



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

TESIS:

**"Expresión de STAT5B y BCL-XL en pacientes con Leucemia
Linfoblástica Aguda que presentan el gen de fusión
TEL-AML1"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Químico Farmacobiólogo
Jorge Gonzales Jaramillo

Director de Tesis:
Doctor en Ciencias Químico Biológicas
Sergio Gutiérrez Castellanos

Co-Directora de Tesis:
Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Sandra Guadalupe Sánchez Ceja



Morelia, Michoacán,
México
2017

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Aprobó la tesis presentada por:

Químico Farmacobiólogo
JORGE GONZALES JARAMILLO

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas
Presidente

Doctor en Ciencias en Biología Celular
Carlos Cortes Penagos
Vocal 1

Maestro en Ciencias de la Salud
Eloy Pérez rivera
Vocal 2

Doctor en Ciencias Químico Biológicas
Sergio Gutiérrez Castellanos
Director de Tesis

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Sandra Guadalupe Sánchez Ceja
Co-Director(a) de Tesis

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia
del CONACyT

El estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez" de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada
durante la realización de su tesis

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"
División de Estudios de Posgrado
Laboratorio de Citopatología Molecular

Dirección de Tesis:

Doctor en Ciencias Químico Biológicas
Sergio Gutiérrez Castellanos
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Co-dirección de tesis:

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Sandra Guadalupe Sánchez Ceja
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Contribuciones:

Química Farmacobióloga Jaqueline
Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de Morelia
"Eva Sámano de López Mateos"

Médico Oncólogo Pediatra
Eloy Pérez Rivera
Hospital Infantil de Morelia
"Eva Sámano de López Mateos"

*“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más para temer menos”.*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar hasta donde he llegado, por iluminarme y escucharme, acompañarme y cuidarme día a día en cada momento y darme la oportunidad de llevar a cabo grandes proyectos y poner en mi camino maravillosas personas que reflejan su gran amor.

A mi asesor, el D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por todas sus enseñanzas y consejos, que serán sin duda de gran valor en mi desarrollo profesional. Por creer en mí y encomendarme la tarea de llevar a cabo esta investigación. Por su gran ejemplo de pasión por la ciencia y por incentivarme el gusto por la investigación. Por todo el esfuerzo y las horas dedicadas a mi formación, gracias.

A todos los miembros de mi comité tutorial: la D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, el D. C. Carlos Cortes Penagos, la D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja y el Dr. Eloy Pérez Rivera por sus valiosas observaciones y por las discusiones generadas que me permitieron enriquecer este trabajo.

A la D. en C. Martha Eva Viveros Sandoval, por permitirme llevar a cabo parte de este trabajo en su laboratorio, por su gran disposición y apoyo brindado. Además por todos los conocimientos y el entusiasmo compartido en sus clases, gracias.

A los profesores que me compartieron de su conocimiento y experiencia a lo largo de mi estancia en este programa: la D. en C. Biol. Guadalupe Partida Hernández, D. en C. Bertha Fenton Navarro, D.C. Ana Edith Higareda Mendoza y al Maestro Humberto Ruiz Vega a quien siempre recordaré con cariño.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por ser mi Alma Máter y forjarme como un Profesionista con la capacidad de servir a la sociedad.

DEDICATORIA

A mis padres Hilda Jaramillo Cortes y Jorge Gonzales Ramírez, a quien les debo todo lo que soy. Por su amor y entusiasmo con el que me han formado como hombre y como ser humano, por todo el cariño y por su apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A mis hermanos, Maggy y Jesús. Por estar ahí siempre y en todo momento. La vida sería aburrida sin ustedes, y yo no sería el mismo.

A toda mi familia, por aguardar siempre mi llegada con alegría, por sus consejos, por esos grandes momentos juntos y por creer siempre en mí.

A Misael, por su gran apoyo todo este tiempo; a Chupén por demostrar siempre ser un gran amigo; a Diana y a Paul por su amistad invaluable.

A Ale y Dani por su apoyo incondicional desde el primer día, por los ratos de risas y por todo lo que aprendí de ustedes.

A todas las personas que aunque no han sido mencionadas que siempre me ofrecieron su ayuda y que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de Leucemia.....	1
1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda	1
1.3 Epidemiología	1
1.4 Factores de Riesgo	2
1.5 Patogénesis	3
1.6 Manifestaciones Clínicas	4
1.7 Pronóstico	4
1.8 Clasificación Inmunológica	5
1.9 Evaluación Molecular	5
1.9.1 Translocación t(9;22).....	7
1.9.2 Translocación t(1;19).....	7
1.9.3 Translocación t(4;11).....	7
1.10 TEL-AML1	8
1.10.1 TEL AML1 en la Patogénesis de la LLA	9
1.11 Vía JAK-STAT	10
1.12 Regulación de la vía JAK- STAT	12
1.13 Transductor de la Señalización y Activador de la Transcripción 5 (STAT5)	14
1.13.1 STAT5 en la Linfopoyesis	14
1.13.2 STAT5 en la Leucemia	15
1.13.3 Papel de STAT5A y STAT5B.....	16
1.14 El Gen BCL-xL	19
II JUSTIFICACIÓN	22
III. PREGUNTA DE INVESTIGACION	23
IV HIPÓTESIS	23
V OBJETIVOS	24
VI MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Diseño Experimental	25
6.2 Sitio de Estudio	25
6.3 Muestra	25

6.4 Criterios de Inclusión	25
6.5 Criterios de exclusión	26
6.6 Criterios de eliminación	26
6.7 Descripción de las variables	26
6.8 Procedimientos	26
6.8.1 Clasificación de los pacientes.....	27
6.8.2 Características clínicas	27
6.8.3 Inmunofenotipo por citometría de flujo.....	28
6.8.4 Lisis de glóbulos rojos.....	28
6.8.5 Determinación de viabilidad y cuenta de glóbulos blancos	29
6.8.6 Extracción del ARN.....	29
6.8.7 Cuantificación y determinación de pureza del RNA.....	30
6.8.8 Síntesis de cDNA.....	30
6.9 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
6.9.1 Determinación de <i>TEL-AML1</i> y <i>BCR-ABL</i> p190.....	30
6.9.2 Amplificación de <i>ABL</i> , <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i>	31
6.10 Método Estadístico	34
6.11 Consideraciones Éticas	34
6.12 Recursos Físicos y Materiales	34
VII RESULTADOS	35
7.1 Datos clínicos de los Pacientes	35
7.2 Calidad del RNA	39
7.3 Determinación de la expresión de <i>TEL-AML1</i> y <i>BCR-ABL</i> p190	39
7.4 Estandarización de la amplificación y curva exponencial de <i>ABL</i>, <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i>	40
7.5 Semi-cuantificación de <i>ABL</i>, <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i>	41
VIII ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
8.1 Pacientes que expresan <i>TEL-AML1</i>	45
8.2 Pacientes que no expresan <i>TEL-AML1</i>	46
IX DISCUSIÓN	48
X CONCLUSION	50
XI PERSPECTIVAS	50
XII REFERENCIAS	51
XIII ANEXOS	56

Anexo I Carta de consentimiento informado	56
Anexo II Formato de recolección de datos del paciente.....	57
Anexo III Carta de aceptación del proyecto de investigación en el Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”	58
Anexo IV Carta de aceptación del protocolo de investigación en el Hospital Civil “Dr. Miguel Silva”	59

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación esquemática de las proteínas AML1, TEL y TEL-AML1 de longitud completa.....	8
2. Vía de señalización de la Janus Kinasas y las STAT.....	11
3. Cascada de señalización de la vía JAK/STAT.....	13
4. Panorama general del desarrollo de linfocitos con énfasis en el papel de STAT5.....	15
5. STAT5 el nodo central de señalización en la leucemia <i>BCR-ABL+</i>	17
6. Mecanismo de La Proteína BclXL en la inhibición de la apoptosis mediada por Bax, Bak y Bid.....	20
7. Esquema general de trabajo.....	27
8. Distribución por sexo y edad de los pacientes.....	35
9. Recuento de leucocitos al diagnóstico.....	36
10. Clasificación de los pacientes por grado de anemia y trombocitopenia.....	37
11. Integridad del ARN de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.....	39
12. PCR y PCR anidado para determinación de <i>TEL-AML1</i> y <i>BCR-ABL</i> p190.....	40
13. Determinación del número de ciclos para alcanzar la fase exponencial de la PCR en los genes <i>ABL</i> , <i>BCL-xL</i> y <i>STAT5B</i>	41
14. Expresión de <i>ABL</i> , <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i> en los 14 pacientes.....	42
15. Vista del gráfico del programa Quantity One Chemi-Doc XRS system para la medición de la intensidad de las bandas.....	43
16. Correlación de <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i> en pacientes con <i>TEL-AML1</i>	46
17. Correlación de leucocitos al diagnóstico y DHL.....	46
18. Correlación de <i>BCL-xL</i> y el índice <i>BCL-xL/STAT5B</i>	47
19. Correlación de leucocitos y la cantidad de hemoglobina al diagnóstico.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

1. Iniciadores para la determinación de los genes <i>ABL</i> , <i>STAT5B</i> , <i>BCL-xL</i> , <i>TEL-AML1</i> y <i>BCR-ABL</i> p190.....	33
2. Condiciones de corrida en el Termociclador Palm Cyclor.....	33
3. Factores clínicos y de pronóstico.....	38
4. Información inmunofenotípica y del ciclo celular.....	38
5. Valores de expresión de <i>ABL</i> , <i>STAT5B</i> y <i>BCL-xL</i>	44
6. Análisis de medianas de las características clínicas en los grupos de pacientes que expresan y que no expresan <i>TEL-AML1</i>	45

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia maligna más común en los niños y se caracteriza por alteraciones moleculares que provocan la proliferación anormal de linfoblastos. La LLA presenta mutaciones somáticas que ocurren después de la concepción en el desarrollo de las células linfoides. Las células B presentan cuatro etapas de maduración: pre-B temprana, pre-B, pre-B transicional y B madura. La translocación t(12;21)(p12;q22) origina el gen de fusión TEL-AML1, la alteración genética más frecuente en niños con LLA-B, aproximadamente ocurre 20-25%. STAT5 juega un papel crucial en el desarrollo de linfocitos B y T. En las células hematopoyéticas, la activación constitutiva de STAT5 contribuye a la leucemogénesis. La expresión excesiva de las formas de *STAT5B* resulta en un aumento de la actividad transcripcional en las leucemias. Se ha demostrado que STAT5 es la vía más importante para la regulación de *BCL-xL* en líneas celulares de leucemia y células de pacientes con Leucemia. Cuando se sobre expresa, Bcl-xL es responsable de la supervivencia de las células tumorales. **Objetivo.** Evaluar la expresión de *STAT5B* y *BCL-xL* en pacientes con leucemia linfoblástica aguda con y sin expresión del gen de fusión *TEL-AML1*. **Materiales y Métodos.** Se incluyeron 14 pacientes con LLA, de los cuales 7 presentan el gen de fusión TEL-AML1. Se obtuvieron muestras de sangre periférica y se aisló el RNA por el método Tripuré. Se sintetizó cDNA y se amplificaron los genes *STAT5B*, *BCL-xL* y *ABL* a 24, 25 y 23 ciclos respectivamente para medir su expresión en la fase exponencial de la PCR utilizando el programa Quantity One. Se recabaron datos clínicos de los pacientes e Inmunofenotipo. Se tabularon los datos obtenidos y se buscó diferencias y correlaciones. **Resultados.** Se encontró que los pacientes que expresan *TEL-AML1* no presentaron diferencias significativas en sus características clínicas e inmunofenotipo en comparación del grupo que no lo expresa, a excepción de la Fase S del ciclo celular, el cual es mayor e los pacientes que expresan *TEL-AML1*. En el grupo de pacientes que expresan *TEL-AML1* se encontró que la expresión de *STAT5B* se correlaciona con expresión de *BCL-xL* ($P = 0.000$) y que la cantidad de leucocitos se correlaciona con la cantidad de enzima DHL ($P = 0.000$). En el grupo que no expresan *TEL-AML1* se encontró que la expresión de *BCL-xL* se correlaciona con el índice *BCL-xL* ($P = 0.000$) y que la cantidad de leucocitos se correlaciona con la cantidad de hemoglobina ($P = 0.045$). **Conclusión.** La expresión de *BCL-xL* en el grupo de pacientes que presentan *TEL-AML1* es directamente proporcional a la expresión de *STAT5B* y presentan mayor % de la Fase S del ciclo celular que los pacientes que no lo presentan; sin embargo no se encontró una menor expresión de *STAT5B* y *BCL-xL* en comparación con los que no presentan *TEL-AML1* como era lo esperado.

Palabras clave: Leucemia, *STAT5B*, *BCL-xL*, *TEL-AML1*, expresión.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children and is characterized by molecular alterations that cause the abnormal proliferation of lymphoblasts. ALL presents somatic mutations that occur after conception on the development of lymphoid cells. B cells have four stages of ripening: early pre-b, pre-b, transitional pre-b and mature B. Translocation t(12;21) (p12; q22) originating the fusion gene TEL-AML1, the most frequent in children with ALL-B genetic alteration, occurs approximately 20-25%. STAT5 plays a crucial role in the development of lymphocytes B and T. In hematopoietic cells, the constitutive activation of STAT5 contributes to the leukemogenesis. The excessive forms of *STAT5B* expression results in an increase of transcriptional activity in leukemias. It has been shown that STAT5 is the most important way for the regulation of *BCL-xL* in leukemia cell lines and cells from patients with leukemia. When is it overexpressed, Bcl-xL is responsible for the survival of the tumor cells. **Objective.** Evaluate the expression of *BCL-xL* and *STAT5B* in patients with acute lymphoblastic leukemia and non-expression of the gene of *TEL-AML1* fusion. **Materials and methods.** We included 14 patients with ALL, of which 7 have the TEL-AML1 fusion gene. Peripheral blood samples were obtained and isolated RNA Tripure method. CDNA was synthesized and *STAT5B*, *BCL-xL* and *ABL* genes to 24, 25 to 23 cycles amplified respectively to measure their expression in the exponential phase of the PCR using the Quantity One. Clinical data of the patients and immune were gathered. Obtained data were tabulated and you are looked for differences and correlations. **Results.** We found that patients who express *TEL-AML1* did not show significant differences in their clinical features and immunefenotipe compared to the group that does not express it, with the exception of the S phase of the cell cycle, which is higher e patients expressing *TEL-AML1*. It was found in the Group of patients who express *TEL-AML1* *STAT5B* expression correlates with expression of *BCL-xL* ($P = 0.000$) and that the amount of leukocytes is correlated with the amount of enzyme DHL ($P = 0.000$). In the group which do not express *TEL-AML1* found that *BCL-xL* expression correlates with the *BCL-xL* index ($P = 0.000$) and that the amount of leukocytes is correlated with the quantity of hemoglobin ($P = 0.045$). **Conclusion.** The expression of *BCL-xL* in the Group of patients that present *TEL-AML1* is directly proportional to the expression of *STAT5B* have greater % of the S phase of the cell cycle that patients who do not have it; However a lower expression of *BCL-xL* and *STAT5B* not found in comparison with those who do not present *TEL-AML1* as it was expected.

Key words: Leukemia, *STAT5B*, *BCL-xL*, *TEL-AML1*, expression

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
<i>BCR-ABL</i> p190	Proteína 190 del gen <i>BCR-ABL</i>
CD	Cúmulo de diferenciación
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cyt C	Citocromo C
DBD	Dominio de unión al DNA
dATP	Desoxiadenosín trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FAB	Franco-Américo-Británico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GH	Hormona del crecimiento
g/dL	gramos sobre decilitros
Hb	Hemoglobina
HOX	Home box
Ig M	Inmunoglobulina M
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
JAK	Janus Kinases
mg	miligramo

mEq	miliequivalentes
mL	mililitros
mM	milimol
mm³	milímetro cúbico
MO	Médula ósea
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PIAS	Proteínas inhibidoras de STAT activadas
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcriptasa inversa asociada a la PCR
SOCS	Supresores de la activación por citocinas
STAT	Transductor de la Señalización y Activador de la Transcripción
t	translocación
TAE	Tris Ácido acético EDTA
Taq. Pol.	Polimerasa de <i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	Tris ácido Bórico EDTA
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
µL	microlitro
UMSNH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

I INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Leucemia

La leucemia aguda es una neoplasia maligna de células precursoras hematopoyéticas que se origina como resultado de mutaciones somáticas, lo que altera la proliferación y maduración de la hematopoyesis, desplazando la producción de células sanguíneas normales por células leucémicas (blastos). De manera general se dividen en leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) [1].

1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia maligna más común en los niños y representa aproximadamente la cuarta parte de todas las neoplasias en personas menores de 15 años. La clasificación FAB describe tres subtipos morfológicos (L1, L2 y L3), teniendo sólo un valor histórico debido a que no son subgrupos biológicamente relevantes y su valor como factor pronóstico es limitado. La clasificación actual de la LLA se basa en el inmunofenotipo la cual identifica al menos ocho subtipos, correspondiendo cuatro de LLA de estirpe B (LLA-B) y cuatro para la estirpe T (LLA-T) [2].

La LLA se caracteriza por alteraciones moleculares que provocan la proliferación anormal de células precursoras de la serie linfoide o linfoblastos y que infiltra más del 25% de la médula ósea donde rápidamente proliferan desmedidamente y ocupan el espacio que los demás precursores hematopoyéticos necesitan para su desarrollo, como eritrocitos y plaquetas, afectando su producción [3].

1.3 Epidemiología

La LLA es la neoplasia más común de la infancia en México seguida de linfomas y tumores de sistema nervioso central; es poco más frecuente en niños que en niñas

(1.3:1.0) y más común en países industrializados. La edad de presentación es variable; la LLA puede aparecer desde el nacimiento, hasta los 18 años de edad, con un pico de presentación entre los 2 y los 5 años de edad [4, 5].

En México la LLA ocupa el séptimo lugar en cuanto a mortalidad en niños de uno a cuatro años de edad, con una tasa de 3.2 por cada 100,000 habitantes, y en los niños de 4 a 14 años es la segunda causa de muerte, sólo después de los accidentes de tránsito de vehículo motor, con una tasa de 2.7 por 100,000 habitantes [6]. La LLA se presenta con una tasa anual aproximada de 122 casos nuevos/millón de habitantes. Se observa un aumento marcado de la incidencia en niños de 2 a 3 años de edad [7].

En Estados Unidos, en el 2010 constituyó el 3% de las neoplasias en adultos y se reportó una tasa de incidencia de 1.6 casos por 100,000 habitantes por año [8]. Según el estudio SEER la LLA presentó una incidencia mayor en la población hispana, con una tasa de 2.6 por cada 100,000 habitantes, así como también una alta incidencia en la población de población negra donde se presentó de hasta 3 casos por cada 100,000 habitantes [9].

1.4 Factores de Riesgo

En 5% de los casos, la LLA se relaciona con síndromes genéticos, como el Síndrome de Down, en el que hay un mayor riesgo de manifestar la enfermedad. La inmunodeficiencia hereditaria o adquirida, como deficiencia de inmunoglobulina A, la agammaglobulinemia, y el síndrome de Wiskott-Aldrich son enfermedades con alto riesgo de padecer LLA [10,11].

El factor hereditario es raro, sólo juega un papel pequeño sobre el origen de este padecimiento. Incluso se ha observado que el riesgo de padecer leucemia a temprana edad en gemelos es cuatro veces más alto, es decir, si un gemelo padece leucemia, hay 20% de probabilidades de que el otro la manifieste. En caso de que un gemelo la padezca en el primer año de vida, el otro la tendrá unos meses después, pudiéndose presentar, incluso, metástasis intrauterina de un

gemelo a otro [11, 12]. Hay varios factores de riesgo para padecer LLA. Entre ellos se encuentran los factores ambientales, como la exposición a rayos X en útero, o a reacciones nucleares, como las ocurridas en Hiroshima y Nagasaki. También hay factores ocupacionales, como en tareas agrícolas, de soldadura, en la industria maderera, así como por el uso de pesticidas, plaguicidas, tintes de cabello y solventes como el benceno; así como el tabaquismo antes y durante el embarazo al igual que consumo materno de alcohol en el embarazo.

La leucemia secundaria que sigue a una quimioterapia y/o radioterapia se caracteriza por anomalías citogenéticas específicas y generalmente tienen un pronóstico pobre. Compuestos alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II son con más frecuencia los agentes implicados en la leucemia relacionada a terapia. [13, 14].

1.5 Patogénesis

Se piensa que la mayoría de los casos de LLA son el resultado de mutaciones somáticas que ocurren después de la concepción en el desarrollo de las células linfoides. Una tendencia familiar se ha establecido sólo en casos raros. Existe una fuerte evidencia de que los pasos iniciales en algunas leucemias ocurren en el útero. Esta evidencia proviene de estudios en gemelos idénticos en los que existe una alta concordancia de leucemia con reordenamientos genéticos idénticos [15].

El análisis molecular de las alteraciones genéticas presentes en las células leucémicas ha contribuido al entendimiento de la patogénesis de la LLA. El mecanismo general incluye la expresión de oncogenes creados principalmente por la fusión de genes que codifican cinasas y alteran factores de transcripción. Estas alteraciones contribuyen a la transformación leucémica de la célula madre hematopoyética o de sus progenitores por medio del cambio de las funciones celulares como regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación y apoptosis. En la LLA infantil hay evidencia de que en precursores linfoides comprometidos existen alteraciones en etapas tempranas de la diferenciación

celular lo que favorece la proliferación celular no controlada, alterándose finalmente la apoptosis [16].

1.6 Manifestaciones Clínicas

La aparición de leucemia linfoblástica aguda varía según sus manifestaciones clínicas, que reflejan el grado de insuficiencia de la medula ósea, de infiltración extra medular y de agudeza. Casi la mitad de los pacientes cursa con fiebre y la tercera parte tiene como origen de la fiebre un foco infeccioso. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son astenia y adinamia debidas a anemia. Del 33 al 43% tiene sangrado por trombocitopenia y 25% refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación. Los síntomas menos comunes son cefalea, vómito, alteraciones de las funciones mentales, oliguria y anuria. Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis. El hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extra medulares más afectados, y el grado de organomegalia es más importante en niños que en adultos: en 17% se encuentra hepatomegalia; en 44%, esplenomegalia, y en 15%, linfadenopatía [10, 14]. La infiltración al sistema nervioso central puede manifestarse con signos de aumento de la presión intracraneal. En los niños, la afectación testicular puede presentarse como una masa testicular [17].

1.7 Pronóstico

Los niños y adolescentes con más de 10 años de edad a menudo tienen características clínicas de pronóstico desfavorable. Los recuentos de leucocitos en el momento del diagnóstico y la Enfermedad Mínima Residual (EMR), después de la terapia de inducción pueden ser factores importantes para el pronóstico a largo plazo [18].

En protocolos modernos, la terapia adaptada a riesgos refleja la probabilidad de fracaso del tratamiento en la LLA infantil. Por lo que, los factores pronósticos

evaluados inicialmente al diagnóstico se utilizan para estimar el riesgo individual de recaída de un paciente y para ajustar la intensidad de tratamiento requerido por la terapia, se estratifica en diferentes grupos de riesgo (estándar ó intermedio, bajo y alto) [19].

1.8 Clasificación Inmunológica

La clasificación inmunológica se establece en base a la expresión de marcadores antigénicos asociados a linaje. Las células B presentan cuatro etapas de maduración: pre-B temprana, pre-B, pre-B transicional y B madura. Los marcadores para células pre-B tempranas incluyen CD19, CD22, CD10, IgM (inmunoglobulina M) y deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Las células pre-B representan cerca del 25% de los casos de LLA y se define por la expresión de cadenas pesadas de inmunoglobulinas en el citoplasma, pero no en la superficie. Estas células expresan además CD19, CD22 y CD79a. Más del 95% de las células pre-B expresan CD10 y TdT, pero solamente dos terceras partes expresan CD34. Los blastos expresan CD10, usualmente TdT y algunas veces CD34. Las leucemias de células B madura representan 2 al 4% de los casos y los blastos expresan cadenas pesadas y ligeras κ ó λ de inmunoglobulinas de superficie. Este inmunofenotipo se correlaciona en la mayoría de los casos con el subtipo morfológico L3. La célula expresa CD19, CD22, CD20 y frecuentemente CD10 y CD23 [20, 21].

1.9 Evaluación Molecular

La LLA se asocia a aberraciones cromosómicas tales como re-arreglos génicos o traslocaciones, hiper e hipo diploidías. Las translocaciones involucran recombinación entre cromosomas normalmente separados, lo cual resulta en modificaciones en la regulación de un gen o bien, en la formación de una proteína quimérica alterada, este último evento es lo que más comúnmente ocurre en LLA (de precursores de células B). Factores de transcripción o proteínas de

señalización críticos en el desarrollo de las células madre o en la especificación del linaje durante la hematopoyesis son los principales blancos de corrupción por fusión génica en la leucemia [15, 22].

Dentro de las alteraciones genéticas que aportan información importante respecto al pronóstico de la enfermedad está el gen de fusión *BCR-ABL* que lugar a lo que se conoce como cromosoma Filadelfia, el cual es producto de la translocación t(9;22) (q34;q11). Este tipo de alteración se presenta en niños con LLA aproximadamente en un 2-5% y 10-20% adultos. La presencia de esta translocación se asocia claramente a mal pronóstico [22,23].

Otra alteración importante es la translocación t(12;21)(p12;q22) la cual da lugar al gen de fusión *TEL-AML1*, la alteración genética más frecuente en niños con LLA-B, aproximadamente ocurre 20-25%, mientras que en adultos la frecuencia es solo del 3%. Esta alteración genética se asocia a buen pronóstico. Por otro lado la translocación t(4;11) la cual da lugar al gen de fusión *MLL- AF4*, es detectada en 50-70% en lactantes con LLA y aproximadamente el 5% en niños con LLA. Y finalmente la translocación t(1;19) (q23; p13) da lugar al gen de fusión *E2A-PBX1*, esta alteración se presenta en alrededor de 5-6% en niños con LLA y 3% en adultos con LLA. Se correlaciona con la presencia de características clínicas de alto riesgo [7, 22,23].

Aproximadamente el 75% de los casos de LLA infantil presentan anomalías genéticas recurrentes, incluyendo aneuploidías, hiperdiploidías, hipodiploidías o arreglos cromosómicos estructurales como las translocaciones. El análisis citogenético de las células blásticas en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) ha permitido el reconocimiento de alteraciones cromosómicas específicas de gran importancia pronóstica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un ensayo enzimático que provee un método más rápido y más sensible para detectar rearrreglos de genes. Las translocaciones e inversiones que resultan en genes fusionados son especialmente adecuadas para el análisis con la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR), una

técnica en la cual el RNAm fusionado se transcribe hacia cDNA y entonces amplificado por PCR usando iniciadores específicos [23].

1.9.1 Translocación t(9;22)

El gen de fusión *BCR-ABL* se deriva del cromosoma Filadelfia el cual resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, t(9;22)(q34;q11). Parte del gen *ABL* se fusiona con el gen *BCR* dando lugar al gen *BCR-ABL*. Existen tres tipos de productos de fusión de diferente peso molecular: p190, p210 y p230 [24]. La presencia de esta translocación se asocia claramente a mal pronóstico, ya que la leucemia Ph-positivo es una enfermedad agresiva en la que los pacientes tienen un resultado muy pobre, debido a que el tratamiento convencional como interferón alfa no es eficaz para este subtipo y las respuestas al imatinib son a menudo dramáticas y duraderas, el 30-40% de los pacientes eventualmente necesitarán tratamiento adicional [25].

1.9.2 Translocación t(1;19)

La translocación t(1;19) da lugar al gen de fusión *E2A-PBX1*, esta alteración es detectada en alrededor de 5-6% en niños con LLA y 3% en adultos con LLA. El PBX pertenece a la subfamilia de proteínas con homodominio PBC y es un cofactor que aumenta en gran medida la especificidad de las proteínas HOX. Se correlaciona con la presencia de características clínicas de alto riesgo [26, 27].

1.9.3 Translocación t(4;11)

La translocación t(4;11) da lugar al gen de fusión *MLL-AF4*, es detectada en 50-70% en lactantes con LLA y aproximadamente el 5% en niños con LLA. Constituye una de las alteraciones genéticas que confiere mal pronóstico y recaída temprana. [26, 28]. El gen *MLL* (*del inglés, Mixed Linage Leukemia*) codifica a una proteína homóloga a TRX (TRITHORAX, de *Drosophyla*) y es capaz de regular, a través de su actividad metil transferasa de histonas, la transcripción de genes HOX los

cuales están involucrados tanto en el patrón de desarrollo como en la diferenciación hematopoyética [29].

1.10 TEL-AML1

La translocación t(12;21)(p12;q22) origina el gen de fusión *TEL-AML1*, la alteración genética más frecuente en niños con LLA-B, aproximadamente ocurre 20-25%, mientras que en adultos la frecuencia es solo del 3% y hasta la fecha ausente en otro tipo de leucemia. Esta alteración genética se asocia a buen pronóstico, independientemente de otros factores como la edad o la cifra de leucocitos; sin embargo, algunos pacientes recaen en una fase tardía durante la terapia o después de esta, a la vez que también podrían lograr una segunda remisión sostenida [26, 30].

La proteína quimérica TEL-AML1 asociada a la leucemia consiste en las secuencias *TEL* situadas en el extremo amino-terminales de la región *ETS DBD* y todas las regiones funcionales conocidas de *AML1*. Al respecto, TEL-AML1 es estructuralmente distinta de otras proteínas de fusión AML1, que retienen sólo el dominio Runt de amino-terminal y no las secuencias reguladoras Carboxilo-terminales de AML1 (Figura 1).

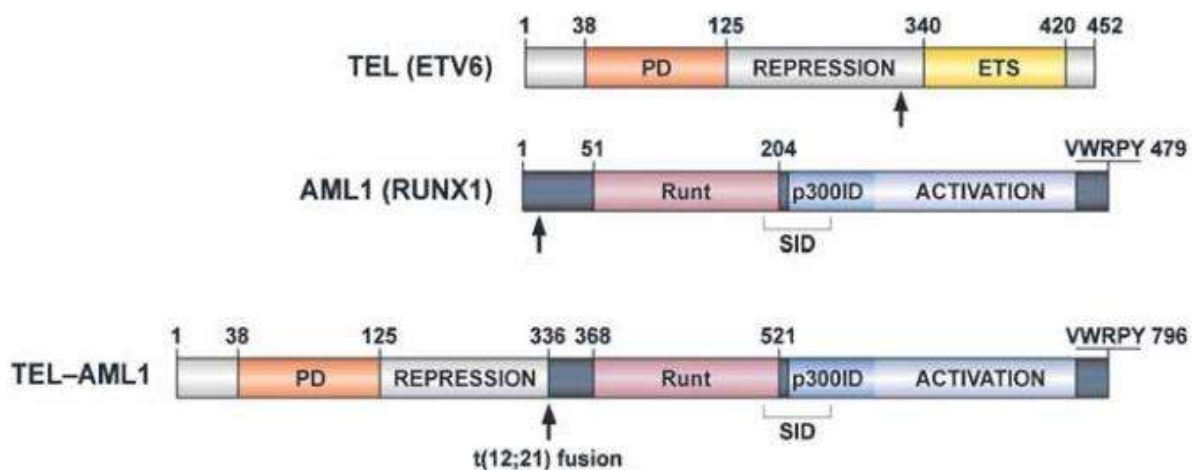


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas AML1, TEL y TEL-AML1 de longitud completa. Las Flechas indican el sitio de fusión. (Tomada de Zelent A. y Col. 2014).

1.10.1 *TEL AML1* en la Patogénesis de la LLA

Hay evidencia de que *TEL-AML1* se origina pre-natalmente como una mutación temprana o iniciadora. Otros estudios indican que aunque *TEL-AML1* puede estar vinculado a una expansión temprana clonal, éste es insuficiente para que la leucemia se manifieste. En primer lugar, el intervalo postnatal prolongado, o latencia, antes del diagnóstico de la enfermedad puede ser hasta una década o más. Esto sugiere que se requieren eventos genéticos adicionales o secundarios y complementarios [31].

En las leucemias agudas iniciadas por otros genes de fusión, incluyendo fusiones *MLL* y *AML1-ETO*, las mutaciones de la quinasa *FLT3* parecen proporcionar los eventos genéticos complementarios. El análisis de secuencias genómicas de *TEL-AML1* y otros genes de fusión sugiere que el mecanismo predominante de la translocación cromosómica es la ruptura de la doble hebra de ADN seguido de reparación normal pero errónea por recombinación no homóloga [32].

La expresión de *TEL-AML1* conduce a la expansión de los precursores de células B con capacidad de auto-renovación mejorada y diferenciación deteriorada a etapas más maduras de células B. La translocación se produce durante la vida uterina en una célula progenitora de célula B temprana y conduce al establecimiento de un clon preleucémico que persiste en la médula ósea durante varios años y a la vez insuficiente para generar una leucemia manifiesta. No está claro si la translocación conduce inevitablemente a la enfermedad o si sólo una pequeña parte progresa, ya que existen informes que lo contradicen, sobre la incidencia de esta translocación en recién nacidos sanos [33,34].

El patrón de unión global de la proteína de fusión *TEL AML1* en regiones promotoras en células B precursoras no se conoce y se han propuesto hasta ahora varios mecanismos de acción. Se ha demostrado que el dominio de unión al DNA homólogo de *AML1* está retenido en la proteína de fusión *TEL-AML1* siendo

esencial para la unión al DNA. *TEL-AML1* transfectado transitoriamente bloquea la transcripción dependiente de *AML1* de varios promotores, que requieren de ambas partes, TEL y AML1 de la proteína de fusión. Estudios proponen que el resto TEL de la proteína quimérica convierte a AML1 de ser un activador a un represor transcripcional. Sin embargo, también se han sugerido mecanismos alternativos de actividad *TEL-AML1*, como el secuestro de cofactores transcripcionales en el citoplasma o la dimerización *con* proteínas [35].

Los casos de LLA con *TEL/AML1* están biológicamente caracterizados por una prolongada remisión completa y una excelente supervivencia libre de evento a largo plazo. La mayoría de las publicaciones asocian esta alteración con un pronóstico favorable. Por otra parte, existe evidencia que la presencia de anomalías cromosómicas secundarias, tales como delección del alelo *TEL* no translocado o duplicación del cromosoma 21, influirían adversamente en el curso clínico de los pacientes que expresan *TEL/AML1*. [36].

1.11 Vía JAK-STAT

En la hematopoyesis las rutas de señalización complejamente reguladas, que están mediadas por citocinas y sus receptores. La señalización de receptores de citocinas hematopoyéticas está mediada en gran medida por una familia de tirosina quinasas denominada Janus quinasas (JAKs) y sus factores de transcripción denominados STAT (Transductores de Señal y Activadores de Transcripción). Las aberraciones en estas vías, son causas subyacentes de leucemias y otros trastornos mieloproliferativos. [37].

Las propiedades oncogénicas del reordenamiento del gen *JAK2* que conducen a la actividad de tirosina cinasa constitutivamente activada, se conocen desde hace más de una década. Estas translocaciones dan lugar a una variedad de transcripciones quiméricas *JAK2*, y la expresión de sus proteínas de fusión

resultantes conduce a menudo al desarrollo de leucemias tanto mieloides como linfoides. [37].

Los miembros de la familia STAT (siete miembros que comprenden STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a / 5b y STAT6) desempeñan funciones duales como proteínas de señalización citoplasmática y como factores de transcripción nuclear. Tras la estimulación de las citocinas, la proteína STAT5 es rápidamente fosforilada, lo que permite la dimerización y la translocación al núcleo, donde se une a las regiones reguladoras de los genes diana [38].

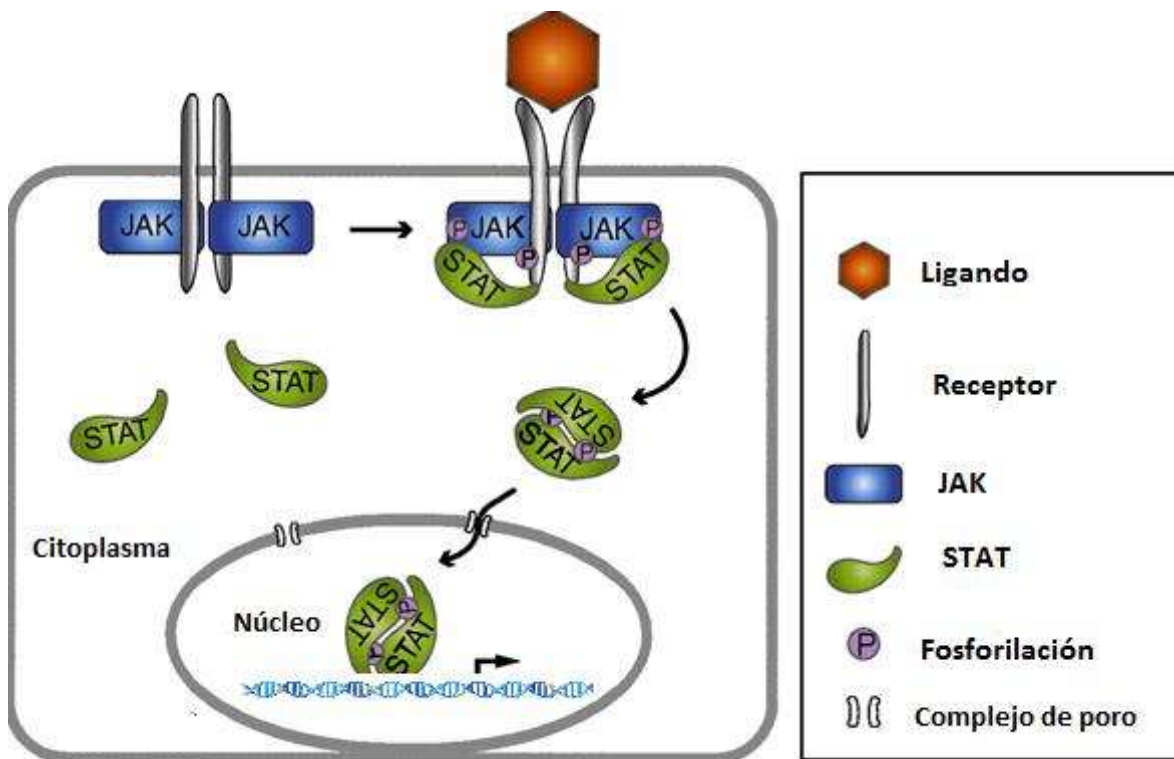


Figura 2. Vía de señalización de la Janus Kinasas y las STAT. Los complejos pre dimerizados de un receptor de la vía (gris) y JAK (azul) se activan después de la unión del ligando (naranja). La fosforilación (círculos púrpura) de los JAK y los receptores generan sitios de acoplamiento para las STAT normalmente citosólicas que son reclutadas al complejo activo. Después de la fosforilación de los STATs, se forman dímeros de STAT que se translocan al núcleo y se unen a una secuencia palindrómica de ADN en los promotores de genes diana para activar su transcripción. (Modificado de Arbouzova y Zeidler, 2006).

1.12 Regulación de la vía JAK- STAT

Tirosina Fosfatasas

Src homology-2 (SH2) tirosina fosfatasas y CD45 tirosina fosfatasa desempeñan un papel importante en la modulación de la vía Jak-STAT. SH2 tirosina fosfatasas incluyen SHP1 y SHP2 (shatterproof 1 y 2). Sus dominios SH2 permiten la unión a los residuos de fosfotirosina presentes en los receptores activados, las proteínas JAKs o STAT, lo que conduce a la desfosforilación de los sustratos. SHP1 se expresa principalmente en células hematopoyéticas, células epiteliales y de músculo liso, mientras que SHP2 es ubicuo. La expresión del gen SHP1 se encuentra silenciada por la hipermetilación del promotor en diversas neoplasias malignas hematológicas [10]. El receptor transmembranal CD45 es el segundo tipo de tirosina fosfatasa que regula negativamente la vía JAK-STAT. CD45, el antígeno común de leucocitos, se expresa en células hematopoyéticas. Tiene dos dominios de fosfatasa en su región intracelular, aunque sólo uno está activo.

Proteínas inhibidoras de STAT activadas (PIAS)

La familia PIAS está compuesta por PIAS1, PIAS3, PIASx y PIASy. Ensayos bioquímicos han demostrado que PIAS3 y PIASx interactúan con STAT3 y STAT4, respectivamente, mientras que PIAS1 y PIASy con STAT1. PIAS1 y PIAS3 ejercen su regulación negativa mediante el bloqueo del DNA vinculante de STAT1 y STAT3. Por otro lado, PIASx y PIASy reprimen la actividad transcripcional de STAT1 y STAT4 mediante el reclutamiento de co-represores de moléculas como las histona desacetilasas.

Proteínas supresoras de la señalización activada por citocinas (SOCS)

La familia de SOCS se compone de SOCS-1 a SOCS-7 y CIS. Las proteínas SOCS son reguladoras de bucle de retroalimentación negativa inducidos por citocinas de señalización Jak-STAT. Cada proteína miembro en esta familia tiene

un dominio SH2 central, un dominio amino terminal variable y un módulo carboxi-terminal de 40 aminoácidos conocido como caja SOCS. El dominio SH2 central dirige el sitio diana de unión con las proteínas SOCS. Se han propuesto tres mecanismos mediante los cuales una proteína SOCS proporciona una modulación negativa. En primer lugar, SOCS se une a los residuos de fosfo-tirosina en los receptores y bloquea físicamente a las STAT de la unión a sus receptores. En segundo lugar, las proteínas SOCS pueden unirse directamente a sus JAK específicos o a los receptores e inhibir la actividad de la cinasa JAK correspondiente. En tercer lugar, SOCS se asocia con la elongina B y C acelerando la ubiquinación de las JAK y presumiblemente de los receptores [39].

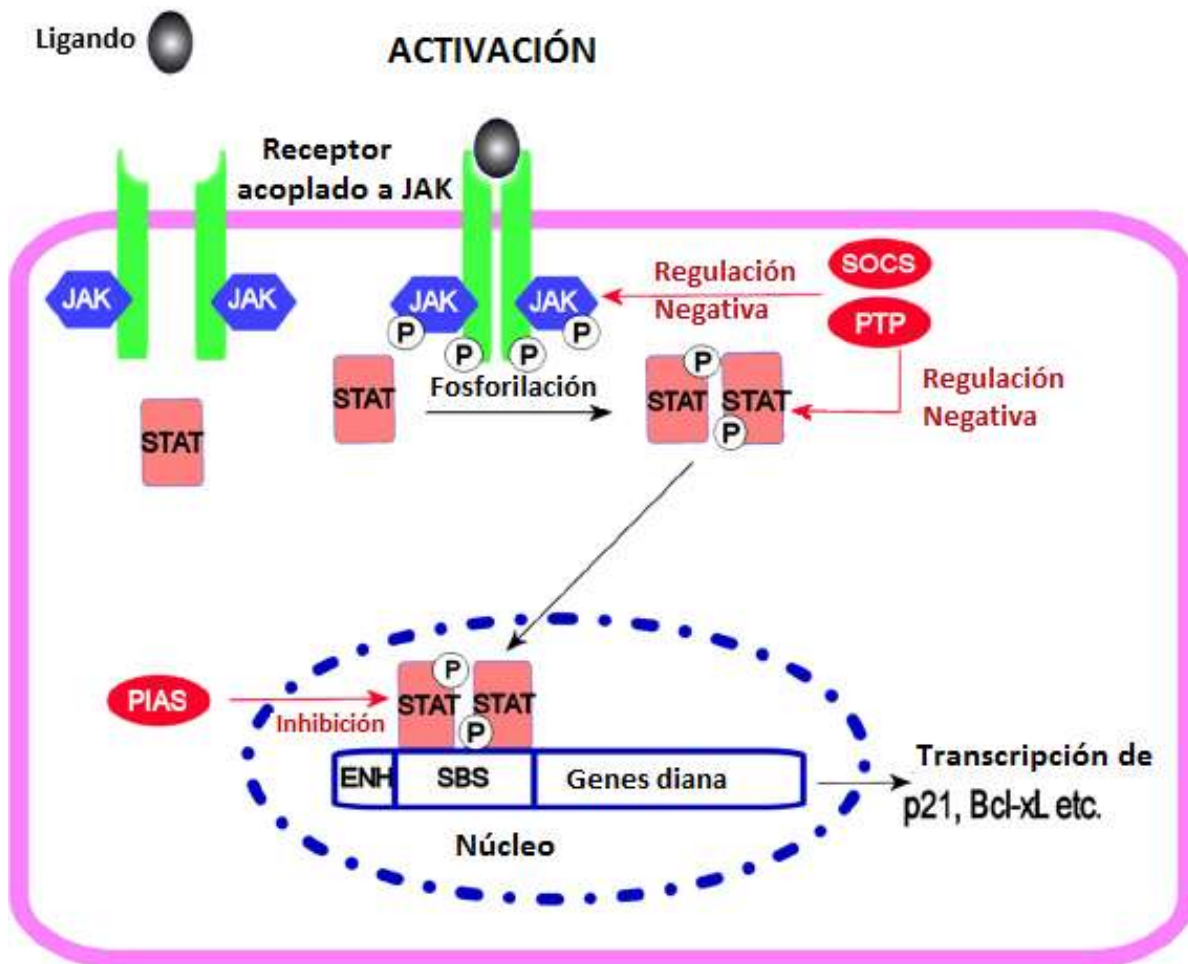


Figura 3. Cascada de señalización de la vía JAK/STAT. La unión del ligando al receptor de citocina induce la dimerización del receptor y la activación de la cinasa JAK asociada al receptor, que a su vez fosforila las proteínas STAT. Después de formar un homodímero,

las proteínas STAT se trasladan al núcleo para controlar la expresión génica. La regulación negativa de la vía JAK-STAT es proporcionada por las tirosina fosfatasas (PTP), miembros de las proteínas de la familia SOCS y proteínas PIAS (Tomado de Muhammad Furqan y Col. 2013).

1.13 Transductor de la Señalización y Activador de la Transcripción 5 (STAT5)

El factor de transcripción STAT5 consiste en dos isoformas STAT5a y STAT5b. Codificada por dos genes separados, ambos factores de transcripción tienen funciones fisiológicas distintas. Tras la estimulación de las citocinas, la proteína STAT5 es rápidamente fosforilada, lo que permite la dimerización y la translocación al núcleo, donde se une a las regiones reguladoras de los genes diana [40].

1.13.1 STAT5 en la Linfopoyesis

STAT5 juega un papel crucial en el desarrollo de linfocitos B y T. Sin embargo, no está claro si STAT5 desempeña principalmente un papel de factor permisivo implicado en la supervivencia de linfocitos, o de factor instructivo implicado en la diferenciación de los linfocitos. Además, mientras STAT5 se ha sugerido para actuar como un represor transcripcional, el mecanismo por el cual reprime la transcripción fue indefinido. Informes recientes han comenzado a arrojar nueva luz en el papel de STAT5 en el desarrollo de linfocitos, la represión transcripcional y la transformación leucémica [41].

STAT5 en respuesta a IL-7R promueve la supervivencia celular mediante la activación del gen MCL1 y reprime la recombinación de la inmunoglobulina Igk en las células pro-B. Posteriormente, se conjuga con el receptor de células pre-B para facilitar su expansión clonal [42]. STAT5 es un objetivo clave de múltiples receptores de citocinas que se sabe que juegan un papel crucial en desarrollo de los linfocitos, incluyendo aquellos para IL-2 y IL-7 [43]. STAT5 es necesario en el

desarrollo de células B, ya que puede unirse a regiones reguladoras de dos genes pro-supervivencia *BCL-2* y *BCL-2L1* y promover su transcripción [44].

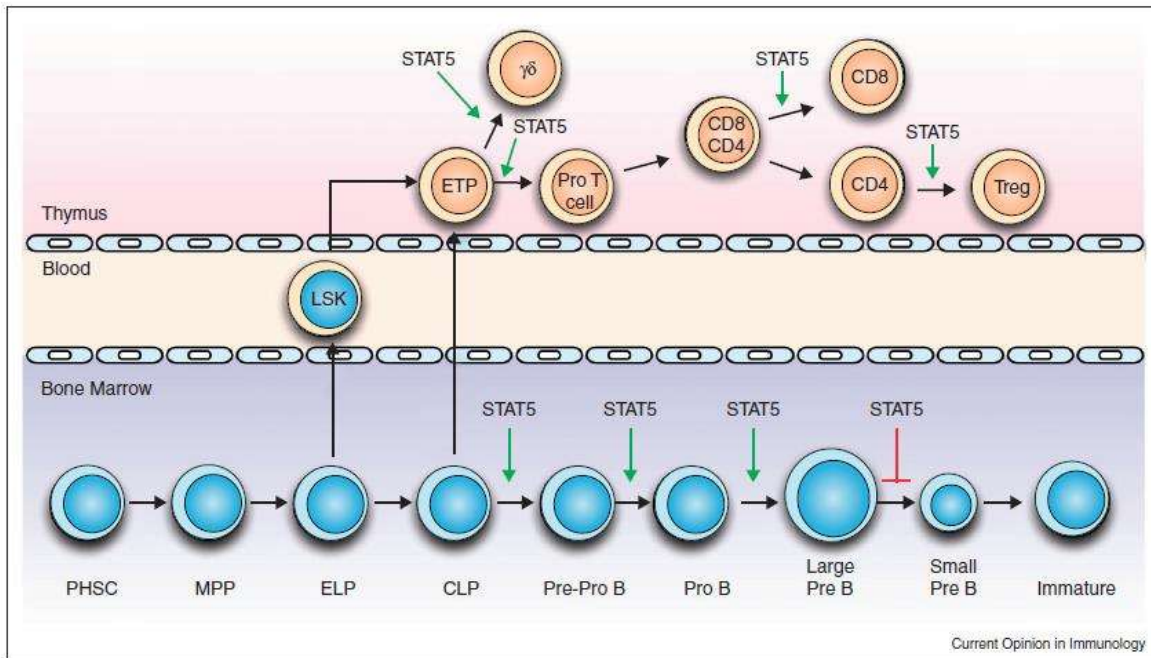


Figura 4. Panorama general del desarrollo de linfocitos con énfasis en el papel de STAT5. Las flechas verdes marcan las diferentes etapas de desarrollo donde STAT5 desempeña un papel positivo en el desarrollo de diferentes subgrupos de linfocitos. La flecha roja marca donde se requiere la inhibición dependiente de STAT5 para el desarrollo normal (Tomado de Lynn M-Heltemes y Col. 2012).

1.13.2 STAT5 en la Leucemia

STAT5 es un factor de transcripción latente que normalmente se activa transitoriamente por fosforilación en respuesta a señales microambientales. En las células hematopoyéticas, la activación constitutiva de STAT5 a través de una alteración en la vía de señalización de las JAK's o de una forma aberrante de JAK son factores que contribuyen a la leucemogénesis. Sin embargo, la señalización activa de IL-7 a través de STAT5 también protege el genoma temprano de las células B al suprimir el proceso recombinación genética propensa a errores y la

vulnerabilidad a la transformación. Además, la respuesta inflamatoria también puede estar implicada en la iniciación de la leucemia en pacientes pediátricos y adultos que están asociados con una fosforilación disminuida de STAT5 [45].

STAT5 también juega un papel clave en la generación de la leucemia linfoblástica aguda de estirpe B, por lo que el gen de fusión *BCR-ABL* o la colaboración de la mutación de JAK2 con la sobreexpresión del estroma tímico por linfopoyetina conduce a la activación de citocinas que favorecen la supervivencia y el crecimiento de las células leucémicas. Hay estudios que demuestran que STAT5 juega un rol principal en la transformación celular por el oncogén *BCR-ABL* [46].

La oncoproteína quimérica BCR-ABL (p210^{*bcr-abl*}), presenta una gran actividad de tirosina cinasa no regulable (Fig.6), la cual tiene la capacidad de transformar *in vitro* a las células hematopoyéticas inmaduras e inducir leucemia en ratones [47]. El p210^{*bcr-abl*} activa algunas vías entre ellas se encuentran el rat sarcoma oncogén (RAS), el fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3K) y las STATs. Estos cambios promueven una transformación maligna que interfiere con los procesos básicos de las células como proliferación, diferenciación, adherencia y apoptosis [48]. En otros estudios se ha demostrado que STAT5 coopera con la pérdida de la función del gen supresor de tumores p53, tanto para acelerar la aparición de la enfermedad como para favorecer fuertemente el curso de la leucemia [42].

1.13.3 Papel de STAT5A y STAT5B

STAT5a y STAT5b muestran similitudes en 96% de sus secuencias de péptidos que difieren sólo por 6 aminoácidos en su dominio de unión al DNA, 20 aminoácidos en su C-terminal y 18 aminoácidos en su N-terminal [49].

La identificación de las mutaciones de STAT5B son asociadas con el complejo síndrome clínico de Insensibilidad a la Hormona del Crecimiento (GHI por sus siglas en inglés) y a la deficiencia inmunológica firmemente establecida en los seres humanos, por lo que STAT5B y STAT5A tienen ciertas funciones distintas y no redundantes, a pesar de su alto grado de identidad. Aún no se han identificado

mutaciones humanas en STAT5A [50]. STAT5A fue identificado originalmente como un factor de la glándula mamaria que aumenta la expresión de la proteína de la leche por inducción de la prolactina y se ha informado de que se asocia con cáncer de mama y próstata. La deficiencia de STAT5A da como resultado un deterioro de la diferenciación de células mamarias [51].

STAT5A es altamente serina-fosforilado en células humanas de Leucemia Mieloide Crónica. STAT5B también alberga un sitio serina en la posición 779 en el TAD, pero muestra diferencias esenciales a STAT5A como el motivo no está flanqueado por prolinas. El papel de este sitio de fosforilación no ha sido tratado hasta ahora [52]. El de la translocación de STAT5B al núcleo siguen siendo desconocidos, pero se acepta generalmente que STAT5B puede ser transportado al núcleo en un heterodímero con STAT5A y que una sobre estimulación por la hormona de crecimiento genera homodímeros de STAT5B (Figura 5) [53].

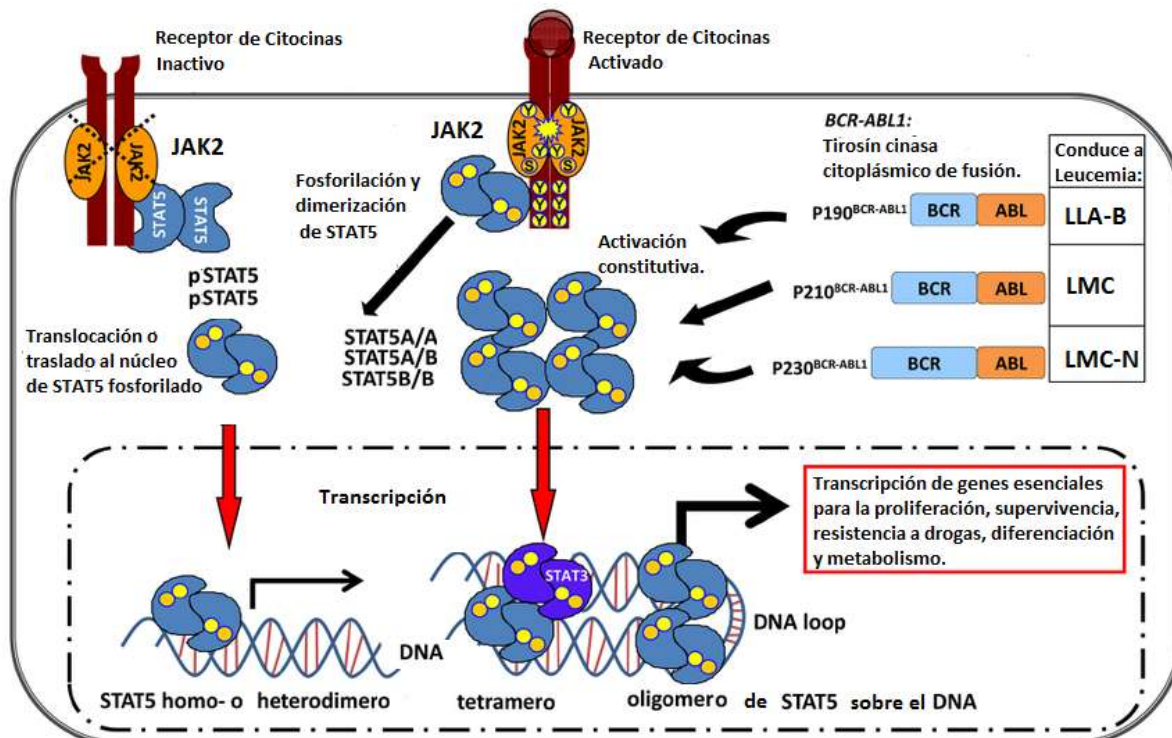


Figura 5. STAT5 el nodo central de señalización en la leucemia BCR-ABL+. La activación canónica de STAT5 comienza en la membrana celular con citoquinas que se unen a receptores específicos. JAK2 media la fosforilación del receptor en el extremo citoplasmático y así STAT5 es activado. Las proteínas STAT5 activadas forman dímeros homo o hétero paralelos (STAT5A/A; STAT5A/B; STAT5B/B) a través de sus dominios

SH2 y se translocan al núcleo para unirse al DNA. En la leucemia inducida por BCR-ABL se produce una translocación entre los cromosomas 9 y 22 y da como resultado una tirosina cinasa citoplásmica de fusión activada constitutivamente, favoreciendo la transcripción de genes que son esenciales para la proliferación, supervivencia (BCL-xL), diferenciación, resistencia a drogas, diferenciación y metabolismo (Adaptado de Berger A y Col. 2014).

STAT5b se ha asociado con estadios avanzados de tumores, infiltración venosa y mal pronóstico en el carcinoma hepatocelular [54] y con el tamaño del tumor en el cáncer de pulmón. Se ha asociado a metástasis en cáncer colorrectal y con tumorigénesis y progresión en glioblastoma multiforme [55]. En cuanto a las enfermedades pancreáticas, STAT5 se ha informado de estar asociado con diabetes mellitus y activado en su isoforma STAT5b pero no STAT5a [56]. Expresiones de mRNA y la proteína de STAT5b han sido detectadas en ocho tipos de células de cáncer de páncreas y se ha localizado tanto en el citoplasma como en el núcleo de éstas células. Estudios revelan que hay fosforilación de STAT5b en células de cáncer de páncreas e indican que STAT5b se encuentra activado constitutivamente en éstas [57].

Las mutaciones somáticas STAT5B se han descubierto en la leucemia linfocítica granulosa granulosa, en la leucemia promielocítica y en la leucemia linfoblástica aguda T, donde se pueden esperar más mutaciones durante el trayecto de la leucemia. La expresión excesiva de las formas de STAT5B mutadas resulta en un aumento de la actividad transcripcional y se asoció con resultados de enfermedad pobre. Sorprendentemente e interesantemente, la mayoría de las mutaciones ocurren en el dominio SH2 de STAT5B, siendo la mutación puntual N642H la más frecuente [53]. Además, en la leucemia promielocítica aguda, STAT5B se transloca y se fusiona con el receptor de ácido retinoico (RAR) alfa con la señalización potenciada mediante STAT3 [58].

Recientemente se ha descrito que el profármaco Pomstafib-2 inhibe selectivamente la fosforilación de tirosina de STAT5b en células de leucemia humana e induce apoptosis de una manera dependiente de STAT5, siendo un inhibidor selectivo de la activación STAT5b. Tal estudio demuestra que la

inhibición de STAT5b reduce la proliferación de células tumorales más que la inhibición de STAT5a [59].

1.14 El Gen BCL-xL

Las proteínas de la familia BCL-2 regulan la apoptosis principalmente en la membrana externa mitocondrial a través de la vía apoptótica intrínseca. Estas proteínas se dividen en tres clases basadas en sus dominios de BH (BCL-2) y función: anti-apoptótica [BCL-2, BCL-xL, BCL-W, MCL-1, BCL2A1 BFL-1, A1) y BCL-B], efectores pro apoptóticos de múltiples dominios (BAX y BAK) y proteínas BH3-solas (por ejemplo, BIM y NOXA). La inhibición de la apoptosis se logra secuestrando proteínas pro apoptóticas y evitando así la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. [60]. Cuando se sobreexpresa, Bcl-xL es responsable de la supervivencia de las células tumorales, no sólo debido a su bien documentado efecto inhibitorio de la función Bcl-2-associated X protein (Bax), sino también debido a su capacidad para estimular la autofagia. Estas funciones de Bcl-xL están reguladas por modificaciones postraduccionales, tales como la desamidación de dos residuos del aminoácido asparagina (Asn) y la interacción de Bcl-xL con la pequeña GTPasa Rab7, a través de un dominio distinto del sitio de unión a BH3 implicado en la interacción con otros miembros de la familia Bcl-2 como Bax [61].

Se ha sugerido que BCL-XL ejerce funciones citoprotectoras secuestrando una reserva citosólica del factor de transcripción p-53 apoptótica y uniéndose al canal aniónico dependiente de la tensión 1 (VDAC1), inhibiendo la llamada transición de permeabilidad mitocondrial (MPT). Así, BCL-XL parece desempeñar un papel prominente en la regulación de múltiples tipos distintos de muerte celular, incluyendo apoptosis y necrosis regulada. Recientemente se ha demostrado que BCL-XL modula una serie de procesos fisiopatológicos, incluyendo, pero sin

limitarse la síntesis de ATP mitocondrial, acetilación de proteínas, autofagia y mitosis [62].

Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL inhiben la liberación del citocromo C (cyt-C), mientras que Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak) y BH3 interacting domain death agonist (Bid), todas pro-apoptóticas, promueven su liberación de las mitocondrias. Cyt-C y desoadenosintrifosfato (dATP) se unen al factor activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) para formar una molécula multimérica. Complejo que recluta y activa la procaspasa 9, que a su vez activa la caspasa 3, dando lugar a la apoptosis celular (Figura 6) [63].

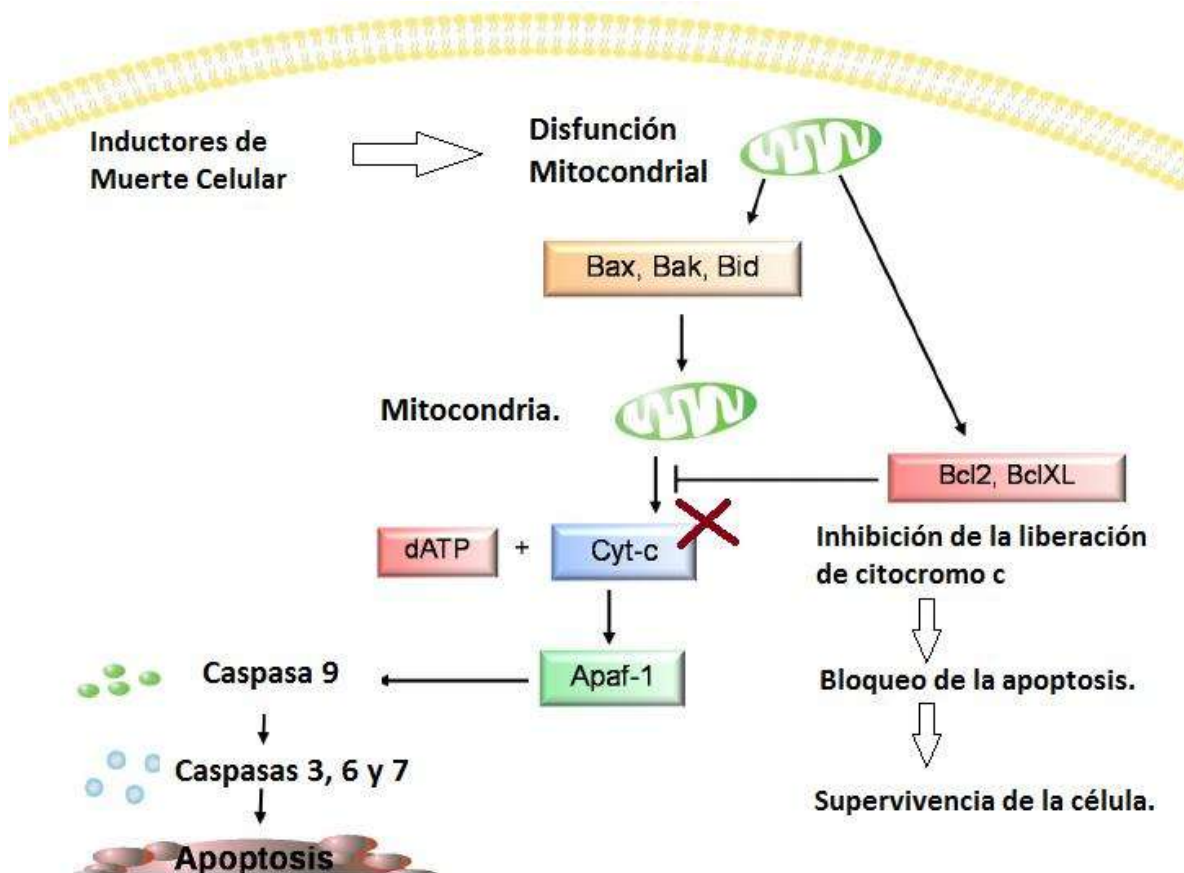


Figura 6. Mecanismo de La Proteína BclXL en la inhibición de la apoptosis mediada por Bax, Bak y Bid. Este mecanismo evita la liberación del Cyt-c y Apaf, bloqueando de esta forma la cascada de las caspasas (Tomado y modificado de Musumeci G y Col. 2015).

Se ha demostrado que STAT5 es la vía más importante para la regulación de BCL-XL en líneas celulares de leucemia y células de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC). En células de LMC que expresan p210BCR-ABL, tal como la línea celular K562, STAT5 está constitutivamente activado y BCL-XL está sobreexpresado. Ambas condiciones son necesarias para la proliferación y resistencia a la apoptosis y supervivencia de las células de LMC [48].

Estudios recientes indican que el Ácido Ursólico (AU) induce apoptosis en las células K562. Este proceso apoptótico se acompaña de regulación a la baja de la expresión de Bcl-xL y Mcl-1, así como desfosforilación de Bad. Estos eventos están asociados con la inhibición de STAT5, que está parcialmente mediada por la expresión elevada del represor transcripcional Gfi-1. Cuando se silencia Gfi-1 se suspende la habilidad del AU de disminuir la expresión de STAT5B y se debilita la apoptosis que induce el AU [64].

II JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es un padecimiento oncopatológico que representa un problema de salud pública en México. Su incidencia ha ido en aumento en los últimos años y afecta principalmente a niños y adultos mayores presentando un alto índice de mortalidad.

La identificación del tipo de LLA es un paso fundamental para decidir el tratamiento más adecuado y establecer el pronóstico de la enfermedad. Para esto es importante contar con la suficiente información de la causa molecular de este padecimiento, ya que está estrechamente ligada a genes responsables de su aparición. La determinación de la expresión de genes de fusión como TEL-AML1 y su correlación con la expresión de las proteínas STAT5 y BCL-XL pueden ser de gran ayuda al estandarizar métodos más exactos, sensibles y eficaces en el diagnóstico y pronóstico de la LLA.

La determinación en cada paciente con leucemia linfoblástica aguda de *novo* de las alteraciones moleculares de buen o mal pronóstico, será determinante para elegir que esquema quimioterapéutico aplicará el médico hematólogo. De esta manera, el paciente tendrá más oportunidades de aumentar su supervivencia, pero ahora, libre de enfermedad y por consiguiente, mejorar su calidad de vida. Por otro lado la asociación entre tales alteraciones moleculares, la medición de la expresión génica de genes clave y el patrón inmuofenotípico traerán una mayor comprensión de los eventos oncogénicos y además sentar las bases de una clasificación futura que incluya dicha relación.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La expresión de STAT5B y BCL-XL se relaciona con los marcadores de pronóstico?

IV HIPÓTESIS

La expresión de los genes STAT5B y BCL-xL es menor en pacientes que expresan el marcador molecular de buen pronóstico TEL-AML1.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de STAT5B y BCL-xL en pacientes con leucemia linfoblástica aguda con y sin expresión del gen de fusión TEL-AML1.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de TEL-AML1 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda.
- Establecer el número de ciclos donde se alcanza la fase exponencial en la PCR de los genes ABL, STAT5B y BCL-XI.
- Semi-cuantificar la expresión de STAT5B y BCL-xL .
- Determinar si la expresión de STAT5B y BCL-xL se relaciona con factores pronóstico.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño Experimental

Estudio transversal y observacional, en un grupo de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de estirpe "B".

6.2 Sitio de Estudio

Departamento de Hemato-Oncología del Hospital de General de Morelia del Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos" y un paciente del Hospital Civil "Dr. Miguel Silva", Laboratorio de Citopatología Molecular de la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.3 Muestra

Se seleccionaron 13 pacientes del Servicio de Hemato-Oncología del Hospital de General de Morelia del Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos" y un paciente del Hospital Civil "Dr. Miguel Silva" con diagnóstico establecido de leucemia linfoblástica aguda; de los cuales, 7 expresan el gen de fusión *TEL-AML1*, 1 expresa el gen de fusión *BCR-ABL* y 6 no expresan ninguno de estos dos genes.

6.4 Criterios de Inclusión

- Diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda con análisis morfológico e inmunofenotípico de las células de médula ósea.
- Sin tratamiento antineoplásico previo.

6.5 Criterios de exclusión

- Leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda estirpe "T" o leucemia aguda bifenotípica.
- Pacientes cuyo tutor, en su caso, no deseó participar en el estudio.

6.6 Criterios de eliminación

- Muestras con viabilidad celular menor al 90%
- Pacientes que ya no desearon participar en el proyecto.

6.7 Descripción de las variables

- **Variable independiente.** Nivel de expresión de los genes *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL*.
- **Variable dependiente.** Factores pronóstico y de riesgo al diagnóstico. Estado clínico actual.

6.8 Procedimientos

Al sospecharse de leucemia aguda los pacientes fueron hospitalizados. Los médicos Hematólogos y Oncólogo Pediatras, así como personal del Laboratorio Clínico notificaron el ingreso de los pacientes con diagnóstico presuntivo de LLA para obtención de muestra. En algunos casos la muestra fue tomada de una alícuota de muestras previas obtenidas para estudios de laboratorio dentro del hospital, evitando así, puncionar nuevamente al paciente. Una vez obtenidas, las muestras fueron remitidas al Laboratorio de Citopatología Molecular del Departamento de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" para su análisis molecular.

Previo al estudio molecular, se estandarizaron los métodos de extracción de RNA y las condiciones de amplificación de los genes blanco (*ABL*, *STAT5B* y *BCL-XL*) utilizando para ello, la línea celular K562 como un control positivo.

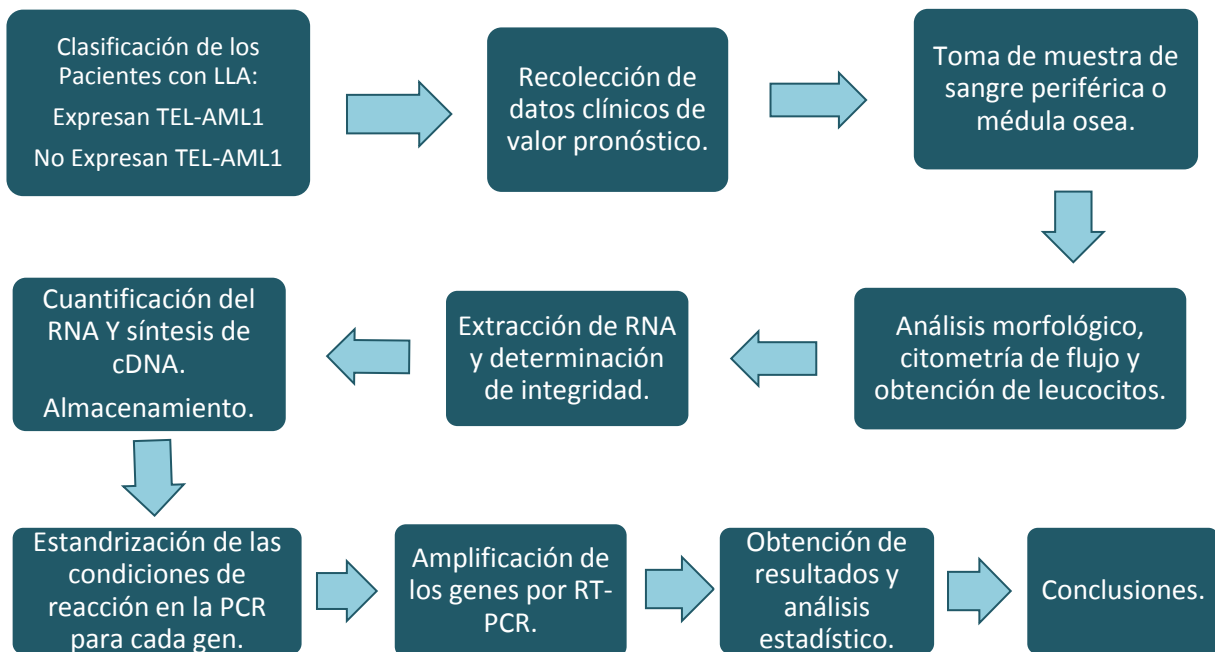


Figura 7. Esquema general de trabajo.

6.8.1 Clasificación de los pacientes.

El diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda es integral por lo cual se requirió realizar la valoración morfológica empleando frotis de sangre y/o médula ósea teñidos con colorante de Wright. El diagnóstico morfológico se realizó con base a los criterios establecidos por el grupo FAB. El análisis inmunofenotípico se llevó a cabo el método de citometría de flujo. Para la evaluación molecular se determinó la expresión de *TEL-AML1* por RT-PCR.

6.8.2 Características clínicas

Las características clínicas determinadas como “factores pronósticos” tales como: edad, cantidad de leucocitos al diagnóstico, CD10, CD33, Inmunofenotipo y la expresión de *TEL-AML1* y estado actual fueron recabados de los pacientes del expediente clínico y de los resultados obtenidos por Alvarado y Col. [68]. Los factores pronósticos correspondientes a los pacientes que expresan y que no expresan *TEL-AML1* se muestran en las tablas 3 y 4.

6.8.3 Inmunofenotipo por citometría de flujo.

Las muestras de sangre periférica y/o médula ósea se filtraron y se realizó una dilución 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y posteriormente se contaron los leucocitos empleando un contador automatizado. Doscientos cincuenta mil leucocitos se colocaron en cada tubo (la cantidad de tubos será de acuerdo al grupo de anticuerpos que se emplearon dependiendo del subtipo de leucemia y luego se adicionaron los anticuerpos específicos conjugados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): CD3, CD5, CD10, CD34, CD20, Ig M citoplasmático, TdT, y Ficoeritrina (PE): CD2, CD7, CD22, CD13, CD33, CD79a, CD78, PerCP, con el anti-CD45PerCP como seleccionador de los blastos en cada tubo. Para identificar los antígenos intracelulares, las células se incubaron con solución fijadora (50 µL) durante 15 min a 4°C, luego se adicionó el anticuerpo y 50 µL de solución permeabilizadora. Se incubó durante 20 min en refrigeración y después se agregó 1 ml de solución de lisis y se incubó 15 min en refrigeración. Enseguida se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se agregó 500 µL de PBS centrifugando a 1000 rpm por 5 min. Finalmente se resuspendieron las células con 350µl de PBS, se adquirieron en el citómetro de flujo y se analizaron empleando el programa Expo32 (Beckman Coulter, Inc. Miami Florida, USA).

6.8.4 Lisis de glóbulos rojos

Un mL de muestra de MO o sangre periférica se colocó en tubo Eppendorf de 12 mL y se le adicionó solución de lisis de glóbulos rojos (NH₄Cl) en proporción 1:10, se incubó durante 20 min a 4°C y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió con solución Buffer de fosfatos (PBS) y centrifugó a 2500 rpm durante 25min. El botón celular se resuspendió en 1 mL de solución PBS.

6.8.5 Determinación de viabilidad y cuenta de glóbulos blancos

La cuenta de glóbulos blancos se realizó diluyendo en razón 1:40 la muestra obtenida de la lisis de glóbulos rojos en azul tripano al 1% y empleando la cámara de Neubauer para su cuantificación. La determinación de viabilidad se realizó contando las células teñidas de azul con respecto al total de células analizadas en la cámara de Neubauer, dado que, solo las células muertas permiten el paso de este colorante y adoptan esta coloración. Sólo las muestras con viabilidad superior al 90% fueron seleccionadas para continuar en el estudio.

6.8.6 Extracción del ARN

El ácido ribonucleico (RNA) total se obtuvo por el método de TriPure Isolation Reagent ® Roche, siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. Diez millones de leucocitos obtenidos por lisis de glóbulos rojos se colocaron en tubo Eppendorf de 1.5 ml y se lisaron con 1 ml de TriPure. Se dejó en reposo 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitó con la mano vigorosamente durante 1 minuto. A continuación se mantuvo en reposo 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa (capa superior) se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añadió 500 µL de isopropanol grado biología molecular, se mezcló suavemente, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó dos veces con 1 ml de etanol grado biología molecular al 75%, resuspendiéndolo con vortex y centrifugando la primera vez a 7500 rpm durante 5 min a 4°C y la segunda a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Al botón de RNA se le eliminó el etanol, decantando y dejando evaporar durante 10 a 15 min. Finalmente, el RNA se disolvió en 20 µl de agua libre de RNAsas y se almacenó en ultra-congeldor a -70°C hasta su uso.

6.8.7 Cuantificación y determinación de pureza del RNA

El RNA se diluyó 1:100 en agua inyectable y se leyó en espectrofotómetro de UV, empleando una cubeta de 1 cm de paso de luz a una longitud de onda de 260 nm. Una unidad de absorbancia equivale a 40 µg de RNA /ml. El RNA tiene un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas contaminantes absorben a 280 nm. La relación de absorbancia entre 260 nm/280 nm, da una estimación de pureza del RNA. Soluciones de RNA puras presentaron valores mayores a 1.7.

6.8.8 Síntesis de cDNA

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) se realizó de acuerdo al estuche GeneAmp® RNA PCR, con algunas modificaciones. En un tubo Eppendorf se colocaron por cada reacción, 2 µg de RNA, más 0.5 µg de la solución Hexámeros al azar (Random Hexamers), adicionando agua aforando a 10 µL. Después se calentaron a 65°C durante 10 minutos y se puso en hielo. Por otro lado, se preparó en otro tubo la mezcla de reacción que contiene solución amortiguadora 1X, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), 20 U de inhibidor de RNasas, 4 U de enzima retrotranscriptasa inversa y se completaron a un volumen de 10 µL con agua. Después, la mezcla de reacción se agregó al primer tubo, se incubó a 37°C durante 60 min y después a 93°C durante 5 min empleando un termociclador. El cDNA se almacenó en congelador a -20°C hasta su uso.

6.9 Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

6.9.1 Determinación de *TEL-AML1* y *BCR-ABL* p190

Para la determinación de los genes de fusión *TEL-AML1* y *BCR-ABL* p190 en los pacientes que no contaban con caracterización la PCR se realizó de acuerdo a lo informado por Dongen y Col. [65], con algunas modificaciones. En un tubo de reacción Eppendorf se colocaron 2 µL solución amortiguadora o PCR Buffer (20

mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 0.2 mM dNTP's, 0.5 U Taq polimerasa (Quiagen®, Multiplex PCR Kit), 2.5 mM MgCl₂, 10 mM oligos A-B para cada translocación (tabla 1), 2 µL de cDNA y agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 20 µL. La amplificación se realizó durante 1 ciclo a 95°C durante 5 min, luego 35 ciclos a 94°C durante 30 s, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. La PCR se realizó de acuerdo a lo informado por Dongen y Col. [65]. Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas para la amplificación de los diferentes genes, se procedió al análisis de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda sin determinación de los genes de fusión. El gen ABL se empleó como control interno en cada una de las reacciones. Finalmente se llevó a cabo una segunda serie de PCR (PCR anidada) tomando una alícuota de la primera reacción y sometiéndola a condiciones similares de la primera reacción pero con el empleo de los iniciadores internos C-D. En lugar del cDNA, se tomaron 2 µL de producto de PCR de la primera amplificación.

6.9.2 Amplificación de *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL*

Para la estandarización de la PCR para los genes *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL* se utilizó la línea celular K562 como control positivo de la expresión de estos genes, por lo que se realizó extracción de RNA y síntesis de cDNA por los métodos anteriormente descritos. En tubo Eppendorf se colocaron 2 µL de solución amortiguadora 10X (PCR Buffer), 2 µL de CoralLoad PCR Buffer 10X, 0.25 mM de dNTP's, 0.5 U de la enzima Taq Polimerasa (Quiagen®, Multiplex PCR Kit), los iniciadores F y R para cada gen (2 µL del oligo F y 1 µL del oligo R para el gen *ABL*; 1 µL del oligo F y 1 µL del oligo R para *BCL-XL*; 1 µL del oligo F y 2 µL del oligo R para *STAT5B*), 2 µL de cDNA de la línea celular K562 y se aforó a 20 µL con agua destilada. La secuencia de los iniciadores se observa en la Tabla 1.

Para el gen control *ABL* la amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, luego 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min y posteriormente 1 ciclo 72°C durante 3 min de extensión final, según las condiciones descritas por Roche-Lestienne C y Col. [66] con

algunas modificaciones, en el cual, se ajustó la temperatura de alineación de los iniciadores para optimizar la amplificación, empleando para ello el programa "Oligo Analyzer".

Para el gen *STAT5B* la amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, luego 25 ciclos a 94°C durante 45 seg, 56°C durante 45 seg y 72°C durante 1 min y posterior mente 1 ciclo 72°C durante 3 min de extensión final, según las condiciones descritas por Baskiewicz-Masiuk M y col. [67] con algunas modificaciones.

Para el gen *BCL-XL* la amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, luego 25 ciclos a 94°C durante 1min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min y posterior mente 1 ciclo 72°C durante 3 min de extensión final, según las condiciones descritas por Gutiérrez-Castellanos S y col. [48] con algunas modificaciones. Las condiciones descritas para estos genes se resumen en la Tabla 2.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y posteriormente, para obtener una mejor imagen, en gel de Poliacrilamida al 10%. Se colocaron 10 µL de producto de PCR en los geles mencionados y se corrieron en solución de TAE y TBE respectivamente a 95 voltios durante 50 min. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% y se observó el gel en un fotodocumentador modelo Chemi-Doc XRS system de la marca Biorad (Milan, Italia), empleando el programa *Quantity One Chemi-Doc XRS system* para la obtención de imágenes y observar la presencia del amplificado en su respectivo carril y al peso en pares de bases esperados, siendo comparado con el marcador de peso molecular (PM) de 1Kb. Al encontrarse una banda al peso en pb esperado, la amplificación y expresión del gen blanco se determina positiva.

Para la semi-cuantificación de la expresión de los genes *ABL*, *STAT5B* y *BCL-XL* se empleó el programa *Quantity One 4.4 Chemi-Doc XRS system*, en el que se midió la intensidad de las bandas de las muestras corridas en gel de poliacrilamida (Figura 8).

Tabla 1. Iniciadores para la determinación de los genes ABL, STAT5B, BCL-xL, TEL-AML1 y BCR-ABL p190.

mRNA	Primers Forward	Primers Reverse	Tamaño de producto de PCR
Abelson Human (ABL)	5'-GAGGGCGTGTGGAAGAAATA-3'	5'-GCTGTGTAGGTGCCCT GT-3'	413 pb
STAT5B Human	5'-GTA AACCATGGCTGTGTGGA-3'	5'-AAATAATGCCGCACCTCAAT-3'	111 pb
Bcl-xL Human	5'-CGGGCATTCACTGACCTGAC-3'	5'-TCAGGAACCAGCGGTGAAG-3'	320 pb
TEL-A	5'-TGCACCTCTGATCCTGAAC-3		
ML1-B		5'-AACGCCTCGCTCATCTTGC-3'	298 pb/ 259pb
TEL-C	5'-AAGCCCATCAACCTCTCTCATC-3		
ML1-D		5'-TGGAAGGCGCGTGAAGC-3'	181 pb/ 142 pb
BCR-e1-A	5'-GACTGCAGCTCCAATGAGAAC-3		
ABL-a3-B		5'-GTTGGGCTTACACCATTC-3'	521 pb/ 347 pb
BCR-e1-C	5'-CAGA AACTGCAACAGTCTTC-5'		
ABL-a3-D		5'-TTCCCCATTGTGATTATAGCTA-3'	381 pb/ 207 pb

Tabla 2. Condiciones de corrida en el Termociclador Palm Cycler.

Gen	Programa	Activación	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión Final
ABL	Cidos	1	23			1
	Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	Tiempo	5 min	1 min	1 min	1 min	3 min
STAT5B	Cidos	1	24			1
	Temperatura	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C
	Tiempo	5 min	45 seg	45 seg	1 min	3 min
BCL-XL	Cidos	1	25			1
	Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	Tiempo	5 min	1 min	1 min	1 min	3 min
TEL-AML1	Cidos	1	35			No requiere.
	Temperatura	95 °C	94 °C	65 °C	72 °C	
	Tiempo	5 min	30 seg	1 min	1 min	
BCR-ABL	Cidos	1	25			No requiere.
	Temperatura	95 °C	94 °C	65 °C	72 °C	
	Tiempo	5 min	30 seg	1 min	1 min	
PCR Anidada						
TEL-AML1	Cidos	1	25			No requiere.
	Temperatura	95 °C	94 °C	65 °C	72 °C	
	Tiempo	5 min	30 seg	1 min	1 min	
BCR-ABL	Cidos	1	25			No requiere.
	Temperatura	95 °C	94 °C	65 °C	72 °C	
	Tiempo	5 min	30 seg	1 min	1 min	

6.10 Método Estadístico

Se realizaron tablas de contingencia para buscar asociación entre las características clínicas y la expresión de TEL-AML1. Se empleó la correlación de Pearson para encontrar correlación entre la expresión de STAT5B y BCL-XL y los factores de pronóstico.

6.11 Consideraciones Éticas

Los pacientes fueron incluidos sólo bajo su previo consentimiento o el de su tutor. El médico tratante les explicó en que consiste el trabajo y qué se requiere para el estudio de las alteraciones moleculares, para lo cual firmaron la carta de consentimiento en la que estuvieron de acuerdo en participar en el proyecto. Para el estudio se utilizaron las mismas muestras de médula ósea y/o sangre periférica que se toman para el diagnóstico y su vigilancia clínica, por lo que no implicó una intervención adicional para el paciente. Los aspirados de médula ósea lo realizaron los médicos de base adscritos al servicio, con las medidas necesarias para prevenir cualquier complicación. Se solicitó autorización por escrito para realizar el estudio.

6.12 Recursos Físicos y Materiales

El Laboratorio de Citopatología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado de la UMSNH se compone de un área física con las condiciones, infraestructura e instrumentos necesarios y adecuados para el desarrollo del proyecto. Cuenta principalmente con Citómetro de Flujo FACS Altra (Beckman-Coulter, Inc. Florida, USA), campana de flujo laminar, termociclador, congeladores y ultracongeladores, centrifugas clínicas y microcentrifugas. Se contó con todo el equipo y reactivos necesarios gracias al apoyo de los responsables de los laboratorios de Genética Microbiana, Hemostasia y Biología Vascul y de Marcadores Moleculares en Neoplasias, quienes nos brindaron apoyo y asesoría para realizar las metodologías descritas en esta Tesis. No se generó ni se solicitó ningún gasto para los pacientes o familiares.

VII RESULTADOS

7.1 Datos clínicos de los Pacientes

Se incluyeron 14 pacientes con leucemia linfoblástica aguda *de novo* y se distribuyeron en dos grupos: los que expresaron el gen *TEL-AML1* (7 pacientes) y los que no lo presentaron (7 pacientes), dentro del cual, 1 expresó el gen de fusión *BCR-ABL* p190. Siete pacientes (50%) fueron del sexo masculino y 7 (50%) del sexo femenino, con rango de edad de 10 meses a 28 años (Figura 8). Al agruparse los pacientes por grupos etarios de importancia pronóstica, se encontró que el grupo de menores de 1 año y mayores de 10 años fueron 6 (43%) y los mayores de 1 año y menores de 10 años fueron 8 (57%).

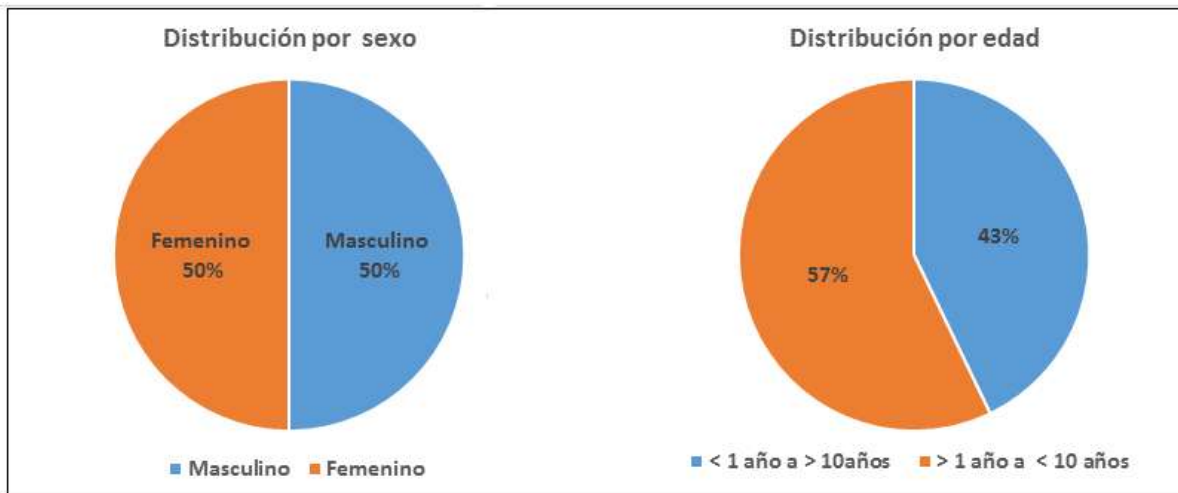


Figura 8. Distribución por sexo y edad de los pacientes.

El recuento de leucocitos en sangre periférica al diagnóstico se empleó como factor pronóstico. La cuenta de referencia de menos de 50,000 leucocitos/ μ L es de buen pronóstico. En el presente estudio se encontraron 11 casos (78.6%) mayor a 50,000 leucocitos/ μ L y 3 casos (21.4%) menor a 50,000 (Figura 9). El porcentaje de blastos encontrados en el frotis de sangre periférica fue reportado con un rango de 0-90%. En el grupo de los pacientes que expresaron *TEL-AML1* todos reportaron presencia de blastos en sangre periférica y en el grupo de pacientes

que no expresaron el *TEL-AML1*, 3 pacientes no reportaron presencia de blastos en sangre periférica al diagnóstico.

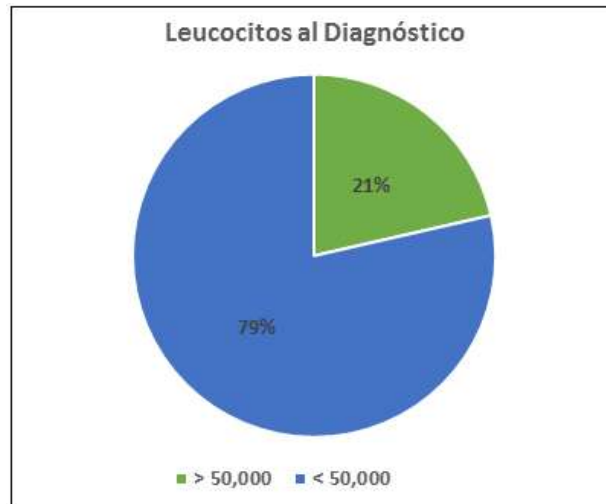


Figura 9. Recuento de leucocitos al diagnóstico.

Los valores de hemoglobina y de plaquetas son parámetros importantes al diagnóstico, dado el riesgo de hemorragia y cor anémico. Se clasificó el grado de anemia y trombocitopenia de los pacientes: 4 (28%) no presentaron ningún grado de anemia ($Hb > 11.0$ mg/dL), 1 (7%) presentó anemia leve ($Hb 10-11$ mg/dL), 5 (36%) presentó anemia moderada ($Hb 7-10$ mg/dL) y 4 (29%) presentaron anemia severa ($Hb < 7$ mg/dL). Dos pacientes (14%) no presentaron trombocitopenia (> 150 plaquetas/ mm^3), 1 (7%) presentó trombocitopenia leve (100,000-150,000/ mm^3), 3 (22%) moderada (50,000-100,000/ mm^3), 2 (14%) grave (20,000-50,000/ mm^3) y 6 (43%) muy grave ($< 20,000/mm^3$) (Figura 10).

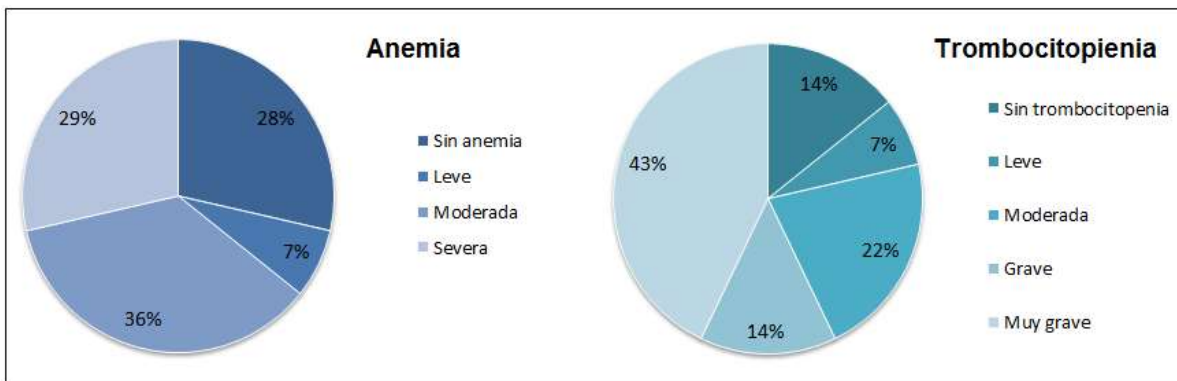


Figura 10. Clasificación de los pacientes por grado de anemia y trombocitopenia.

El índice de DNA se asocia a la tasa de proliferación de la clona leucémica y se clasifica en cuatro grupos para su estudio: a) < 1.0 , b) de 1.0 , c) de 1.1 a 1.5 y d) >1.16 . Se pudo obtener el resultado del índice de DNA de 6 pacientes que expresaron el *TEL-AML1*, encontrando que cinco casos presentaron el índice de DNA de 1.000 y un caso de 1.213 ; mientras que del grupo de pacientes negativo al *TEL-AML1*, uno presentó el índice de DNA mayor a uno y los demás fueron de uno (Tabla 4). La fracción proliferativa determinada por la fase S del ciclo celular que se considera de importancia pronóstica al presentar valores mayores a 6.8 , se asocia a mala respuesta en la inducción a la remisión. De nuestro grupo de pacientes que expresó *TEL-AML1*, a 4 casos fueron >6.8 , mientras que ninguno de los pacientes negativos al *TEL-AML1* presentó resultados mayor a 6.8 (Tabla 4).

En relación a la clasificación inmunofenotípica, dentro del grupo que expresó *TEL-AML1*, se distribuyeron en 2 casos de LLA B temprana, 3 de LLA Pre B, un caso de LLA T y un caso que no se determinó su inmunofenotipo. En estos pacientes la co-expresión de CD33 se presentó en 1 paciente, mismo que fue el único que co-expresó CD13. La expresión de CD10 fue positiva en 5 (Tabla 4). Al final del estudio el estado actual documentado es de 3 pacientes fallecidos.

Tabla 3. Factores clínicos y de pronóstico.

TEL-AML1 Positivos	Edad	Leucocitos	% de Blastos	Hb. al Dx.	Plaquetas al Dx.	DHL	Estado actual
VSJM	7	9900	12	11.9	174	1155	Finado
DPJ	8	10000	87	13.1	21	1302	Finada
IGEG	8	169330	91	7.9	23	9680	Finado
MGFJ (1)	16	14150	66	11.1	124	623	Vivo
MGFJ (2)							
ZRIJ	2	2710	30	10.9	50	613	Viva
GNAA	10	6900	85	5.2	29	524	Viva
CRC	6	23000	45	4.8	9.7	498	Viva
TEL-AML1 Negativos	Edad	Leucocitos	% de Blastos	Hb. al Dx.	Plaquetas al Dx.	DHL	Estado actual
PCPD	4	3500	0	9.2	163	Sin dato	Viva
HTG	14	3200	0	9.3	14	Sin dato	Vivo
TKDK	5	66590	32	6.2	88	Sin dato	Viva
ARM (1)	10	5620	53	8	78	853	Vivo
ARM (2)							
ZVRJ	0.9	4460	0	11.3	4.4	1741	Viva
ZRSI	5	2720	34	7.8	59	3906	Vivo
VBA (BCR-ABL +)	28	54000	90	6.4	10	Sin dato	Finado

Tabla 4. Información inmunofenotípica y del ciclo celular

TEL-AML1 Positivos	Inmunofenotipo	CD 33	CD 13	CD 10	% Células Malignas	Índice de DNA	% Fase S
VSJM	No determinado	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato
DPJ	LLA Pre B temprana	Positivo	Positivo	Positivo	97.9	1,213	5.7
IGEG	LLA T	Negativo	Negativo	Negativo	76.1	1,000	16.5
MGFJ (1)	LLA Pre B	Negativo	Negativo	Positivo	95.2	1,000	9.9
MGFJ (2)							
ZRIJ	LLA Pre B	Negativo	Negativo	Positivo	91.6	1,000	3.9
GNAA	LLA Pre B	Negativo	Negativo	Positivo	93.1	1,000	12.9
CRC	LLA Pre B temprana	Negativo	Negativo	Positivo	52.9	1,000	6.9
TEL-AML1 Negativos	Inmunofenotipo	CD 33	CD 13	CD 10	% Células Malignas	Índice de DNA	% Fase S
PCPD	LLA Pre B	Negativo	Negativo	Positivo	83.9	1,202	2.9
HTG	LLA Pre B	Negativo	Positivo	Positivo	99.1	1,000	0.8
TKDK	Leucemia Aguda	Positivo	Positivo	Negativo	41.9	1,000	0.9
ARM (1)	LLA Pre B	Negativo	Negativo	Positivo	96.3	1,000	3.1
ARM (2)							
ZVRJ	No determinado	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato
ZRSI	No determinado	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato	Sin dato
VBA (BCR-AB +)	No determinado	Sin dato	Sin dato	Positivo	Sin dato	Sin dato	Sin dato

7.2 Calidad del RNA

Las muestras de RNA de los pacientes que se incluyeron, presentaron buena calidad, la cual se evaluó por su pureza, es decir, la relación entre las concentraciones de ARN:Proteína, que tuvo valores mayores a 1.7 . La integridad se evaluó al observarse las bandas 28S, 18S y 5S (Figura 11).

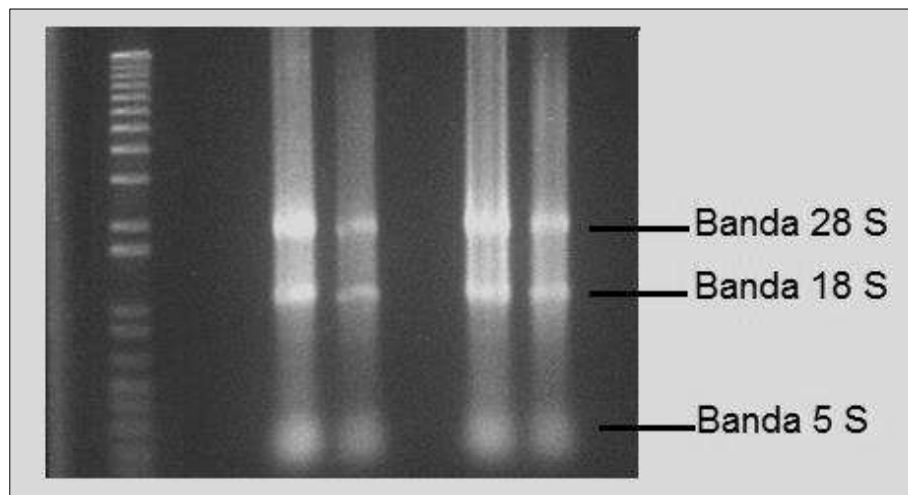


Figura 11. Integridad del ARN de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. La presencia de las bandas 28S y 18S en proporción 2:1 identifica las muestras con buena calidad. Se colocaron 2 μ L de cada muestra en gel de agarosa al 1%, corridos a 100 volts durante 45 min, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV en fotodocumentador.

7.3 Determinación de la expresión de *TEL-AML1* y *BCR-ABL* p190

Se llevó a cabo la búsqueda de la expresión de los genes de fusión *TEL-AML1* y *BCR-ABL* p190 por RT-PCR en 3 pacientes sin determinación previa. De estos, GNAA y CRC expresaron *TEL-AML1* y VBA expresó *BCR-ABL* p190 (Figura 12).

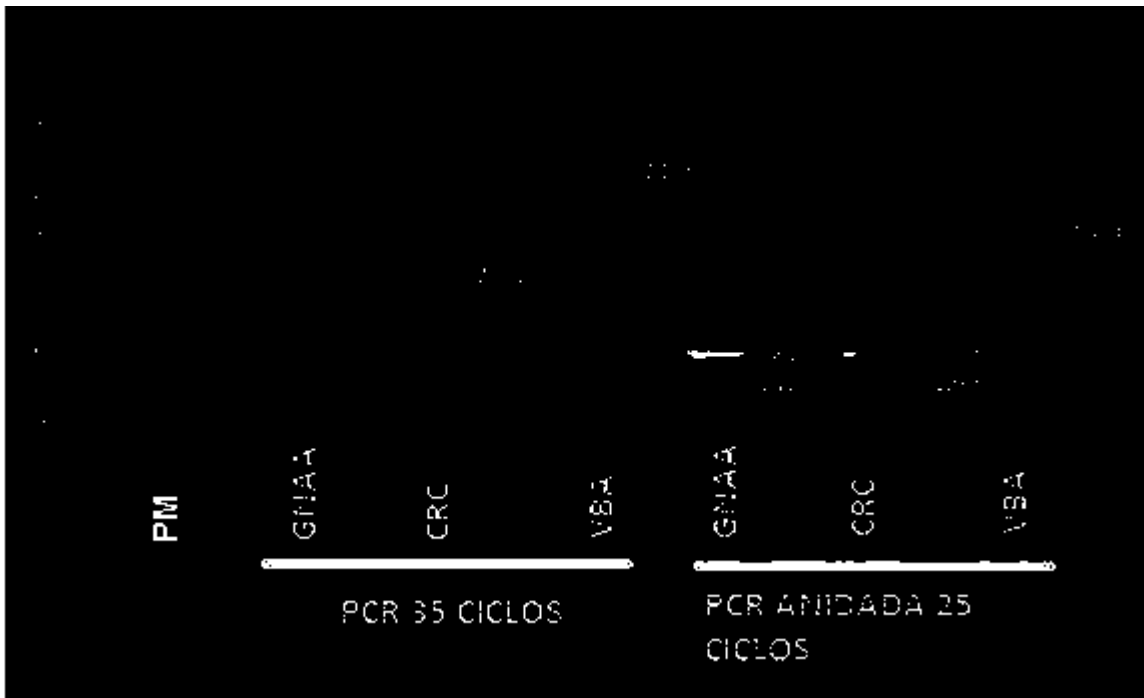


Figura 12. PCR y PCR anidado para determinación de *TEL-AML1* y *BCR-ABL* p190. El paciente GNAA no expresó *TEL-AML1* en la PCR sino hasta la PCR anidada. El paciente CRC expresó dicho gen en la PCR y PCR anidada. El paciente VBA expresó el gen *BCR-ABL* p190 en la PCR y pronunciadamente en la PCR anidada.

7.4 Estandarización de la amplificación y curva exponencial de *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL*

Se realizó una curva de ciclos de PCR, empleando 20, 23 y 25 ciclos con cDNA de la línea celular K-562 para determinar la fase exponencial de los genes *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL*, encontrando la cantidad de ciclos más adecuada de 23, 24 y 25 ciclos, respectivamente (Figura 13).

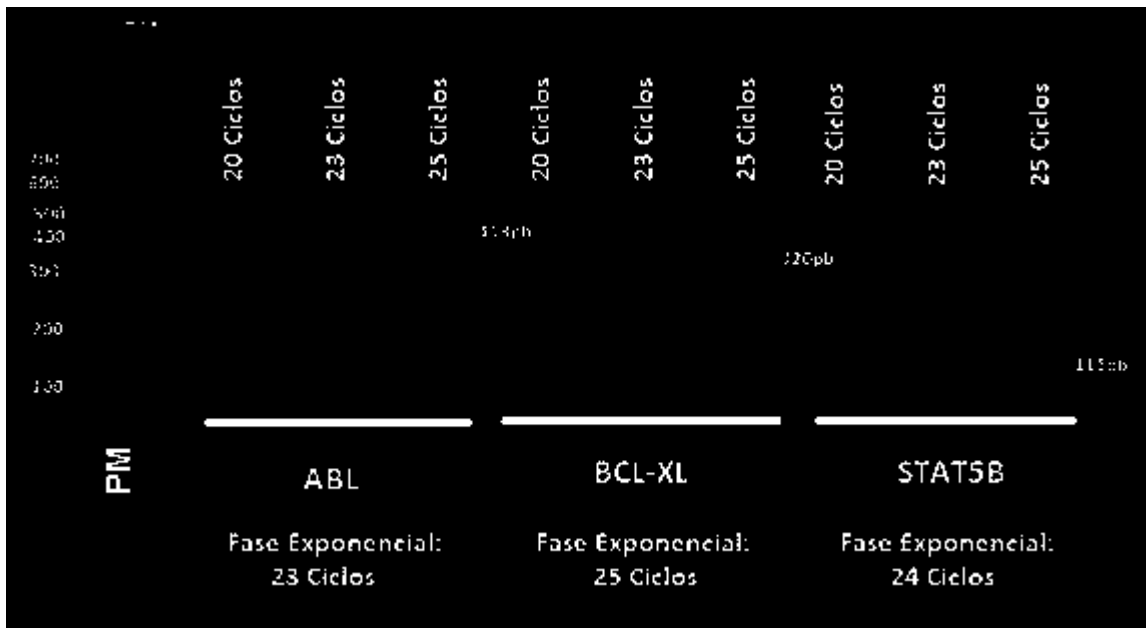


Figura 13. Determinación del número de ciclos para alcanzar la fase exponencial de la PCR en los genes *ABL*, *BCL-xL* y *STAT5B*.

7.5 Semi-cuantificación de *ABL*, *STAT5B* y *BCL-xL*

Se realizó PCR para los genes *ABL*, *STAT5B* y *BCL-XL* en los dos grupos de pacientes en los ciclos determinados (23, 24 y 25 ciclos, respectivamente) de su fase exponencial (Figura 14). En los pacientes ARM y MGFJ se realizó una medición adicional de seguimiento, cuando se encontraban al término de inducción a la remisión, para observar el comportamiento en la expresión de genes de estos pacientes. Para evaluar de forma semi-cuantitativa la expresión de los genes, se colocaron 10 μ L del producto de PCR en gel de agarosa al 1.5% y poliacrilamida al 10% y se corrieron en el medio TBE a 100 Volts durante 50 minutos. Después de colocó el gel en Bromuro de etidio durante 10 min. Se observó la aparición de las bandas al peso molecular esperado y se midió la intensidad de la banda de cada gen en los pacientes con y sin expresión de *TEL-AML1* utilizando el programa *Quantity One Chemi-Doc XRS system* (Figura 15) en la cual se seleccionaron las bandas y los picos de intensidad para la obtención de valores.

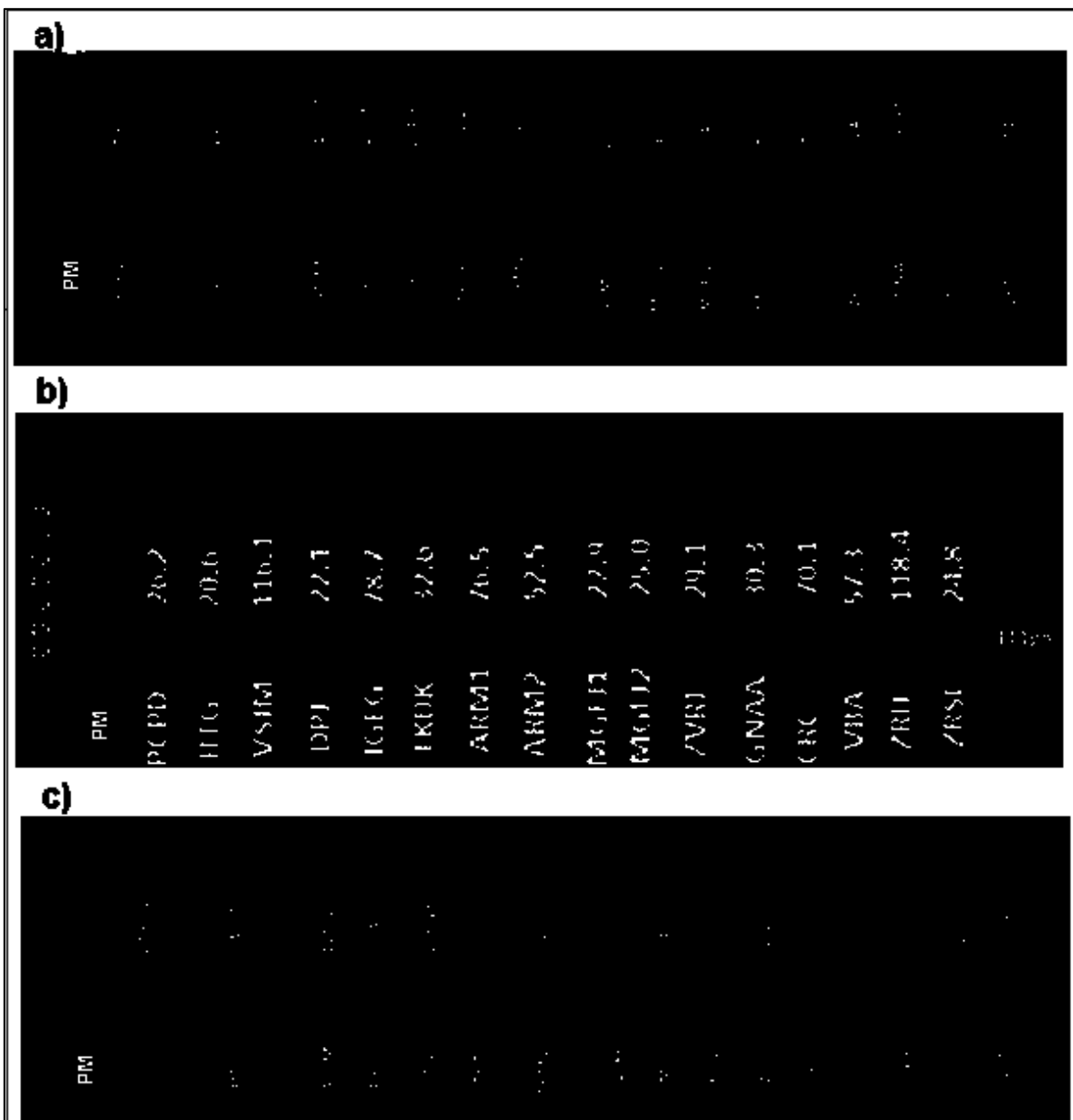


Figura 14. Expresión de *ABL*, *STAT5B* y *BCL-XL* en los 14 pacientes. a) Productos de PCR de *ABL* (413 pb) a 23 ciclos en gel de poliacrilamida al 10%. b) Productos de PCR de *STAT5B* (111pb) a 24 ciclos en gel de agarosa al 1.5%. c) Productos de PCR de *BCL-XL* (320pb) a 25 ciclos en gel de poliacrilamida al 25%.

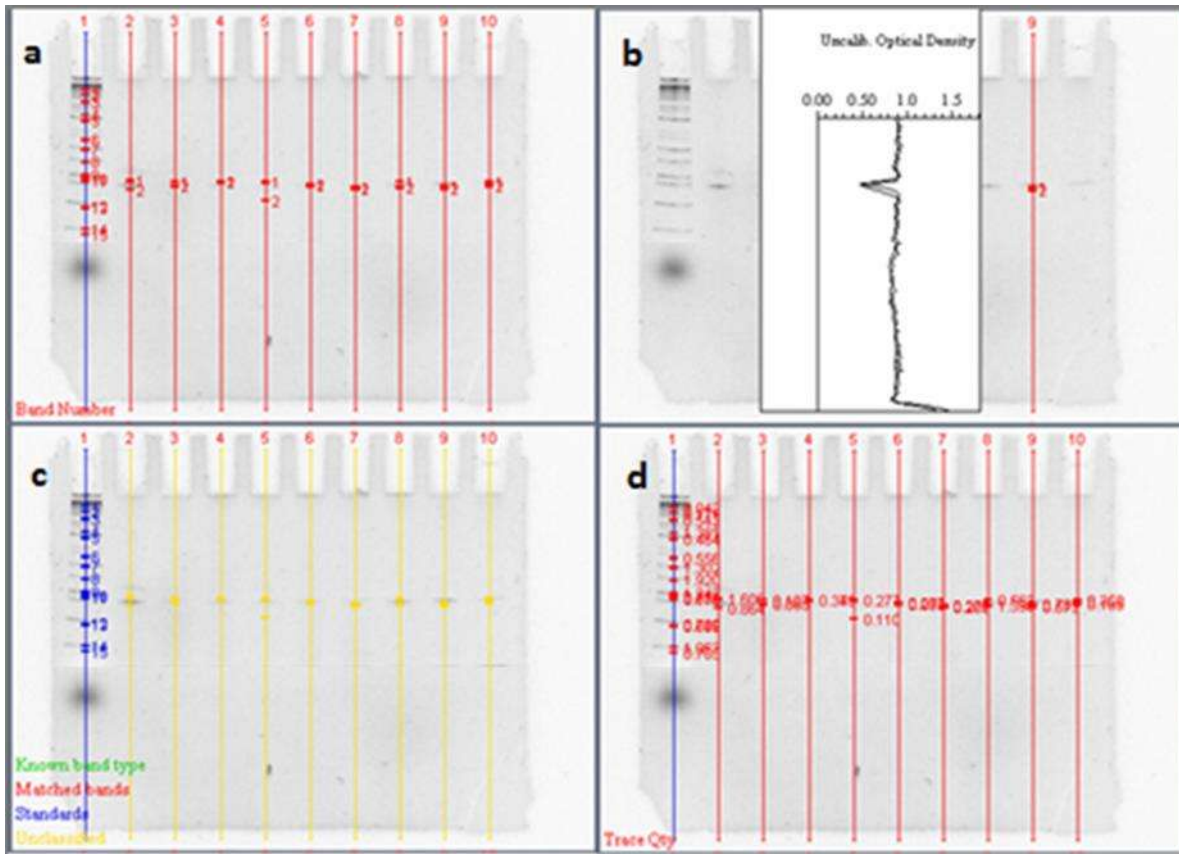


Figura 15. Vista del gráfico del programa *Quantity One Chemi-Doc XRS system* para la medición de la intensidad de las bandas. a) Primero se identificaron las bandas a evaluar y se alinearon, b) posteriormente se ajustó el pico de medición, c) después de tomó como referencia la línea del marcador de peso molecular y finalmente d) se obtuvieron los valores de la intensidad de cada banda.

La expresión semicuantitativa de *STAT5B* y *BCL-xL* se midió tabuló y mediante la normalización de su expresión respecto a la expresión de su propio gen control *ABL*, al cual denominamos índice de expresión de *STAT5B* ($STAT5B/ABL$) y *BCL-xL* ($BCL-xL/ABL$) en cada uno de los pacientes. También se determinó la relación entre los niveles de expresión normalizados entre *BCL-xL* y *STAT5B*, porque la expresión de *BCL-xL* depende de *STAT5B* (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de expresión de ABL, STAT5B y BCL-XL.

TEL-AML1 Positivos	Expresión ABL	Expresión STAT5B	Expresión BCL-XL	índice BCL-XL	índice STAT5B	índice BCL-XL/STAT5B
VSJM	107.35	116.1	125.19	1.166	1.081	1.078
DPJ	27.75	22.1	6.49	0.233	0.796	0.293
IGEG	124.92	78.7	136.26	1.09	0.63	1.731
MGFJ (1)	18.3	22.9	34.7	1.896	1.251	1.515
MGFJ (2)	34.9	25	30.25	0.866	0.716	1.21
ZRIJ	27.3	118.4	152.9	5.6	4.336	1.291
GNAA	97.65	30.3	39.5	0.404	0.31	1.303
CRC	112.35	70.1	25.9	0.23	0.623	0.369
TEL-AML1 Negativos	Expresión ABL	Expresión STAT5B	Expresión BCL-XL	índice BCL-XL	índice STAT5B	índice BCL-XL/STAT5B
PCPD	59.66	26.2	225.01	3.771	0.439	8.588
HTG	52.3	20.6	4.87	0.093	0.393	0.236
TKDK	74.47	32.6	35.3	0.474	0.437	1.082
ARM (1)	26.01	76.5	3.3	0.126	2.941	0.043
ARM (2)	123.2	52.45	37.6	0.305	0.4257	0.716
ZVRJ	27.7	29.1	35.6	1.285	1.05	1.223
ZRSI	24.3	24.8	13.3	0.547	1.02	0.536
VBA (BCR-AB+)	54.3	57.3	79.4	1.462	1.055	1.385

VIII ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tablas de contingencia para buscar asociación entre las características clínicas y niveles de expresión de los genes *STAT5B* y *BCL-xL* respecto a la expresión de *TEL-AML1*. Solamente se encontró asociación entre la Fase S del ciclo celular respecto a la expresión de *TEL-AML1* ($P = 0.010$, Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de medianas de las características clínicas en los grupos de pacientes que expresan y que no expresan *TEL-AML1*.

Estadísticos de prueba^a

	Índice BCLxL	Índice STAT5	Índice BCLxL/STAT5 B	Edad	Leucocitos	Blastos SP Dx	Células Malignas	Hemoglobina	Plaquetas	AcÚrico	DHL	ÍndiceDNA	FaseS
U de Mann-Whitney	27.000	26.000	25.000	21.500	17.000	13.000	11.000	20.000	23.000	23.000	20.000	11.500	.000
W de Wilcoxon	63.000	62.000	61.000	49.500	45.000	41.000	32.000	48.000	51.000	51.000	48.000	32.500	10.000
Z	-.525	-.630	-.735	-.385	-.958	-1.476	-.213	-.575	-.192	-.193	-.578	-.152	-2.558
Sig. asintótica (bilateral)	.600	.529	.462	.701	.338	.140	.831	.565	.848	.847	.564	.879	.011
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	.645 ^b	.574 ^b	.505 ^b	.710 ^b	.383 ^b	.165 ^b	.914 ^b	.620 ^b	.902 ^b	.902 ^b	.620 ^b	.914 ^b	.010 ^b

a. Variable de agrupación: TEL_AML1

b. No corregido para empates.

8.1 Pacientes que expresan *TEL-AML1*

Se utilizó la correlación de Pearson para buscar asociación de las características clínicas y el nivel de expresión de los genes *STAT5B* y *BCL-XL*. Se encontró en el grupo de los pacientes que expresaron *TEL-AML1*, correlación directamente proporcional entre los niveles de expresión de los *STAT5B* y *BCL-XL* ($P = 0.000$, Figura 16). Asimismo, se encontró correlación entre la cantidad de leucocitos al diagnóstico y la cantidad de enzima deshidrogenasa láctica (DHL), el cual fue directamente proporcional ($P = 0.000$, Figura 17).

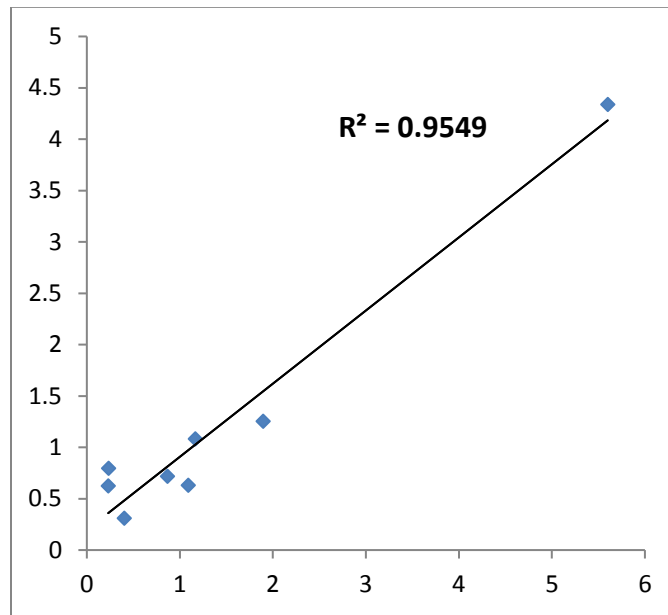


Figura 16. Correlación de *STAT5B* y *BCL-XL* en pacientes con *TEL-AML1*. Se considera que la correlación es buena al obtener una R^2 de 0.954.

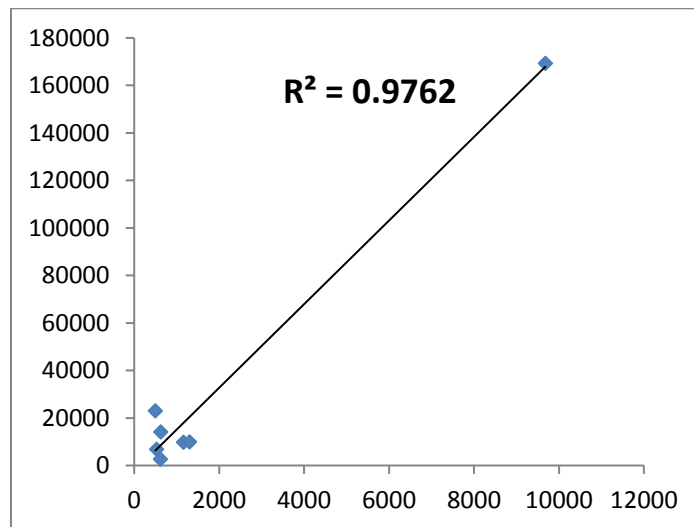


Figura 17. Correlación de leucocitos al diagnóstico y DHL.

8.2 Pacientes que no expresan *TEL-AML1*

Se utilizó la correlación de Pearson para buscar asociación de la expresión de los genes y las características clínicas. Se encontró que hay correlación entre la expresión de *BCL-XL* y el índice *BCL-XL/STAT5B* ($P = 0.000$, Figura 18). También

se encontró correlación entre la cantidad de leucocitos y la cantidad de hemoglobina al diagnóstico ($P = 0.045$, Figura 19), en la que la cantidad de leucocitos es inversamente proporcional a la hemoglobina.

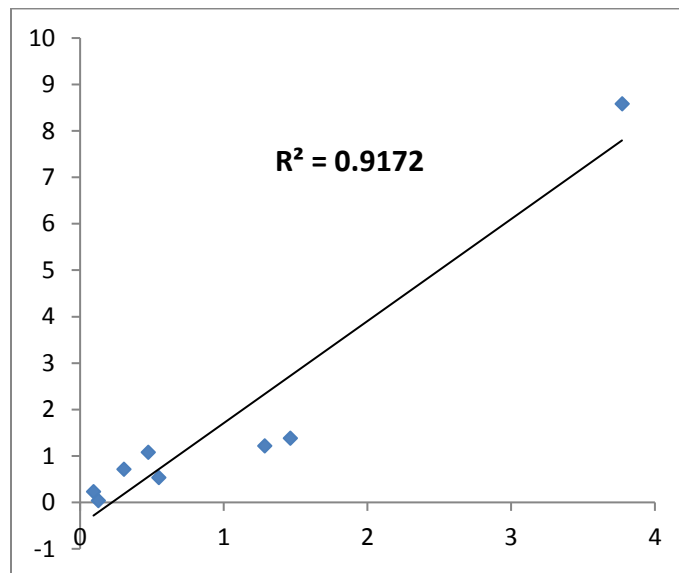


Figura 18. Correlación de *BCL-XL* y el índice *BCL-XL/STAT5B*.

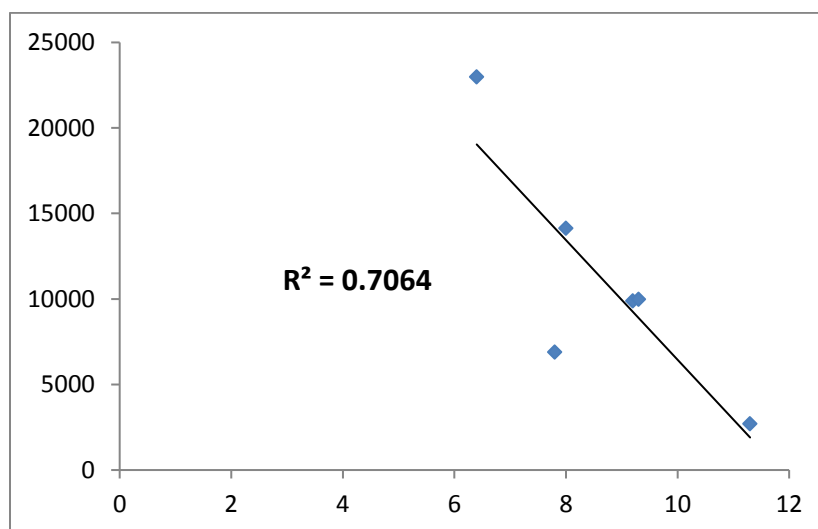


Figura 19. Correlación de leucocitos y la cantidad de hemoglobina al diagnóstico.

IX DISCUSIÓN

Se considera que la expresión de TEL-AML1 en pacientes pediátricos con LLA es un factor de buen pronóstico; no obstante hay algunos otros factores que pueden influir en el estado de salud del paciente, tales como el estado clínico en que se encuentra, estadio de la leucemia y el buen manejo del cuadro leucémico por parte del médico, además de los cuidados que reciba.

Linka Y y Col. describieron cómo la expresión de *TEL-AML1* puede contribuir directa e indirectamente a alterar las células hasta convertirse en propensas a la transformación leucémica. Identificaron 56 genes afectados con efectos negativos sobre la proliferación y transporte celular, pero con efectos positivos sobre la migración celular, y respuestas de estrés, incluyendo el estrés inmunológico. Esto nos indica que *TEL-AML1* es el gen alrededor del cual se desarrolla la leucemia en los pacientes que lo expresan. También exponen que en líneas celulares positivas a *TEL-AML1* que disminuyeron la expresión de este gen, indicaron también diferencias de expresión para los genes implicados en la diferenciación, apoptosis y respuestas inmunes.

En nuestro trabajo encontramos que hay asociación de la expresión de TEL-AML1 con la Fase S del ciclo celular, lo que indica una mayor proliferación relacionada directamente a este gen.

La LLA, al igual que en otros tipos de cáncer, exhibe pérdida de los controles de proliferación normal con las características de las células inmaduras debido a un bloqueo en su diferenciación y apoptosis. En este sentido Addeo R y Col. [69] refieren que p53 regula la apoptosis y la detención del ciclo celular en G1a progresión del ciclo celular está regulada por las quinasas dependientes de ciclina al activarse. Las mutaciones p53 están implicadas en la etiología de varios tipos de tumores sólidos y pueden tener importancia pronóstica en algunas neoplasias hematológicas adultas. En las leucemias agudas de la infancia, las mutaciones

p53 son infrecuentes en el momento del diagnóstico, pero tienden a estar asociadas con un pronóstico pobre.

Dado que la expresión de STAT5A/B influye positivamente en la expresión de genes con actividad antiapoptótica se espera que en todos los procesos oncológicos se observe una sobre expresión de los genes involucrados en esta vía, como es el caso del *BCL-xL*; sin embargo Hua-Tao y Col. [70] encontraron que STAT5A/ B se encuentran desregulados a la baja en pacientes con cáncer de mama en comparación con los tejidos normales y que la expresión de STAT5A/B se correlaciona con la disminución de los niveles de diferenciación histológica. De igual forma encontraron que los altos niveles de transcripción de STAT5A/B se asociaron con una mejor supervivencia libre de recaídas en todos los pacientes con BC.

X CONCLUSION

La expresión de STAT5B se correlaciona de manera directamente proporcional con la expresión de BCL-xL en los pacientes que expresan el gen de fusión TEL-AML1. A la vez que en este grupo de pacientes la Fase S del ciclo celular tiene un mayor porcentaje que en el grupo que no presentan el gen de fusión, lo que indica una mayor proliferación de células leucémicas en estos pacientes.

XI PERSPECTIVAS

- Ampliar en posteriores estudios la población de estudio.
- Llevar a cabo la medición de *STAT5A* para complementar el abordaje de STAT5 en la leucemia linfoblástica aguda junto con *STAT5B* y *BCL-XL*.

XII REFERENCIAS

1. Rossig C, Juergens H. **2008**. Aetiology of childhood acute leukaemias: current status of knowledge. *Radiat Prot Dosimetry*. 132:114-118.
2. Castillo-Martínez D, Juárez-Villegas LE, Palomo-Colli MA y Col. **2009**. Leucemia linfoblástica Aguda. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* Vol.66 No. 5. México sep/oct.
3. John Zeller MD, Cassio Ly MA, Richard M Glass. **2007**. *MD JAMA*; 297 (11): 1278.
4. Research Patren of Childhood Cancer Mortality in Mexico. **2000**. Volume 31, Issue 5. September-October, pp: 526-531.
5. Chessells JM. **2000**. Recent advances in management of acute leukemia. *Archives of Disease Childhood*, 82: 438-442.
6. SINAIS. **2005**. Sistema Nacional de la Información en Salud.
7. Rivera LR. **2010** Protocolos Técnicos, Cáncer en niños. Editores de textos Mexicanos SA de CV, DF, pp 1-7.
8. Jemal A, Siegel R, Xu J y Col. **2011**. *Cancer Statistics 2010*. *CA Cancer J Clin*; 61: 133-134.
9. Altekruse S, Kosary C, Krapcho M y Col. **2007**. *SEER Cancer Statistics Review*.
10. Ortega-Sánchez MA, Osnaya-Ortega ML, Rosas-Varrientos JV. **2007**. Leucemia Linfoblástica Aguda. *Med. Int. Mex.* 23:26-33 Medigraphic Artemisa.
11. Beutle E, Lichman M, Collier B, Kipps T y Col. **2001**. *Williams Hematology*, 6a Edición, New York; McGrawHill; pp: 1141-1161.
12. Ruíz-Arguelles GJ. **1998**. *Fundamentos de Hematología*, 2a Edición, México, Panamericana.
13. Partow. **2003**. Acute Lymphoblastic Leukaemia: diagnosis and classification. *Best practice & research Clinical Hematology*, 15(4): 597-621.
14. Beutle E, Lichman M, Collier B, Kipps T y Col. **2001**. *Williams Hematology*, 6a Edición, New York; McGrawHill; pp: 1141-1161.
15. Greaves M. **2005**. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev*; 81:123-9.
16. Zhou J, Goldwasser MA, Li A y Col. **2007**. Quantitative Analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood* 110 (5): 1607-1611.
17. Pui CH, Robison LL. **2008**. Look AT: Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371:1030-1043.
18. Wu J, Lu AD, Zhang LP. **2017**. Clinical characteristics and prognostic analysis of children and adolescents over 10 years of age with acute

- lymphoblastic leukemia. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2017 Jun;19(6):614-619.
19. Schrappe M, Stanulla M, Silverman LB, Harrison C. **2010**. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Education Book, The Netherlands.
 20. Bene MC, Castoldi G, Knapp W y Col. **1995**. Reposals of the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia; 9:1783-1786.
 21. Mandrell BN, Pritchard M. **2006**. Understanding the clinical implications of minimal residual disease in childhood leukemia. J pediatr oncol nurs;23:38–44.
 22. Figueroa-Padilla J. **2013**. Análisis molecular de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B. Tesis UMSNH.
 23. Jiménez-Arce G, Carrillo J, Chávez M, y Col. **2008**. Detección molecular del gen BCR-ABL por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. Rev. Biol. Trop; 56(4): 1613-1618.
 24. Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S y Col. **1991**. Consistent involvement of the *BCR* gene by 9:22 breakpoints in pediatric acute leukemias. Blood. 77: 324-330.
 25. Shaver A., M. Jagasia. 2013. BCR-ABL1 in Chronic Myeloid Leukemia. *My Cancer Genome* <https://www.mycancergenome.org/content/disease/chronic-myeloid-leukemia/bcr-abl1/> (Updated July 18).
 26. Von Dongen JJM, McIntive EA, Gabert JA y Col. **1999**. Standardized RT-PCR Analysis of fusion gene transcripts from Chromosome aberrations in acute leukemia for detection or minimal residual disease. Leukemia; 13: 1901-1928.
 27. Ching-Hon Pui. **2013**. Treatment of acute leukemias. Humana Press, Totowa New Jersey.
 28. Holleman A, Cheok MH, den Boer ML y Col. **2004**. Gene Expression patterns in drug resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. N Engl. J. Med. 351: 533-552.
 29. Slany RK. 2005. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. Hematol Oncol. 23: 1-9. Review.
 30. Romana SP, Poirel H, Leconiat M y Col. **1995**. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 86: 4263-4269.
 31. Zelent A, Greaves M, Enver T. **2004**. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Oncogene. 24:4275-83. Review.
 32. Gilliland DG, Griffin JD. **2002**. Role of FLT3 in leukemia. Curr Opin Hematol. Jul;9(4):274-81.
 33. Fischer M, Schwieger M, Horn S, Niebuhr B, Ford A y Col. **2005**. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. Oncogene; 24: 7579–7591.

34. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C y Col. **2002**. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 8242–8247.
35. Y Linka, S Ginzal, M Kruger y Col. **2013**. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer Journal* 3, e151; doi:10.1038/bcj.2013.48.
36. Artigas CG, Cabrera ME, Melo A y Col. **2006**. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Rev Med Chile*; 134: 1367-1376.
37. Shashidhar S, Jatiani , Stacey J, Baker, Lewis R, Silverman, and E. Premkumar Reddy. **2011**. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer* 1(10) 979–993.
38. Arbouzova NI, Zeidler MP. 2006. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133, 2605-2616 (2006) doi:10.1242/dev.02411.
39. Muhammad Furqan, Nikhil Mukhi, Byung Lee and Delong Liu. **2013**. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Furqan y Col. Biomarker Research* 1:5.
40. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T y Col. **2014**. Identification of STAT5A and STAT5B Target Genes in Human T Cells. *PLoS ONE* 9(1): e86790. doi:10.1371/journal.pone.
41. Zhengju Yao, Yongzhi Cui, Wendy T. Watford, et al. **2006**. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Immunology* No. 4 Vol. 103 1000-1004.
42. Joliet V, Cormier F, Medyouf H y Col. **2006**. Constitutive STAT5 activation specifically cooperates with the loss of p53 function in B-Cell Lymphomagenesis. *Oncogene*; 25: 4573-4584.
43. Stephen M, Shane M, Meinrad B y Col. **2010**. STAT5 in B-Cell development and leukemia current opinion in immunology; 22: 168-176.
44. Lynn M Heltemes-Harris and Michael A Farrar y Col. 2012. The role of STAT5 in lymphocyte development and transformation. *Current Opinion in Immunology*, 24:146–152.
45. Farrar MA. **2010**. Design and use of constitutively active STAT5 constructs. *Methods Enzymol*, 485:583-596.
46. Zhengqi Wang, Kevin D. Bunting y Col. **2016**. STAT5 activation in B-cell acute lymphoblastic leukemia; Damned if you do, damned if you don't. *Cancer Cell & Microenvironment*; 3: e1186. doi: 10.14800/ccm.1186.
47. Rolf P de Grout, Raijmakors-Jan AM, Jan-Willem J. y Col. **2000**. Dependent Cyclin D and BCL-XL Expression in BCR-ABL Transformed Cells. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 3: 299-305.

48. Gutierrez-Castellanos S, Cruz M, Rabelo L, Godinez R, Reyes-Maldonado E, Riebeling-Navarro C. **2003**. Differences in BCL-XL expression and STAT5 phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur J Haematol* 2004; 72: 231–238
49. Ambrosio R, Fimiani G, Monfregola J y Col. **2002**. The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter. *Gene*; 285(1–2):311–318. [PubMed: 12039059]
50. Jennifer A. Jenks, a Scott Seki, a Takahiro Kanai y Col. **2013**. Differentiating the roles of STAT5B and STAT5A in human CD4+ T cells. *Clin Immunol*; 148(2): 227–236.
51. Kazansky AV, Spencer DM and Greenberg NM. **2003**. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: Evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system. *Cancer Res* 63: 8757-8762.
52. Friedbichler K, Kerényi MA, Kovacic B y Col. **2010**. Stat5a serine 725 and 779 phosphorylation is a prerequisite for hematopoietic transformation. *Blood*. 2010 Sep 2; 116:1548–58.
53. Berger A, Sexl V, Valent P, Morigg R. **2014**. Inhibition of STAT5: A therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 20.
54. Lee TK, Man K, Poon RT y Col. **2006**. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66: 9948-9956.
55. Liang QC, Xiong H, Zhao ZW y Col. **2009**. Inhibition of transcription factor STAT5b suppresses proliferation, induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett* 273: 164-171.
56. Jackerott M, Moldrup A, Thams P y Col. **2006**. STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes* 55: 2705-2712.
57. Hiroki Sumiyoshi, Akira Matsushita, Yoshiharu Nakamura y Col. **2016**. Suppression of STAT5b in pancreatic cancer cells leads to attenuated gemcitabine chemoresistance, adhesion and invasion. *ONCOLOGY REPORTS* 3 3216 5: 3216-3226.
58. Chen H1, Pan J, Yao L y Col. **2012**. Acute promyelocytic leukemia with a STAT5b-RAR α fusion transcript defined by array-CGH, FISH, and RT-PCR. *Cancer Genet*. 2012 Jun;205(6):327-31. Doi.
59. Nagarajan Elumalai, Angela Berg, Stefan Rubner y Col. **2017**. Rational development of Stafib-2: a selective, nanomolar inhibitor of the transcription factor STAT5b. *Scientific Reports* | 7: 819.

60. Sayer Al-harbi¹, Gaurav S. Choudhary, Jey Sabith Ebron y Col. **2015**. miR-377-dependent BCL-xL regulation drives chemotherapeutic resistance in B-cell lymphoid malignancies. Al-harbi et al. *Molecular Cancer* 14:185
61. Mitochondria, Stress and Cell Death. Stephen Manon. Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires. I.B.G.C. –UMR 5095. <http://www.ibgc.u-bordeaux2.fr/?page=equipe&eq=msmc>. Consultado el 02 de Agosto de 2017.
62. Judith Michels, Oliver Kepp, Laura Senovilla y Col. **2013**. Functions of BCL-XL at the Interface between Cell Death and Metabolism. *International Journal of Cell Biology*, Article ID 705294, 10 pages.
63. Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM y Col. **2015**. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 20560-20575; doi:10.3390/ijms160920560.
64. Lin Z, Jiang J, Liu XS y Col. **2016**. Ursolic acid-mediated apoptosis of K562 cells involves Stat5/Akt pathway inhibition through the induction of Gfi-1. *Scientific Reports* | 6:33358 | DOI: 10.1038/srep33358.
65. Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, et al. **1999**. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13:1901-1928.
66. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N y Col. **2013**. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. doi:10.1182/blood.V100.3.1014.
67. Baskiewicz-Masiuk M, Machalinski B. **2004**. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol* 2004; 72: 420–429.
68. Alvarado-Coria D, Pérez-Rivera E. Gutiérrez-Castellanos S. **2017**. Genes de fusión como marcador molecular para el estudio de la enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Tesis de Maestría, 2017. UMSNH. Morelia Mich.
69. Addeo R, Caraglia M, Baldi A. **2005**. Prognostic Role of bcl-xL and p53 in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Cancer Biology & Therapy* 4:1, 32-38.
70. Hua-Tao W, Jing L., Guan-Wu L. **2017**. The transcriptional STAT3 is a potential target, whereas transcriptional STAT5A/5B/6 are new biomarkers for prognosis in human breast carcinoma. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 22), pp: 36279-36288.

XIII ANEXOS

Anexo I Carta de consentimiento informado



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS
LABORATORIO DE CITOPATOLOGÍA MOLECULAR
HOSPITAL _____ MORELIA, MICH.
Servicios de Medicina Interna – Hematología - Oncología
U.M.S.N.H – SSA



Carta de consentimiento para la participación de proyectos de investigación científica

Morelia, Mich., a ____ de _____ del 20 ____

La presencia alteraciones moleculares y la clasificación inmunofenotípica, se pueden asociar a un buen o mal pronóstico, su detección oportuna es de suma importancia para aplicar los esquemas de tratamiento más adecuados dependiendo del tipo de alteración y con ello se alcanza la remisión completa.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación **"EXPRESIÓN DE STAT5B Y BCL-xL EN PACIENTES QUE PRESENTAN EL GEN DE FUSIÓN TEL-AML1"**.

Registrado ante el comité local de investigación con el número: ____ El objetivo de este trabajo es determinar la alteración molecular en pacientes con leucemia mieloide aguda así como la enfermedad mínima residual y asociarlos al progreso de la enfermedad. En este proyecto se utiliza material genético que no será utilizado para otro tipo de estudio, solo para el establecido en esta investigación. Se me ha explicado que se utilizarán aproximadamente 10 mL o su equivalente de médula ósea y/o sangre periférica los cuales serán tomados por punción de la cresta iliaca o venopunción, esta se me realizará en el área de la toma de muestras para con ellas definir mi diagnóstico. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos: dolor, moretón y / o hinchamiento en el sitio de la toma de médula ósea ya que este es un procedimiento invasivo. El investigador principal se ha comprometido a responder las preguntas o cualquier duda que yo le planteé acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento sin que esto influya sobre la atención que recibo por esta institución, así como que dicha participación no tendrá ningún costo (no pagaré por participación del estudio).

El investigador principal me ha dado la seguridad de que los datos obtenidos serán en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionar la información actualizada que se obtenga durante el estudio.

Dr. en C Sergio Gutiérrez Castellano

Nombre y firma del participante

Nombre del Padre o tutor

Nombre y firma de testigo

Anexo II Formato de recolección de datos del paciente



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SÁN NICOLÁS DE HIDALGO
 FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADOS
 LABORATORIO DE CITOPATOLOGÍA MOLECULAR
 HOSPITAL _____ MORELIA, MICH.
 Servicios de Medicina Interna – Hematología - Oncología
 U.M.S.N.H – SSA



DATOS DE ENVIO DE MUESTRA

Nombre completo	Fecha de toma de muestra
	No. de registro (Hospital)
Edad	
Sexo	Tipo de muestra
Diagnóstico probable	
A) De <i>novo</i>	Hospital
B) En tratamiento, días post-diagnóstico	
En caso de B), definir estadio de tratamiento (días, semanas o meses)	
a) Inducción a la remisión	
b) Consolidación	
c) Mantenimiento	
d) Vigilancia	
Observaciones	

BH
Hb
Hto
VCM
HCM
Leuc.
Neutr.
Linf.
Basof.
Eos.
Mono.
Blastos

Médula ósea	
Morfología	%
Eritro	
Prom	
Mielo	
Metam	
Bandas	
Seg	
Eos	
Bas	
Linf	
Mono	
Plasm	
Blastos	
Megas	
Celular	
Infil	
Clasif. FAB	

Enfermedad mínima residual:

Anexo III Carta de aceptación del proyecto de investigación en el Hospital Infantil de Morelia "Eva Sámano de López Mateos"

 <p>MICHOACÁN</p>	<p>SECRETARIA DE SALUD DE MICHOACÁN HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA "EVA SAMANO DE LOPEZ MATEOS" DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION GOBIERNO DEL ESTADO 2012 - 2015</p>	 <p>Michoacán Compromiso de todos</p>
<p>ASUNTO: Aprobación de Protocolo de Investigación</p>		
<p>Morelia, Mich., 9 de Julio del 2014</p>		
<p>C. Q.F.B. JORGE GONZALES JARAMILLO P R E S E N T E.-</p>		
<p>Por medio del presente informo que su Proyecto de Investigación titulado "EXPRESION DE STAT5 MERCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE ESTIRPE B", ha sido <i>Aprobado</i> por la <i>Comisión de Investigación</i> de este Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos".</p>		
<p><i>Registro No. HIM/O/2/2014</i></p>		
<p>Sin otro particular, reciba un cordial saludo.</p>		
<p>ATENTAMENTE</p>		
<p> DR. ANTONIO SANCHEZ SANCHEZ JEFE DEL DPTO. DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION</p>		
<p>C.c.p. Archivo ASS/JLMT Mipr</p>		<p>JEFATURA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN</p>
<p>www.michoacan.gob.mx Int. Bosque Cuauhtémoc, S/N Centro, C.P. 58000 Morelia, Michoacán, México. Tel. (443)312-25-20 / 312-25-21</p>		

Anexo IV Carta de aceptación del protocolo de investigación en el Hospital Civil "Dr. Miguel Silva"



SECRETARIA DE SALUD
MICHOACÁN
HOSPITAL GENERAL "DR.
MIGUEL SILVA"
ISIDRO HUARTE ESQ.
SAMUEL RAMOS
MORELIA, MICH.
C.P. 58000

DEPENDENCIA: HOSPITAL GENERAL DR. MIGUEL SILVA
DEPARTAMENTO: ENSEÑANZA E INVESTIGACION
NÚMERO DE OFICIO: 5009/716/14
EXPEDIENTE:

ASUNTO: Se informa sobre proyecto de investigación

Morelia, Michoacán, 11 de julio del 2014.

DC. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS
INVESTIGADOR PRINCIPAL
PRESENTE

Por este conducto informo a usted, que los Comités de Ética e Investigación Hospital General "Dr. Miguel Silva", **revisaron y aprobaron** su proyecto de investigación titulado: "EXPRESIÓN DE STAT5 Y MARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE ESTIRPE B, haciendo las siguientes recomendaciones:

- El resumen no cumple con los criterios establecidos falta tipo de estudio, variables y tratamiento estadístico que se planea realizar.
- El problema no está sustentado (solo no hay información en lo gubernamental) y mejorar el problema de investigación
- Que beneficios tendrá el paciente tendrá acceso a los resultados.
- Bibliografía estilo Vancouver.
- Quien va asumir el costo del proyecto
- Incluya más bibliografía de la leucemia en adultos
- El proyecto de investigación no es experimental
- Mejorar la redacción
- Categorizar variables (que es nominal y no continua) y de acuerdo a ello el tratamiento estadístico.
- Definir el inmunofenotipo que se van a utilizar.
- Contar con la firma de investigadores asociados.

Sin más por el momento, le envié un cordial saludo.


DRA. SONIA HERNÁNDEZ RODRIGUEZ
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE ÉTICA EN
INVESTIGACIÓN DEL "HOSPITAL GENERAL
"DR. MIGUEL SILVA"

ATENTAMENTE


DR. JUAN MANUEL VARGAS ESPINOSA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE
INVESTIGACIÓN

SHR*JMVE*MFSTZ*sev.


HOSPITAL GENERAL "DR. MIGUEL SILVA"
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN