fosfo S6

Tubo Sin Tinción

Se incubaron las muestras durante 1 hora 30 minutos en oscuridad. Se realizaron 2 lavados con PBA 1X igual al procedimiento descrito en la Tinción Simple. La muestra se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBA1X y se transfirieron 30  $\mu$ L de la muestra más 170  $\mu$ L de PBA 1X a una placa de 96 pozos para su posterior lectura en el citómetro de flujo.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se evaluó la normalidad de los datos obtenidos a partir de citometría de flujo y se determinó utilizar una *t de student* no pareada de dos colas, con un índice de confianza del 95% con significancia estadística  $p \leq 0.05$ . Para la presentación de los resultados en gráficas se utilizó el programa GraphPad Prisma 6.0

## 10. RESULTADOS

Previa firma de consentimiento informado y aviso de privacidad, se solicitó la donación de muestras para la presente investigación de controles clínicamente sanos reclutados del Banco de Sangre del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE y pacientes diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfocitos B. La población estudiada fue caracterizada, la edad promedio para los pacientes con LLA-B fue de  $42.5 \pm 13.8$  años se trabajó con 10 muestras de pacientes cuyo diagnóstico fue el siguiente: 80% de ellos con LLA de células precursoras B (LLA-B), 10% con Leucemia Mieloblástica Aguda y 10% con Linfoma no Hodgkin; sólo un paciente con LLA-B estaba en tratamiento sin duración especificada. De los 10 pacientes se obtuvieron 9 muestras de sangre periférica y 8 de médula ósea.

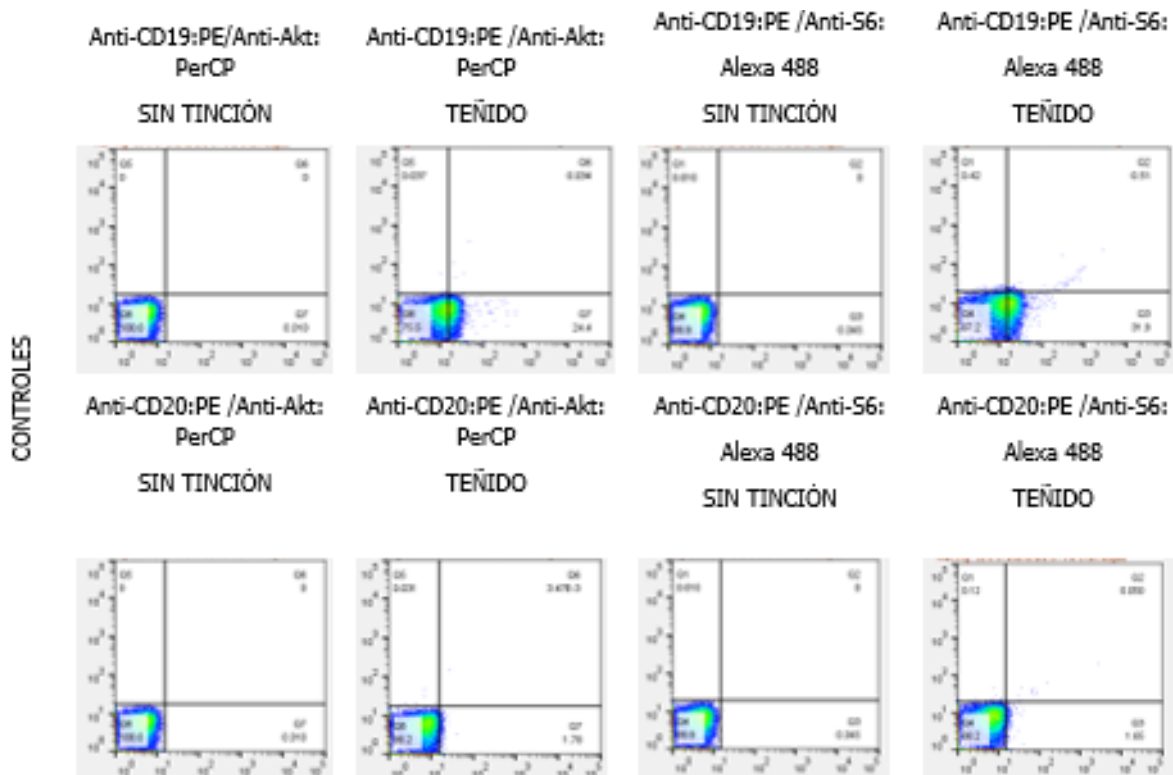
<b>Tabla1. Características sociodemográficas de la Población de estudio</b>	
	<b>Pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B (LLA-B)</b>
	<b>Población n=10</b>
Edad (años)	42.5±13.8
Sexo (M/F)	50%/50%
Diagnóstico* <ul style="list-style-type: none"> <li>• LLA de linfocitos B</li> <li>• Leucemia Mieloide Aguda</li> <li>• LINFOMA NO HODGKIN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>80 %</li> <li>10%</li> <li>10%</li> </ul>
Tipo de muestra <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sangre periférica</li> <li>• Médula ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>90%</li> <li>80%</li> </ul>
Tratamiento <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmunoglobulina anti-timocito, ciclosporina</li> <li>• Ninguno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>10%</li> <li>90%</li> </ul>
*Con apoyo del Servicio de Hematología del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE se accedió al Sistema SIAH de expedientes clínicos	

Una vez realizada la metodología experimental, se analizaron los *dot plots* obtenidos de las células teñidas con el software *FlowJo\_V10\_CL*. Para este estudio se analizaron 10 muestras de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B (LLA-B), de las cuales 9 fueron de sangre periférica y 8 muestras de médula ósea, además, se trabajó con 10 muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (CCS).

A continuación, se muestran imágenes representativas de los gráficos obtenidos, en ellos se observa que es mayor el porcentaje de células positivas de las muestras de sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B con respecto a las muestras de los Controles Clínicamente Sanos para los anticuerpos específicos del linaje B de linfocitos (anti-CD19 para linfocitos pre-B y anti-CD20 para linfocitos B maduros), así como para los anticuerpos de las moléculas involucradas en la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en su forma fosforilada (pAkt y pS6). Para el análisis de cada muestra se utilizó un tubo control, el cual se procesó bajo las mismas condiciones con excepción del marcaje con anticuerpos.

En la **Figura 4** se observan los gráficos de tipo *dot plot* obtenidos a partir de muestras de sangre periférica de los controles clínicamente sanos, en los cuales, la muestra sin tinción se encuentra del lado izquierdo y la que está teñida se encuentra del lado derecho. Se observa que en las muestras no teñidas el porcentaje de células doble positivas, es decir, las células marcadas con el anticuerpo específico del linaje B de linfocitos y con el anticuerpo de la molécula fosforilada involucrada en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, fue cero mientras que en las muestras teñidas con los anticuerpos aumentó ligeramente el porcentaje de células doble positivas, lo que sugiere que en algunas células se encontraba activada la vía PI3K/Akt/mTOR.

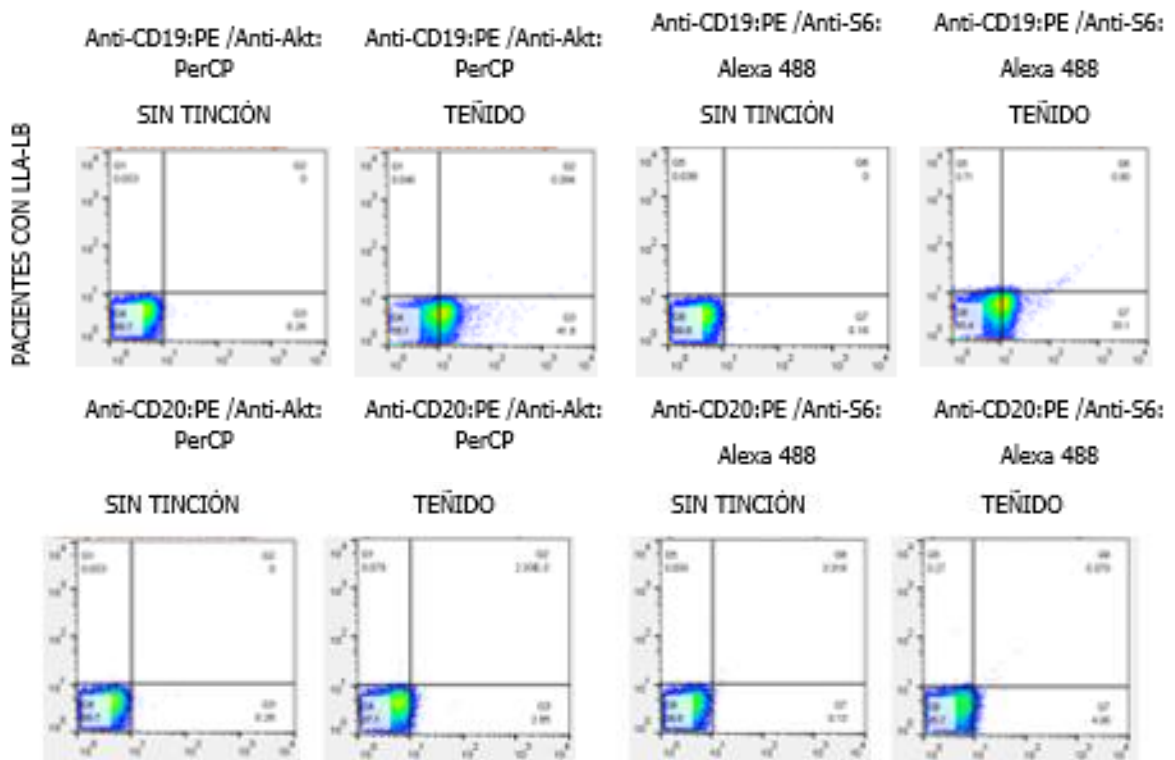
## SANGRE PERIFÉRICA



**Figura 4. Citometría de flujo de muestras de sangre periférica (SP) de Controles Clínicamente Sanos (CSS)**

En las **Figuras 5 y 6** se observan los gráficos *dot plots* de las muestras de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B de sangre periférica y médula ósea, respectivamente. De igual manera, del lado izquierdo, se encuentran los gráficos de las muestras sin marcaje con anticuerpos mientras que del lado derecho se encuentran las muestras teñidas con los respectivos anticuerpos. El porcentaje de células doble positivas en ambos tipos de muestras (sangre periférica y médula ósea) fue mayor con respecto a las células doble positivas de las muestras de sujetos clínicamente sanos. Esto coincide con uno de los puntos clave para el diagnóstico de este tipo de cáncer sanguíneo, donde los linfocitos B se encontrarán aumentados al estar desregulado el proceso de proliferación, en el cual está involucrada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.

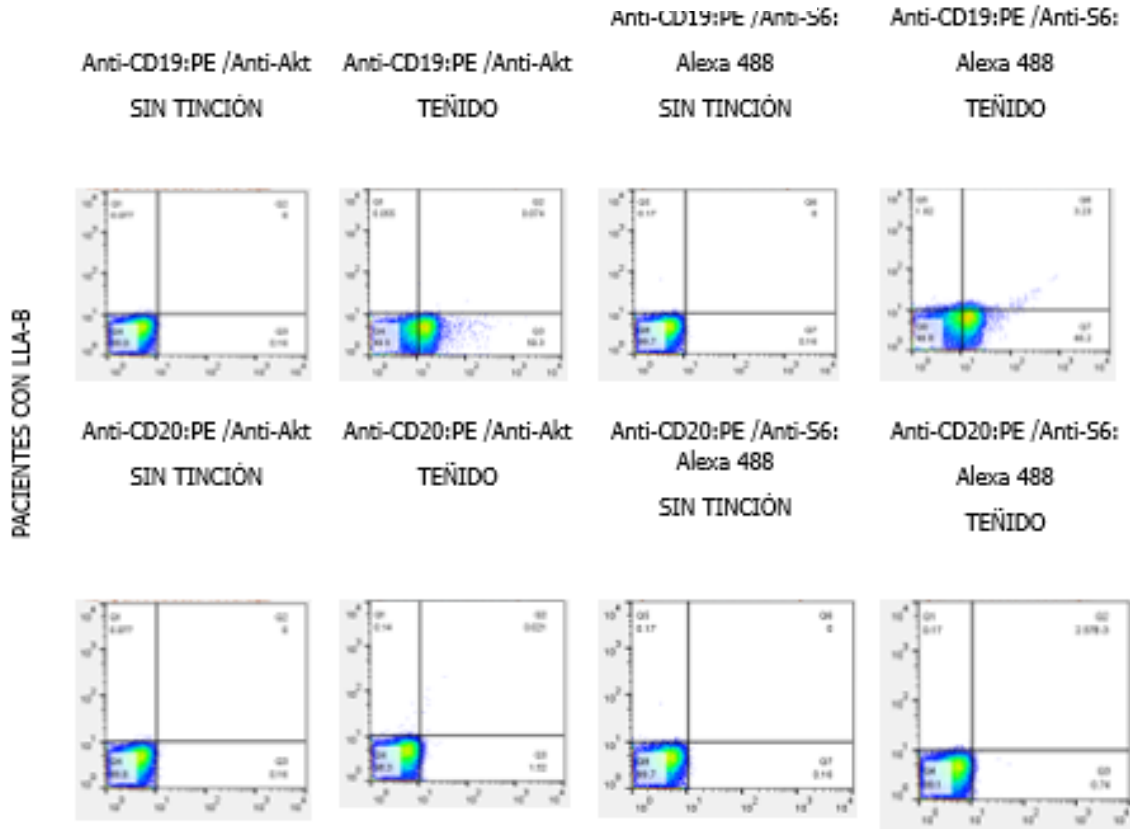
## SANGRE PERIFÉRICA



**Figura 5. Citometría de flujo de muestras de sangre periférica (SP) de pacientes con Leucemia Linfoblástica de linfocitos B (LLA-B)**



## MÉDULA ÓSEA



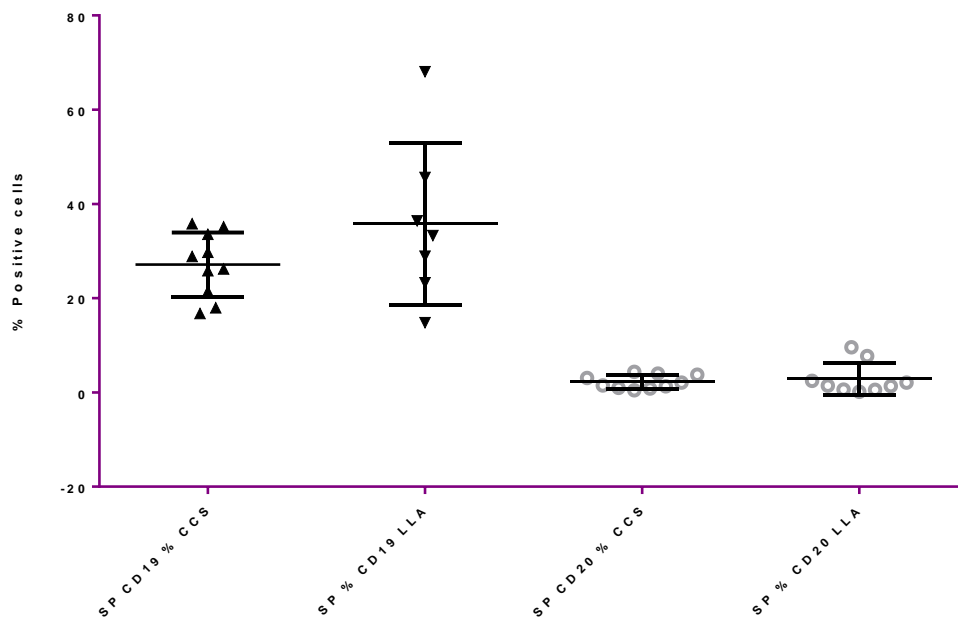
**Figura 6. Citometría de flujo de muestras de médula ósea (MO) de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfocitos B (LLA-B)**

Una vez adquiridas las muestras en totalidad, se procedió a su análisis gráfico y estadístico mediante *Graph.Path 6*. En seguida, se presentan los datos obtenidos a partir del análisis gráfico y estadístico para las células CD19+, CD20+, CD19+/Akt+, CD19+/S6+, CD20+/Akt+ y CD20+/S6+.

Como se describió en la metodología experimental, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD19 y anti-CD20 (conjugados con el fluorocromo PE) para identificar células pre-B y células B maduras, respectivamente en circulación sanguínea. En la **Figura 7** se muestra la

media y desviación estándar del porcentaje de células positivas para los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 de las muestras procesadas de sangre periférica de CCS (n=10) y pacientes con LLA-B (n=9). Se observa que después de haber realizado la tinción, se obtuvo un aumento en el porcentaje de células positivas para los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 en las muestras de pacientes con LLA-B con respecto a las muestras de sujetos sanos (CCS).

### SANGRE PERIFÉRICA

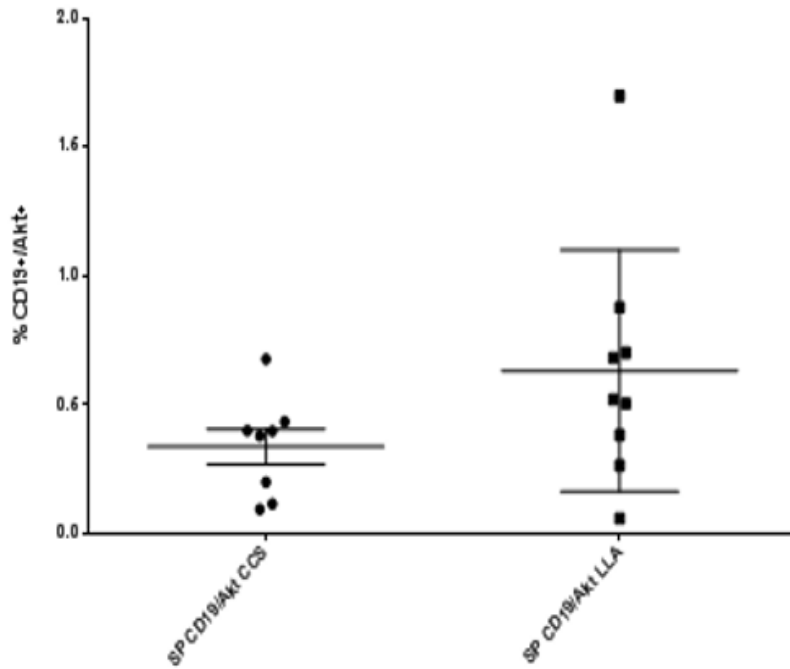


**Figura 7. Citometría de flujo para la identificación de linfocitos B en las muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9)**

Posteriormente, se determinó la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en los linfocitos pre-B de las muestras de sangre periférica y médula ósea, tanto de los CCS como de las muestras de pacientes con LLA-B. Primero, se estudió la unión del anticuerpo anti-fosfo

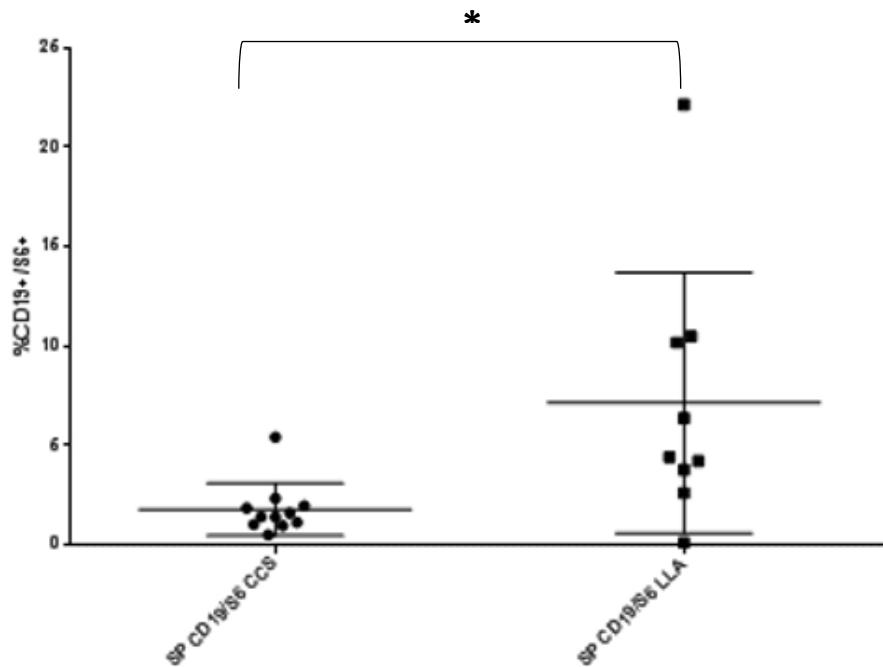
Akt a la proteína Akt, la cual, al estar fosforilada sugiere que se encuentra activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en el linfocito pre-B. En la **Figura 8** se muestra la media y desviación estándar del porcentaje de células positivas pre-B con la vía de señalización activada, es decir, CD19+/pAkt+ de las muestras de CCS (n=10) y LLA-B (n=9). Adicionalmente se hizo una *t de student* y se obtuvo una  $p=0.1195$ , sin diferencia estadísticamente significativa. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de linfocitos pre-B en los que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR mediante la unión del anticuerpo anti-fosfo S6 a dicha proteína fosforilada dentro de la célula. En la **Figura 9** se muestra la media y desviación estándar de las células pre-B en las que se encontraba la vía de señalización activada. Se observó que la vía se encuentra activada en menor proporción en los CCS (n=10) con respecto a pacientes con LLA-B (n=9). Adicionalmente se hizo una *t de student* y se obtuvo una  $*p=0.0158$ , con diferencia estadísticamente significativa.

## SANGRE PERIFÉRICA



**Figura 8. Citometría de flujo para la identificación del porcentaje de células positivas para el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 y el anticuerpo monoclonal anti-fosfo Akt en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9).  $p=0.1195$**

## SANGRE PERIFÉRICA

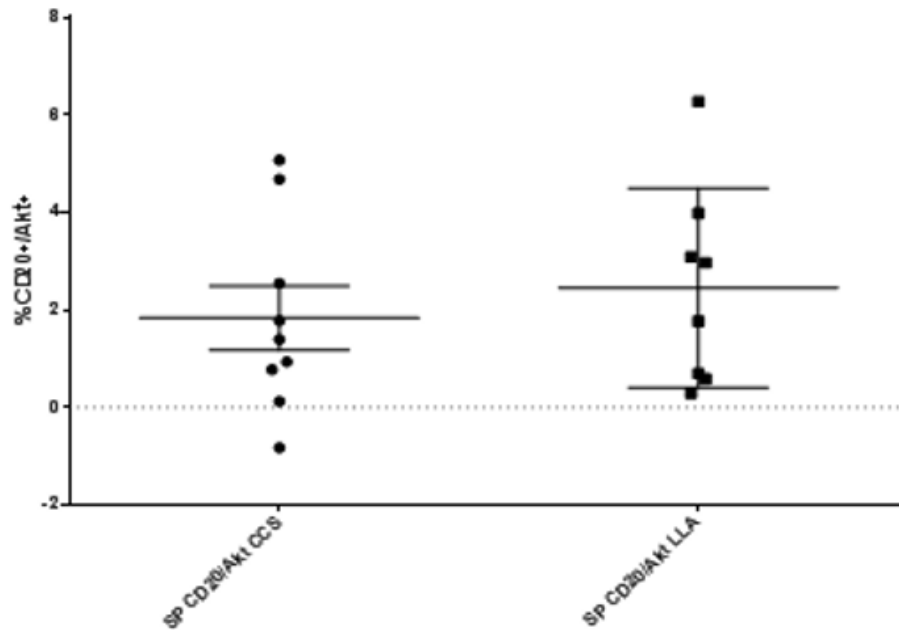


**Figura 9. Citometría de flujo para identificar el porcentaje de células positivas para el marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD19 y anti-fosfo S6 en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9). \*p=0.0158.**

En las **Figuras 10 y 11** se observan los gráficos obtenidos después del análisis de las muestras para determinar el porcentaje de linfocitos B maduros (CD20+) en los que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, es decir, las células fueron positivas para el marcaje con los anticuerpos anti-fosfo Akt y anti-fosfo S6. En la **Figura 10** se muestra el análisis de 10 muestras de sangre periférica de CCS y 9 muestras también de sangre periférica de pacientes con LLA-B. En el gráfico se observa la media y desviación estándar del porcentaje de células positivas para los anticuerpos anti-CD20 y anti-fosfo Akt, donde se observa que hay un ligero aumento en la activación de la vía de señalización en

pacientes con LLA-B con respecto a los CCS al haber mayor proliferación celular en este tipo de cáncer hematológico. Adicionalmente se hizo una *t de student* y se obtuvo una  $p=0.5331$ , es decir, no hubo diferencia estadísticamente significativa.

### SANGRE PERIFÉRICA

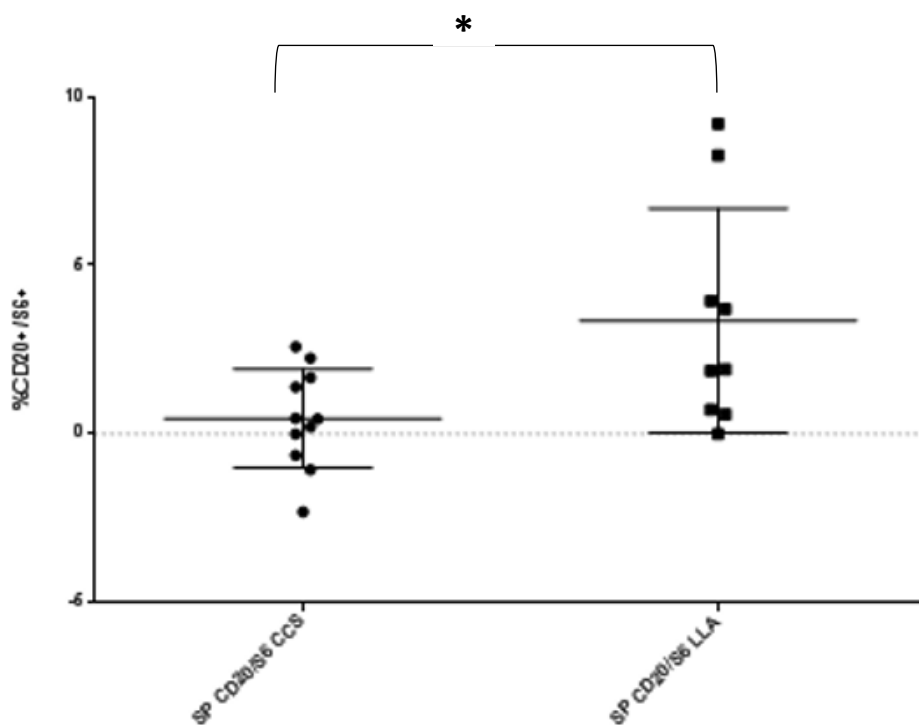


**Figura 10. Citometría de flujo en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-fosfo Akt para la identificación de linfocitos B maduros en los que se encontrara la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activada al estar unidas las proteínas específicas con el anticuerpo específico.  $p=0.5331$**

En la **Figura 11** se muestra el gráfico obtenido a partir de los resultados de la citometría de flujo realizada a muestras de sangre periférica de CCS (n=10) y de pacientes con LLA-B (n=9), donde se observa la media y

desviación estándar del porcentaje de células positivas para el marcaje con los anticuerpos anti-CD20 y anti-fosfo S6, sugiriendo que la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR se encuentra más activada en pacientes con LLA-B con respecto a los CCS. Adicionalmente se realizó una *t de student* y se obtuvo una  $*p=0.0179$ , es decir, hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de CCS y de pacientes con LLA-B.

### SANGRE PERIFÉRICA



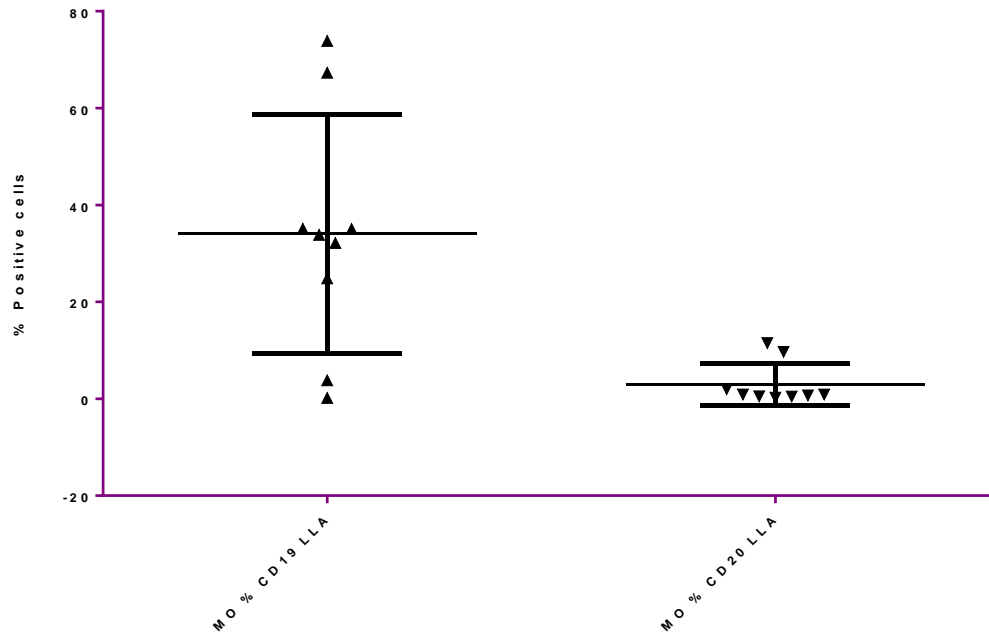
**Figura 11. Citometría de flujo en muestras de sangre periférica (SP) de controles clínicamente sanos (n=10) y de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD20 y anti-fosfo S6 para la identificación de linfocitos B maduros en los que se encontrara la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activada.  $*p=0.0179$**

Finalmente, se determinó el porcentaje de linfocitos pre-B (CD19+) y linfocitos B maduros (CD20+) en los que estaba activada la vía de

señalización PI3K/Akt/mTOR (pAkt+ y pS6+) en médula ósea. Esta determinación se hizo únicamente para las muestras obtenidas de pacientes con LLA-B debido a que este tipo de punción se realiza como parte del diagnóstico de estos pacientes y no es posible obtener muestras de personas sanas. Primero, se determinó el porcentaje de linfocitos pre-B (CD19+) y linfocitos B maduros (CD20+). En la **Figura 12** se muestra la media y desviación estándar del porcentaje de células positivas para estos anticuerpos en las ocho muestras de médula ósea trabajadas en este experimento. Además, se observa que hay mayor cantidad de células pre-B con respecto a las células B maduras en las muestras de médula ósea de pacientes, lo cual correlaciona con las muestras de sangre periférica pues se espera que al estar aumentados los linfocitos B en sangre periférica también lo estén en médula ósea.



## MÉDULA ÓSEA

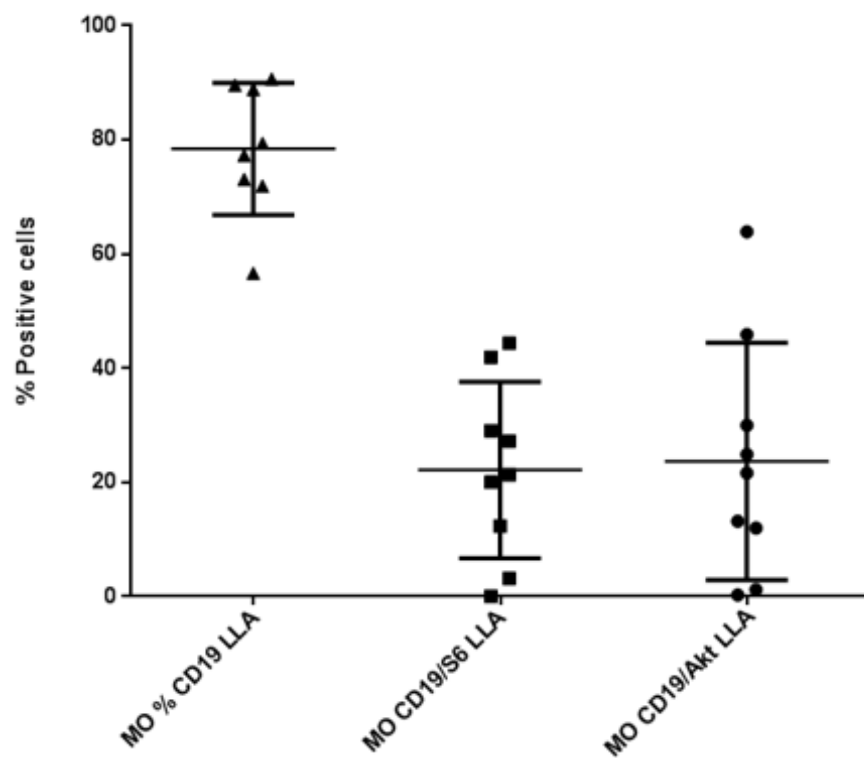


**Figura 12. Citometría de flujo en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CD19 y anti-CD20 para identificar la población de células pre-B y células B maduras, respectivamente.**

Adicionalmente, se realizó el mismo análisis hecho en las muestras de sangre periférica con la finalidad de identificar aquellas células positivas para el marcaje del linaje B de linfocitos en las que estaba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR para lo cual, se utilizaron los anticuerpos anti-CD19 (linfocitos pre-B), anti-CD20 (linfocitos B maduros) y anti-fosfo Akt y anti-fosfo S6 (moléculas involucradas en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR activada). En la **Figura 13** se observa la media y desviación estándar del porcentaje de células positivas para el marcaje con el anticuerpo anti-CD19; en la segunda y tercera barra se muestra el

porcentaje de células pre-B en las que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR al unirse el anticuerpo anti-fosfo S6 y anti-fosfo Akt, respectivamente en las ocho muestras de médula ósea.

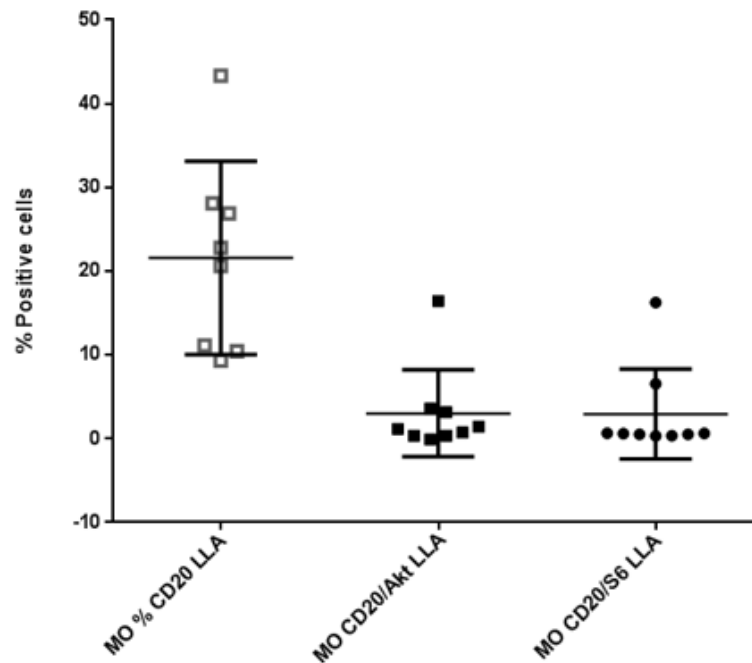
### MÉDULA ÓSEA



**Figura 13. Citometría de flujo en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) para la identificación de células pre-B en las que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR al estar presente la unión de ambos anticuerpos en las células de linfocitos B inmaduras.**

Por otro lado, en la **Figura 14** se observa la media y desviación estándar del porcentaje de células positivas para el marcaje con el anticuerpo anti-CD20; en la segunda y tercera barra se muestra el porcentaje de células B maduras en las que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR al unirse el anticuerpo anti-fosfo Akt y anti-fosfo S6, respectivamente en las ocho muestras de médula ósea.

### MÉDULA ÓSEA



**Figura 14. Citometría de flujo para la identificación de células B maduras en las que se encontraba activada la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en muestras de médula ósea (n=8) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA)**

## **11. DISCUSIÓN**

La leucemia linfoblástica aguda es un tipo de cáncer de órganos hematopoyéticos en el que ocurre una transformación maligna en una célula progenitora linfoide, la cual se caracteriza por la proliferación clonal y supervivencia prolongada de estas células inmaduras linfoides en médula ósea, sangre periférica y sitios extramedulares. Como consecuencia, hay un aumento de blastocitos circulantes y reemplazo de células hematopoyéticas normales por células malignas.

En este proyecto, se emplearon muestras de sangre periférica (SP) de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (LLA-B) y de controles clínicamente sanos (CCS). En algunos casos, se obtuvo muestra de médula ósea (MO) de pacientes con LLA de linfocitos B. El objetivo principal de este proyecto fue estudiar la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en los linfocitos B utilizando la técnica de citometría de flujo con el uso de anticuerpos monoclonales para identificar los linfocitos pre-B (CD19+) y B maduros (CD20+), así como dos proteínas fosforiladas: Akt y S6, las cuales participan en la cascada de señalización la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, involucrada en procesos celulares de crecimiento y proliferación celular.

Se utilizaron los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 para identificar los linfocitos B en dos de sus estadios de diferenciación debido a que en la superficie de las células B se encuentran presentes algunas inmunoglobulinas que funcionan como receptores celulares para antígenos de superficie, a estos se les conoce como receptor de células B (BCR). Cuando un antígeno se une al BCR desencadena una respuesta inmune antígeno-específica activando a la célula para que lleve a cabo su diferenciación de célula B a célula B plasmática. Esta unión antígeno-específica con el BCR estimula vías de activación como la de la PLC $\gamma$ 2 y cinasas dependientes de fosfoinositol trifosfato (PI3K) que a su vez

activarán otras cinasas [5]. Es por ello que se utilizaron antígenos de membrana exclusivos de linfocitos B cuya expresión depende de la etapa de maduración en la que se encuentren, lo que permiten su identificación. El antígeno específico CD20 es una fosfoproteína transmembranal no glicosilada que forma tetrámeros y funciona como un canal de calcio, por lo que tiene relevancia en la progresión del ciclo celular y vías de señalización en el proceso de diferenciación y maduración [18]. Además, se expresa durante el proceso de diferenciación de células B tanto normales como malignas excepto en células precursoras y células plasmáticas. Por otro lado, el antígeno CD19 es una glicoproteína transmembranal de tipo 1 que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y actúa como receptor crítico para la transducción de señales del BCR para la expansión de las células B al reclutar y activar las cinasas PI3K y Akt en sentido ascendente [45].

Se observó un aumento notable en la población de células B, tanto inmaduras como maduras en las muestras de sangre periférica y de médula ósea en algunos pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B con respecto a las muestras de los controles clínicamente sanos (sólo sangre periférica), ya que el aumento de este tipo de población linfocitaria forma parte del diagnóstico de este tipo de cáncer (**Figura 7 y 12**).

### ***La expresión de CD19 y CD20 en muestras de sangre periférica de pacientes con LLA-B***

En nuestros resultados obtuvimos que el porcentaje de células B positivas para la expresión del antígeno CD19, es decir, células pre-B, fue mayor en la población de estudio de pacientes con LLA-B (35.76%) con respecto a la población de CCS (27.13%) (**Figura 7**). Este resultado coincide con

lo que se encuentra reportado previamente en la literatura, ya que esta glicoproteína se expresa en todas las leucemias agudas de linfocitos B [17]. Por otro lado, se sabe que en personas con leucemia linfoblástica aguda hay un mayor número de blastocitos en circulación sanguínea que en sujetos sanos, por lo que el anticuerpo que marcará las células pre-B se verá mayormente expresado en pacientes con este tipo de cáncer. Al estar expresada la glicoproteína CD19 en los pacientes, esta podría regular la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR de manera dependiente del BCR.

La expresión del antígeno CD20 es mayor en proporción en las células B maduras de los pacientes con LLA-B (2.88%) con respecto a la población de CCS (2.23%), esto sugiere que en la fase de linfopoyesis donde se traduce y expresa esta proteína se activa de manera diferente en pacientes con LLA-B en linfocitos B. Sin embargo, el porcentaje de células B maduras positivas no es tan elevado como el porcentaje de células B inmaduras positivas, puesto que la leucemia linfoblástica aguda se caracteriza por la presencia de blastos en un 20% o más en circulación sanguínea, lo que indica que esta proporción de células inmaduras se encuentra en médula ósea [25].

***Activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en células CD19 y CD20 de muestras de sangre periférica de pacientes con LLA-B y controles sanos.***

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR tiene un papel importante en funciones fisiológicas como la progresión del ciclo celular, diferenciación, supervivencia, apoptosis y síntesis de proteínas. Cuando no se encuentra regulada la activación de esta vía de señalización, se asocia a oncogénesis y la progresión de algunos tipos de cáncer de tumores sólidos y hematológicos. El receptor de células B (BCR) puede activarse por la

estimulación promovida por un antígeno, el cual conduce la señalización mediante un complejo conformado por CD19-CD21-CD81, dependiendo del antígeno puede desencadenar a diferentes procesos: supervivencia, proliferación o diferenciación celular [17,18].

Cuando determinado antígeno se une al BCR inicia la fosforilación de residuos de tirosina en los dominios citoplasmáticos. Esta fosforilación activa la cinasa 3-fosfatidilinositol (PI3k) propagando la fosforilación del fosfatidil inositol difosfato (PIP2) convirtiéndolo en fosfatidil inositol trifosfato (PIP3). Esta señal continúa activando la cinasa dependiente de fosfoinositido 1 (Pdk1), la cual va a fosforilar al efector B de la proteína cinasa (Akt) [46]. En nuestros resultados obtuvimos que la proteína Akt en células CD19+ se expresa en mayor cantidad en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (0.63%) que en las muestras de controles clínicamente sanos (CCS) (0.33%) (**Figura 8**), sugiriendo que en este tipo de cáncer se encuentra desregulado el control de esta vía de señalización, la cual juega un papel central en el crecimiento celular, la proliferación y algunas condiciones de supervivencia celular [47]. De igual manera, se encontró que en los linfocitos B maduros CD20+ se encuentra en mayor proporción la proteína Akt en los pacientes con LLA-B 2.46% vs 1.89% de CCS (**Figura 10**), lo cual sugiere que la vía está más activada en esta población que en los sujetos clínicamente sanos. Cabe destacar que el aumento es menor con respecto a lo observado en los linfocitos CD19+ debido a que en LLA, las células inmaduras se encuentren aumentadas. A nivel de diferenciación celular, la proteína CD20 aparece después de la expresión de CD19 y antes de que aparezca la cadena  $\mu$  en la ontogenia de los linfocitos B [46] por lo que es de esperarse que esta población esté más elevada que los linfocitos inmaduros.

Continuando con la cascada de señalización de la vía PI3K/Akt/mTOR, al estar fosforilada la proteína Akt va a fosforilar otros sustratos involucrados con la proliferación celular, el metabolismo y supervivencia celular, entre ellos el último efector de PI3K, que es una cinasa de treonina-serina (mTOR) formada por dos complejos mTORC1 y mTORC2 con diferente composición y selectividad por sus sustratos [34]. El complejo mTORC1 es clave en la integración de respuestas a señales provenientes de factores de crecimiento y proliferación [33]. Un sustrato directo de mTORC1 es la cinasa 1 S6, la cual contribuye a la reprogramación metabólica al incrementar la glucólisis y biosíntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos [27,33]. Al tener fuerte influencia en el crecimiento celular y supervivencia, la activación constitutiva de la vía PI3K/Akt/mTOR es característica de la leucemia linfoblástica aguda, algunos grupos han investigado si las proteínas participantes en esta vía pueden representar un blanco terapéutico, Neri y colaboradores describieron a mTOR como un nuevo blanco terapéutico ya que disminuyó la viabilidad celular y causó apoptosis en líneas celulares. En nuestros resultados obtuvimos que en las muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B se encontró en mayor proporción la cantidad de proteína S6 fosforilada con respecto a las muestras de controles clínicamente sanos (7.16% vs 1.88%, respectivamente) (**Figura 9**), ya que al activar el complejo mTORC1 se espera que la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos se encuentre más elevada debido potencialmente al descontrol del ciclo celular y la proliferación de los linfocitos B en los pacientes. Por otro lado, se observa que hay correlación entre el porcentaje de células positivas para la proteína S6 fosforilada tanto de linfocitos inmaduros (CD19+) como de linfocitos maduros (CD20+) (**Figuras 9 y 11**), este aumento en la proteína S6 fosforilada es proporcionalmente semejante en ambas poblaciones de linfocitos B.



### ***La expresión de CD19 y CD20 en muestras de médula ósea de pacientes con LLA-B y la activación de Akt y S6.***

Las muestras provenientes de la médula ósea de pacientes con LLA-B se procesaron siguiendo la misma metodología que las muestras de sangre periférica. Sin embargo, no se recolectó este mismo tipo de muestra en sujetos clínicamente sanos por cuestiones de regulación ética.

Se muestra en la **Figura 12** el porcentaje de células pre-B (CD19+) y linfocitos B maduros (CD20+), se observa que los resultados coinciden con los obtenidos en las muestras de sangre periférica, ya que la cantidad de linfocitos B inmaduros es mayor a la de linfocitos B maduros considerando el tipo de leucemia linfoblástica aguda. Por otro lado, los resultados en las tinciones correspondientes a la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en células CD19+ y CD20+ muestra un comportamiento semejante al de las muestras de sangre periférica (**Figuras 13 y 14**) donde se observa que hay mayor cantidad de proteína S6 fosforilada que proteína Akt fosforilada, relacionándolo con lo que se ha descrito respecto al aumento de la vía de proliferación de estas células.

Con base en los resultados obtenidos a partir de las muestras de sangre periférica teñidas y observadas a partir de la técnica de citometría de flujo, podemos decir que la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR se encuentra más activada en las células de pacientes que padecen leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B que en personas que no padecen este tipo de cáncer hematológico (CCS). Se han estudiado algunas de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de esta vía para ser utilizadas como blancos terapéuticos. En un estudio para observar los efectos sinérgicos de algunos inhibidores selectivos de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR se observó que la desfosforilación de pAkt y pS6 muestra la toxicidad de algunos compuestos que se han probado para

tratar de regularizar el control de esta vía de señalización [47]. En el presente estudio se cuantificó el porcentaje de estas dos proteínas fosforiladas que participan en la activación de señales o procesos involucrados en el desarrollo del ciclo y la proliferación celular.

Se observó que la proteína S6 cuando se encuentra en su forma fosforilada está más aumentada que la proteína Akt fosforilada, esto puede entenderse porque S6 es un sustrato directo del complejo mTORC1 que al estar aumentado tiene como consecuencia el aumento de la supervivencia y proliferación celular. Mientras que la proteína Akt no es totalmente específica para esta vía de señalización, ya que puede activar otras proteínas como Bax o FOXO, involucradas en la prevención de apoptosis y la regulación negativa de PI3K, respectivamente [34].

Es de considerarse que el número de pacientes de la muestra del presente estudio es pequeño y que deberá continuarse con el reclutamiento de pacientes para demostrar que las diferencias en estos marcadores son significativas para todos los grupos.

El estudio de estos marcadores podría representar una nueva opción como blanco terapéutico para el tratamiento de estos pacientes del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE.

## **12. CONCLUSIONES**

Se estandarizó el aislamiento de células leucocitarias a partir de muestras de sangre periférica y en algunos casos médula ósea de pacientes con LLA-B y personas sanas obtenidas en el CMN "20 de Noviembre", ISSSTE.

Se estandarizó la técnica de citometría de flujo para la identificación de linfocitos B utilizando marcadores de linaje para la población inmadura (CD19+) y población madura (CD20+).

El porcentaje de células CD20+ en pacientes con LLA-B (2.88 %) mostraron una tendencia a estar elevados por encima de los valores presentes en los controles clínicamente sanos (2.23%) sin representar una diferencia estadísticamente significativa.

El porcentaje de células CD19+ en pacientes con LLA-B de 35.76 % fue mayor al de los controles clínicamente sanos 27.13% sin representar una diferencia estadísticamente significativa.

Se determinó la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR mediante la técnica de citometría de flujo en muestras de sangre periférica de controles clínicamente sanos (n=10) y pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B (n=9), en ocho casos se hizo la determinación en muestras de médula ósea. La activación de la vía PI3K/Akt/mTOR en linfocitos B se analizó mediante la identificación de dos proteínas fosforiladas involucradas en la cascada de señalización de esta vía.

En las muestras de sangre periférica, los linfocitos CD19+ de pacientes con LLA-B la vía de PI3K/Akt/mTOR está más activa, presentando niveles por encima de los valores presentes en los controles clínicamente sanos de las proteínas S6 (7.16% vs 1.88%, respectivamente) y Akt (0.63% vs 0.33%, respectivamente) sin diferencias estadísticamente significativas

para la proteína Akt fosforilada pero con diferencia significativa para la proteína S6 fosforilada con una  $p=0.0158$ .

En las muestras de sangre periférica, los linfocitos CD20+ de pacientes con LLA-B la vía de PI3K/Akt/mTOR es más activa, presentando niveles elevados con respecto a los valores de los controles clínicamente sanos de las proteínas S6 (3.35% vs 0.5%, respectivamente) y para Akt (2.46% vs 1.89%, respectivamente) sin diferencias estadísticamente significativas para la proteína Akt fosforilada pero con diferencia significativa para la proteína S6 fosforilada con una  $p=0.0179$ .

La tendencia en un número mayor de células CD19+, CD20+ con una mayor activación de la vía PI3K/Akt/mTOR se replicó en las muestras estudiadas de médula ósea de pacientes con LLA-B.

Los datos obtenidos a partir de la citometría de flujo se relacionaron con la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, donde se confirmó la hipótesis ya que esta vía se encuentra descontrolada y más activada en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en relación con controles clínicamente sanos.

### **13. PERSPECTIVAS**

Se espera continuar con el reclutamiento de muestras de sangre periférica y médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda de Linfocitos B, así como de Controles Clínicamente Sanos para continuar con el estudio de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y alcanzar una muestra representativa de ambas poblaciones. Además, se pretende relacionar este trabajo con un estudio genético de estas muestras para identificar posibles nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de pacientes con LLA-B atendidos en el CMN "20 de Noviembre", o bien, nuevos representar una nueva opción de diagnóstico y/o pronóstico para la población que padece este tipo de cáncer.

#### 14. REFERENCIAS

1. Abul K. Abbas, A. H., y Lichtman, S. P., *Celular and molecular immunology*, 6th ed. Saunders Elsevier, 2007.
2. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., y Osborne, B. A., *Inmunología de Kuby*, 6th ed. Mc Graw Hill, 2007.
3. Murphy, K., Travers, P., y Walport, M., *Inmunobiología de Janeway*, 7th ed. Mc Graw Hill, 2014.
4. Köhrer, S., Havranek, O., Seyfried, F., Hurtz, C., Coffey, G. P., Kim, E., Ten-Hacken, E., Jäger, U., Vanura, K., O'Brien, S., Thomas, D. A., Kantarjian, H., Ghosh, D., Wang, Z., Zhang, M., Ma, W., Jumaa, H., Debatin, K. M., Müschen, M., Meyer, L. H., Davis, R.E., Burger, J. A., (2016) Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia*, 6, 1246-54.
5. Prieto, M, Barbarroja, J, García, C, Monserrat, J, (2013). Linfocitos B. *Medicine*, 28, 1710-8.
6. Rincón, H, Yassin, L, Vásquez, G, Castaño, D. (2013). Regulatory B cells in human diseases and mouse models of autoimmunity. *Inmunología*, 32, 129-138.
7. Mauri, C, y Bosma, A, (2012). *Immune Regulatory Function of B Cells. Annual Review of Immunology*, 30, 221-41.
8. Mayani, H., Flores, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores, P., y Chávez, A., (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*, (2), 95-102.
9. Enciso, J., Mendoza, L., y Pelayo, R., (2015). Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Frontiers in Genetics*, 6, (209), 1-3.
10. Balandrán, J. C., y Pelayo, R., (2016). Ontogenia de los linfocitos B. *Rev ALerg Mex*, 63, (1), 71-79.

11. Madrigal, M., Tesis doctoral. (2005). Caracterización molecular de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de pacientes con linfoma difuso de células grandes. *Facultad de Medicina, UNAM*.
12. Jagannathan-Bogdan, M., y Zon, L., (2013). Hematopoyesis. *Development*, 140, (12), 2463–2467.
13. Yuen, G. J., Demissie, E., Pilai, S., (2016). B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trends in cancer*, 2, 747-757.
14. Kim, B., Lee, S., Kim, H., Lee, S., Yoo, K. H., Koo, H.H., y Kim, S.H., (2014). Acute Lymphoblastic Leukemia with Mature B-Cell Phenotype and t(9;11;11) (p22;q23;p11.2): A Case Study and Literature Review. *Ann Lab Med*, 34, (2), 166-169.
15. Resino, S., (2010). Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. BCR y TCR. *EMEI*. Recuperado el 28 de septiembre de 2018 <http://epidemiologiamolecular.com/bcr-tcr/>
16. Ferreira, M., Reis, N. P., Pascoli, A. L., Arosti, B. M., Pazzini, J. M., Huppes, R. R., De Nardi, A. B., Tinucci-Costa, M., Laufer-Amorim, R., (2016). The importance of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in neoplasms: *Literature review*, *Arch. med. vet.* 48 (2) 1-4.
17. De Lartigue, J., (2014). CD19-Targeted Agents Continue to Show Positive Outcomes. *Targeted Oncology*. <https://www.targetedonc.com/publications/targeted-therapies-cancer/2014/june-2014/cd19-targeted-agents-continue-to-show-positive-outcomes>
18. O’Brien, S., Jorgensen, J.L., Cortes, J., Faderl, S., García-Manero, G., Verstovsek, S., Koller, C., Pierce, S., Huh, Y., Wierda, W., Keating, M.J., y Kantarjian, H.M., (2009). Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 113 (25), 6330-6331.

19. Fransecky, L., Mochmann, L. H., y Baldus, C. D., (2015). Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Mol Cell Ther*, 3, (2), 1-5.
20. Significado de leucemia. Recuperado el 16 de mayo de 2019 de <https://www.significados.com/leucemia/>
21. Jaime, J.C., Hematología. La sangre y sus enfermedades. Capítulo 17: Breve historia de la hematología II: las leucemias. 4ª ed. Mc Graw Hill, Recuperado el 16 de mayo de 2019 de: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1732&sectionid=121014793>
22. Fruman, D.A., y Rommel, C., (2014). PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 13, (2), 140-151.
23. Alvarado, M., Medina, J.E., Salazar, O., y López, M., (2015). Efecto de la glucoproteína P en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global de pacientes con leucemia aguda. *Rev Hematol Mex* 16, 249-261.
24. Manual CTO de Medicina y Cirugía. Hematología. ENARM México. *Grupo CTO*, 1º Edición.
25. Kharas, M.G., Shokat, K.M., y Fruman, D.A., (2017). Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansión of human BCR-ABL+ leukemia cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, (9), 3038-3050.
26. Swedlow, S., Campo, E., Harris, N., y Jaffe, E., (2008). Who classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. *WHO* (2),14-15.



27. Limon, J.J., y Fruman, D.A., (2012). Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Frontiers in Immunology*, 228, (3), 1-8.
28. Aragón, M., y Aragón, C., (2014). Diagnóstico Molecular y Tratamiento de Leucemias. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 71, (609), 39-45.
29. Buchner, M., y Müschen, M., (2015). Targeting the B cell receptor signaling pathway in B lymphoid malignancies. *Curr Opin Hematol*, 21, (4), 341-349.
30. Ersahin, T., Tuncbag, N., y Cetin-Atalay, R., (2015). PI3K/AKT/mTOR Interactive Pathway. *Mol. BioSyst*, 1, (3), 1-3.
31. Naeim, F., y Grody, W. W., (2013). Principles of Immunophenotyping. *Atlas of Hematopathology*, 1-2.
32. López, M. A., Romero, H., Alvarado, M., (2015). Efectividad de deferasirox en la reducción de la toxicidad hepática por hemocromatosis secundaria en pacientes con leucemia aguda en programa de quimioterapia intensiva. *Rev Hematol Mex*, 16, 262-270.
33. Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi, P.P., (2012). The functions and regulation of the PTEN Tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 283-29.
34. Fruman, D., A., Chiu, H., Hopkins, B., D., Bagrodia, S., Cantley, L., C., y Abraham, R., T., (2017). The PI3K pathway in human disease. *Cell*, 170, (4), 1-4.
35. Guri, Y., y Hall, M. N., (2016). mTOR Signaling Confers Resistance to Targeted Cancer Drugs. *Review Cell*, 2, (11), 688-697.
36. Neri, L. M., Cani, A., Martelli, A. M., Simioni, C., Junghanss, C., Tabellini, G., Ricci, F., Tazzari, P. L., Pagliaro, P., McCubrey, J.

- A., Capitani, S., (2014). Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*, 4, 739-48.
37. Ye, W., Jiang, Z., Lu, X., Ren, X., Deng, M., Lin, S., Xiao, Y., Lin, S., Wang, S., Li, B., Zheng, Y., Lai, P., Weng, J., Wu, D., Ma, Y., Chen, X., Wen, Z., Chen, Y., Feng, X., Li, Y., Liu, P., Du, X., Pei, D., Yao, Y., Xu, B., Ding, K., Li, P., (2016). GZD824 suppresses the growth of human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting the SRC kinase and PI3K/AKT pathways. *Oncotarget*, 50, 2-15.
38. Evangelisti, C., Cappellini, A., Oliveira, M., Fragoso, R., Barata, J. T., Bertaina, A., Locatelli, F., Simioni, C., Neri, L. M., Chiarini, F., Lonetti, A., Buontempo, F., Orsini, E., Pession, A., Manzoli, L., y Martelli, A. M., (2018). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition potentiates glucocorticoid response in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, 3, 1796-1811.
39. Simioni, C, Ultimo, S, Martelli, A. M, Zauli, G, Milani, D, McCubrey, J. A, Capitani, S, y Neri, L. M, (2016). Synergistic effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway or NUP214-ABL1 fusion protein in human Acute Lymphoblastic Leukemia. *Oncotarget*, 48, 79842-79853.
40. Gomes, A. M., Soares, M. V., Ribeiro, P., Caldas, J., Póvoa, V., Martins, L. R., Melao, A., Serra-Caetano, A., de Sousa, A. B., Lacerda, J. F., Barata, J. T., (2014). Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. *Haematologica*, 6, 1062-8.

41. International Agency for Research on Cancer (IARC). (2019). *World Health Organization*. Recuperado de <https://www.iarc.fr/>
42. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales*. 1 de febrero de 2017, Aguascalientes, México. Recuperado el 12 de enero del 2019.
43. Jasso, L., Dorantes, E., Rodríguez, E., Pasillas, E., Muñoz, O., (2012). Estudio de caso: estimación de los costos de la quimioterapia aplicando el protocolo completo en niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin. *Bol MedHospInfant Mex*, 69, 11-23.
44. Base de datos de defunciones INEGI/ Secretaría de Salud. Dirección General de Información de Salud, CONAPO, 2012. *Proyecciones de la Población de México, 2010-2050*. Recuperado el 12 de enero de 2019.
45. Li, J., Kim, G., y Blenis, J., (2014). Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*. 19, (3), 373-375.
46. Sanchez, V. E., Nichols, C., Kim, H., N., Gang, E., J., y Kim Y., M., (2018). Targeting PI3K Signaling in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci*, 20 (412), 1-6.
47. Shi, L. X, Wang, J. H, y Shi, X. D, (2016). PI3K/AKT/mTOR Pathway and Pediatric T Acute Lymphoblastic Leukemia-Review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 4,1269-74.

# ANEXO I. APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN



CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"  
Subdirección de Enseñanza e Investigación  
Coordinación de Investigación

"2017. AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA  
CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

Oficio No. 96.2.2.1.3.2/612/2018  
Asunto: **Aceptación de Protocolo**

Ciudad de México a 26 de Marzo de 2018

**Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra**  
Investigador Responsable  
Presente.

Le comunicamos, que su proyecto de investigación titulado: **Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza.** Con Número **154.2018** folio de la Jefatura de departamento de investigación como resultado de proceso de revisión, en el que integrantes de las Comisiones de Investigación, de Ética en Investigación y Bioseguridad del Centro Médico Nacional "20 De Noviembre", aprobaron y dictaminaron procedente su realización.

A partir de este momento será responsabilidad del investigador principal, realizar a satisfacción los objetivos del proyecto aprobado, así como dar cumplimiento de lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y a las buenas prácticas clínicas que indican la Secretaría de Salud y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, deberá cumplir ante esta Coordinación y a los comités de Ética en Investigación y en su caso al de Bioética con los informes **semestrales** de la evolución del proyecto y de ser procedente del manejo de presupuesto, y si así lo amerita su investigación copia de la carta de consentimiento bajo información de todos los pacientes que participan, este consentimiento deberá incluir el número de expediente, dirección, dirección electrónica y teléfono de cada uno de los pacientes reclutados en el entendido de que esta información es **confidencial** y será susceptible de ser auditada por el comité de ética en investigación.


Es responsabilidad del investigador principal notificar sobre cualquier efecto adverso ocurrido en los pacientes en investigación tanto a la Comisión de Ética a través de esta coordinación, al Comité de Farmacovigilancia como a la Secretaría de Salud (COFEPRIS) y en los formatos correspondientes y tiempos obligatorios al tipo de evento a reportar.

Con el fin de dar cumplimiento a la reglamentación en investigación vigente en México y a la que estará obligado (a) es necesario acceda al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación, al "Consejo de Salubridad General, a la comisión para la Certificación de Establecimientos de Atención Médica, Estándares para la Certificación de Hospitales en Investigación" así como a la Comisión Nacional de Bioética.

Las autoridades de este Centro Médico Nacional "20 De Noviembre" están comprometidas con impulsar la investigación en salud bajo los más estrictos estándares científicos y éticos contemplados en la legislación Mexicana y en los tratados internacionales que se han suscrito por lo que le felicitamos por su interés en materia.

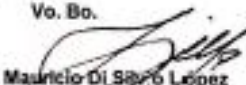
Desdándole que esta investigación cumple los propósitos que se han planteado, sin otro particular, quedamos de usted.

Atentamente

  
**Dr. Paul Mondragón Terán**  
Coordinador de Investigación

En conformidad con el Oficio No. 96.202.1.3.2/612/2018 de fecha 01 de Marzo de 2018.

Vo. Bo.

  
**Dr. Mauricio Di Sarno López**  
Subdirector de Enseñanza e Investigación.

  
**Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra**  
Aceptación del Investigador  
Fecha:

c.c. a: Mesa de la Coordinación de Investigación  
PMTrab\*

Av. Félix Cuevas 540 Col. Del Valle, CP. 03100 Delegación Benito Juárez, Ciudad de México  
Tel. (55) 52005003 Ext. 14613 [www.gob.mx/issste](http://www.gob.mx/issste)

# CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CONTROLES CLÍNICAMENTE SANOS



"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado"

C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"



## CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD.

### CONTROLES CLINICAMENTE SANOS (CCS)

**NOMBRE DEL ESTUDIO:** "Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza"

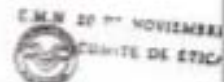
México, Ciudad de México a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2017.

Por favor tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga. Para decidir si participa o no, deberá tener el conocimiento suficiente acerca de los beneficios y riesgos del presente estudio de investigación, este estudio no le causará ningún costo.

Estimado Señor(a): \_\_\_\_\_, se le invita a participar en el estudio llamado "Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza", que se desarrolla en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE en el área de Investigación, cuyo objetivo será determinar varios puntos: 1) Determinar la frecuencia génica y alélica de polimorfismos en los genes de *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *IKZF1*. 2) Caracterizar si estos polimorfismos activan la vía de PI3K/AKT/MTOR (vía de diferenciación y crecimiento celular), 3) se analizará si estos genes son característicos de nuestra población, por lo que se realizará un cuestionario de "ancestría" ya que es importante saber ¿Cómo estos genes se heredan de padres a hijos?, además sabremos de qué estado de la República Mexicana son originarios al igual que sus familiares, si hablan alguna lengua distinta al español-castellano, las características de la vivienda (ya que es distinta entre los Estados), y si alguno de sus familiares participan en el estudio. Como usted ya ha leído, el entender cómo influyen nuestros genes en las enfermedades es muy importante para nosotros; por lo que también le solicitamos que nos permita usar sus muestras en algún otro proyecto, exclusivamente relacionado a este tema de investigación, ya que se requiere determinar en personas sanas los diferentes genes no solo para conocer a la población mexicana mestiza, sino también ¿cuáles son nuestras características genéticas? y ¿cómo se comportan en comparación de los de los pacientes con diferentes enfermedades a las ya mencionadas?

Su participación en el estudio consiste en la donación de tres muestras de sangre de 4 ml cada una, a partir de la cual, de una se analizará los genes que se estudiarán (*PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *IKZF1*) las otras tomas de muestra se utilizarán para el análisis de la activación de la vía de PI3K, AKT, MTOR/PTEN. La toma de las muestras será obtenida por los médicos tratantes, los efectos adversos por dicha toma de sangre son mínimos y puede incluir, moretones en el sitio de la punción (hematoma) o dolor local, los cuales, en caso de presentarse, usualmente desaparecen en 1 o 2 días; sin embargo, en caso de ser necesario Usted podrá contar con atención médica pertinente.

Av. Félix Cuevas 246, Col. Del Valle, C.P. 03278, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México, Tel.: +52 55 92 00 2544



Página 1/3

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CONTROLES CLÍNICAMENTE SANOS



"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado"

C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"



Se me ha informado que el análisis y obtención de resultados toma aproximadamente 6 meses, por lo que después de ese tiempo yo podré obtener los resultados, contactando al investigador principal. En caso de sobrar muestra se procederá a la eliminación de la misma, conforme a lo estipulado por la normatividad vigente (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

### BENEFICIOS:

A pesar de que no existe un beneficio directo para los participantes, el presente estudio tendrá el beneficio de conocer cuáles son mis genes que se han estudiado, además podría permitir desarrollar conocimientos para mejorar la atención de todos aquellos pacientes mexicanos que tengan leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.

Gracias a su participación altruista, se podría beneficiar a muchos pacientes al encontrar nuevas formas de atender y mejorar la calidad de vida en esta enfermedad.

### RIESGOS:

Su participación no conlleva riesgo alguno para su salud, la toma de muestra sanguínea se llevará a cabo por personal experto y en caso de presentar algún moretón por dichos procedimientos, se le brindará la atención médica pertinente e inmediata.

### PARTICIPACIÓN:

Su participación es VOLUNTARIA, usted puede decidir libremente participar o no, esto no afectará la atención en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE. Además, se me ha informado que soy libre de solicitar mi retiro del estudio en cualquier etapa del mismo.

### MANEJO DE LA INFORMACION:

En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley Federal de Protección de Datos: licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger sus datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Toda la información proporcionada se utilizará con fines de investigación y conforme al consentimiento informado, entendiendo que todos los resultados durante el desarrollo de la misma. Así mismo, se me ha informado que mi nombre no será revelado ni utilizado de forma pública en ninguna etapa del desarrollo de este protocolo de investigación.

### PARTICIPANTE:

Confirmando haber recibido información suficiente y clara sobre el estudio propuesto, doy mi autorización para ser incluido en este proyecto de investigación, reservándome el derecho de abandonarlo en cualquier momento si así lo decido.





# CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CONTROLES CLÍNICAMENTE SANOS



**"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado"**

**C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"**



\_\_\_\_\_  
Firma y nombre del participante

Dirección y teléfono del participante:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**TESTIGOS:**

\_\_\_\_\_  
(1) Nombre y firma  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(2) Nombre y firma  
Parentesco: \_\_\_\_\_  
Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

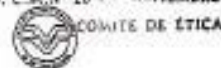
INVESTIGADOR O MÉDICO QUE INFORMA: \_\_\_\_\_  
SERVICIO: \_\_\_\_\_

Le he explicado al Sr (a) \_\_\_\_\_, la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He dado respuesta a todas sus dudas, y le he preguntado si ha comprendido la información proporcionada, con la finalidad de que pueda decidir libremente participar o no en este estudio. Acepto que he leído, conozco y me apego a la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos, que pondré el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación, por encima de cualquier otro objetivo.

INVESTIGADOR RESPONSABLE.

\_\_\_\_\_  
**Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra**  
Jefa del Departamento de Hematología del CMN "20 de Noviembre"  
Teléfono de contacto: 52005003 ext. 14478 y 14252

Para cualquier duda o aclaración favor de contactar a la Dra. Zoe G. Sondón García, Presidente del Comité de Ética e Investigación, teléfono de contacto 52005003 ext. 14296 y 14243. C.M.N. 20 DE NOVIEMBRE



# CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES



**"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los  
Trabajadores del Estado"**

C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"



## CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD.

### PACIENTES

**NOMBRE DEL ESTUDIO: "Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza"**

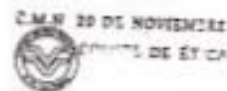
México, Ciudad de México a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2017.

Por favor tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga, para decidir si participa o no deberá tener el conocimiento suficiente acerca de los beneficios y riesgos del presente estudio de investigación, este estudio no le causará ningún costo.

Estimado Señor(a): \_\_\_\_\_  
se le invita a participar en el estudio llamado **"Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza"**, que se desarrolla en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE en el departamento de Investigación, cuyo objetivo será determinar: 1) ¿Cómo algunos genes influyen en el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B?; 2) ¿Cómo estos genes influyen para que la respuesta sea más agresiva en algunos pacientes y otros no?; 3) se analizará si estos genes son característicos de nuestra población, por lo que se realizará un cuestionario de "ancestría" ya que es importante saber ¿Cómo estos genes se heredan de padres a hijos?, además sabremos de qué estado de la República Mexicana son originarios al igual que sus familiares, si hablan alguna lengua distinta al español-castellano y las características de la vivienda (ya que es distinta entre los Estados).

Mi participación en el estudio consiste en la donación de tres muestras de sangre de 4 ml cada una, a partir de la cual, de una de ellas se analizarán los genes que se estudiarán (*PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *IKZF1*), de otra se analizará la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR con la cual sabremos una parte del desarrollo de los linfocitos y de la tercera se analizará la presencia de el gen *BCR/ABL*. La toma de las muestras será obtenida por los médicos tratantes, los efectos adversos por dicha toma de sangre son mínimos y pueden incluir, moretones en el sitio de la punción (hematoma) o dolor local, los cuales, en caso de presentarse, usualmente desaparecen en una semana; en caso de ser necesario, podrá contar con atención médica pertinente.

Se me ha informado que el análisis y obtención de resultados toma aproximadamente 6 meses, por lo que después de ese tiempo yo podré obtener los resultados, contactando al investigador principal. En caso de sobrar muestra se procederá a la eliminación del mismo, conforme a lo estipulado por la normatividad vigente (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA 1-2002).



Av. Félix Cuevas 248, Col. Del Valle, C.P. 05230, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México. Tel: (55) 52 00 3544.

1/3



## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES



"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los  
Trabajadores del Estado"

C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"



### **BENEFICIOS:**

A pesar de que **no existe un beneficio directo** para los participantes, y no tendrá ninguna influencia en el tratamiento o diagnóstico al cual actualmente es sometido, sin embargo el presente estudio tendrá la ventaja de conocer cuáles son mis genes que se han estudiado, además podría permitir desarrollar conocimientos para mejorar la atención de todos aquellos pacientes mexicanos que padezcan de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.

Gracias a su participación altruista, se podría beneficiar a muchos pacientes al encontrar nuevas formas de atender y mejorar la calidad de vida en estas enfermedades.

### **RIESGOS:**

Su participación no conlleva riesgo alguno para su salud, la toma de muestra sanguínea se llevará a cabo por gente experta y en caso de presentar algún moretón por dichos procedimientos, se me brindará la atención médica pertinente e inmediata.

### **PARTICIPACIÓN:**

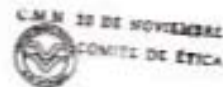
Su participación es **VOLUNTARIA**, usted puede decidir libremente participar o no, esto no afectará la atención en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE. Además, se me ha informado que soy libre de solicitar mi retiro del estudio en cualquier etapa del mismo.

### **MANEJO DE LA INFORMACION:**

En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley Federal de Protección de Datos: licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger sus datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Toda la información proporcionada se utilizará con fines de investigación y conforme al consentimiento informado, entendiendo que todos los resultados durante el desarrollo de la misma. Así mismo, se me ha informado que mi nombre no será revelado ni utilizado de forma pública en ninguna etapa del desarrollo de este protocolo de investigación.

### **PARTICIPANTE:**

Confirmando haber recibido información suficiente y clara sobre el estudio propuesto, doy mi autorización para ser incluido en este proyecto de investigación, reservándome el derecho de abandonarlo en cualquier momento si así lo decido.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PACIENTES



**"Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los  
Trabajadores del Estado"**

C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"



\_\_\_\_\_  
**Firma y nombre del paciente**

Dirección y teléfono del participante

TESTIGOS:

(1) Nombre y firma \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

(2) Nombre y firma \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

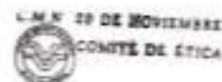
INVESTIGADOR O MÉDICO QUE INFORMA: \_\_\_\_\_

SERVICIO: \_\_\_\_\_

Le he explicado al Sr (a) \_\_\_\_\_, la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He dado respuesta a todas sus dudas, y le he preguntado si ha comprendido la información proporcionada, con la finalidad de que pueda decidir libremente participar o no en este estudio. Acepto que he leído, conozco y me apego a la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos, que pondré el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación, por encima de cualquier otro objetivo.

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

\_\_\_\_\_  
**Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra**  
**Jefa del Departamento de Hematología del CMN "20 de Noviembre"**  
Teléfono de contacto: 52005003 ext. 14478 y 14252



Para cualquier duda o aclaración favor de contactar a la Dra. Zoe G. Sondón García, Presidente del Comité de Ética e Investigación, teléfono de contacto 52005003 ext. 14296 y 14243.

## AVISO DE PRIVACIDAD



Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"  
Subdirección Médica  
Subdirección de Enseñanza e Investigación  
Comité de Ética en Investigación

"2016, AÑO DEL NUEVO SISTEMA DE JUSTICIA PENAL"

México, CDMX a \_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 20\_\_.

### AVISO DE PRIVACIDAD

**TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:** "Determinación de marcadores genéticos asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B en población mexicana mestiza"

Número de registro: \_\_\_\_\_

El presente Aviso de Privacidad tiene como objeto informarles sobre el tratamiento que se les dará a sus datos personales cuando los mismos son recabados, utilizados y almacenados.

**Investigador responsable de recabar sus datos personales, de su uso y protección:**

Nombre: Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra

Domicilio: Av. Félix Cuevas 540, Col. Del Valle, C.P. 03229, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México.

Teléfono: 52005003 ext. 14478 y 14252

Correo electrónico:

Su información personal será utilizada con la finalidad del uso de la información del cuestionario realizado para la determinación de la ancestría (si son mestizos mexicanos) y herencia familiar de los genes a estudiar (*PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR*, *PTEN*, *IKZF1*, *BCR/ABL1*), para lo cual requerimos obtener los siguientes datos personales: lugar de nacimiento (de sus padres, de sus abuelos y el de usted), el idioma o lengua que habla, el tipo de domicilio y si alguien más de su familia participa en el estudio; estos datos son considerados como sensibles de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.

Es importante que usted sepa que todo el equipo de investigación que colabora en este estudio se compromete a que todos los datos proporcionados por usted serán tratados bajo medidas de seguridad y garantizando siempre su confidencialidad. En el caso de este proyecto, las medidas que se tomarán para ello serán: utilizar códigos y número de expediente; los cuales se almacenarán en una base de datos y/o archivo electrónico bajo custodia del investigador principal.

Los datos que usted nos proporciona no serán compartidos con otras instancias o instituciones y únicamente serán usados por el equipo de investigadores para este proyecto.

Usted tiene derecho de acceder, rectificar y cancelar sus datos personales, así como de oponerse al manejo de los mismos o anular el consentimiento que nos haya otorgado para tal fin, presentando una carta escrita dirigida a la investigadora responsable Dra. Martha Leticia Alvarado Ibarra, o con la Presidente del Comité de Ética en Investigación del CMN "20 de Noviembre", Dra. Zoé Gloria Sordón García. Tel. 52005003 Ext. 14295 y 14243.

**DECLARACION DE CONFORMIDAD:** Manifiesto estar de acuerdo con el tratamiento que se dará a mis datos personales

Nombre y firma del sujeto de investigación o paciente:

\_\_\_\_\_

1/1

Presidencia del Comité de Ética en Investigación: Dra. Zoé G. Sordón García  
Av. Félix Cuevas 540, Col. Del Valle, C.P. 03229, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México.  
Tel.: (55) 52 00 2544.

