



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INVESTIGACION CLINICA

**Asociación del perfil de expresión genica apoptoica con la respuesta a prefase esteroidea e
impacto en la supervivencia de pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica**

Alumno

Juan José Ortiz Zamudio

Director de Tesis

M. en C. Mauricio Pierdant Perez

Asesores

Dr. en C. Antonio Augusto Gordillo Moscoso

Dr. en C. Oscar A. Pérez González

M. en C. Lourdes Cecilia Correa González

M. en C. América Susana Mares Garcia

M. en C. José Luis Ramirez García-Luna

| | |
|---------------------------------------|--|
| <i>Director de Tesis</i> | |
| M. en C. Mauricio Pierdant Pérez | |
| <i>Asesor</i> | |
| Dr. en C. Antonio A. Gordillo Moscoso | |
| <i>Asesor</i> | |
| Dr. en C. Oscar A. Pérez González | |
| <i>Asesor</i> | |
| M. en C. América Susana Mares Garcia | |

| | |
|--|--|
| Sinodales | |
| M. en C. Amado Nieto Caraveo | |
| M. en C. Martín Sanchez Aguilar | |
| Dr. Abel Salazar Martínez | |
| Dra Rosalina Rivera Vega | |
| Dr. Antonio A. Gordillo Moscoso Coordinador de la Maestría en Ciencias en Investigación Clínica | |
| M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefa de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina | |

| | |
|---|--|
| Dr. Alejandro Javier Zermeño Guerra Director de la Facultad de Medicina | |
|---|--|

Resumen

Introducción

La Leucemia Linfoblástica Aguda es el cáncer más frecuente de la infancia, en las últimas cuatro décadas ha mostrado un aumento significativo en las tasas de supervivencia actualmente hasta un 83% de supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo el 25% de los pacientes no responden de manera adecuada al tratamiento por diversos factores entre ellos la resistencia a algunos quimioterápicos. La respuesta al tratamiento conocido como fase esteroidea se ha propuesto como el principal factor pronóstico en recientes fechas. El objetivo de nuestro estudio fue demostrar la influencia de la expresión de los siguientes genes apoptóticos: BCL2, caspasa 8 y XIAP en la respuesta al tratamiento esteroideo de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica y su impacto en la supervivencia de los mismos.

Material y métodos

Analizamos muestras de médula ósea de 47 pacientes al diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica para identificar la expresión de genes apoptóticos BCL2, Caspasa 8 y XIAP en relación a un gen control, a través de determinación por técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real previo al inicio de esteroide. En todos los pacientes se realizó evaluación de la respuesta al tratamiento esteroideo de 7 días considerando buena respuesta a los pacientes con menos de 1000 blastos en sangre periférica. Se realizó asociación de la expresión de estos genes de manera individual y en conjunto con la respuesta al tratamiento con prednisona y la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes incluidos.

Resultados

Encontramos que la supervivencia libre de enfermedad en nuestros pacientes fue de 78.7% similar a la reportada internacionalmente, la prevalencia de buena respuesta al tratamiento esteroideo fue de 62% de los pacientes incluidos en el estudio. En nuestra población fue más prevalente la subexpresión de los genes apoptóticos considerados con el 74.4%, 89% y 93.6% de subexpresión de Caspasa 8, BCL2 y XIAP respectivamente, de los cuales con significado estadístico la subexpresión de XIAP en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.049$). En nuestro estudio los pacientes con buena respuesta tuvieron 82.8% de SLE comparado con 72.2% de SLE en pacientes malos respondedores, sin embargo no resultó ser significativamente estadística esta diferencia ($p=0.463$). Respecto a la asociación de expresión génica y respuesta al tratamiento esteroideo destaca que los pacientes con mala respuesta al esteroide y además una sobre expresión del gen antiapoptótico XIAP presentaron una SLE muy pobre (33.3%) sin lograr demostrar significado estadístico. La sobreexpresión del gen Caspasa 8 fue documentada en los pacientes vivos en nuestro estudio en mayor proporción comparada con los otros dos genes.

Conclusión

La expresión de diversos genes relacionados con apoptosis al momento del diagnóstico se ha considerado como uno de los factores pronósticos más relevantes en la respuesta al tratamiento de los pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica, en este estudio logramos aportar que la sobreexpresión de genes anti apoptóticos como BCL2 y XIAP confieren mayor resistencia al tratamiento traducida con menor supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes lo que concuerda con su función biológica. Análisis de expresión génica con mayor número de pacientes estudiados serán necesarios para lograr demostrar la influencia trascendental esencialmente del gen XIAP en la respuesta al tratamiento de estos pacientes, para así proponer en un futuro algún perfil de expresión génica determinado al diagnóstico de los pacientes como un importante factor pronóstico para la enfermedad.

Agradecimientos

Gracias a mis padres que sin su ejemplo no fuera quien soy.

Gracias a ti Gina, Daniel, Emilio y Daniela por su felicidad y aliento.

Gracias a ti Daniela que has sido mi motor.

Gracias a Oscar, mis maestros, amigos y colegas por su apoyo

Pero sobre todo, gracias a mis pacientes quienes me enseñan que la vida no tiene problemas sino oportunidades de ser más valientes y felices día a día.

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 2 |
| ANTECEDENTES..... | 7 |
| Panorama actual de Leucemia Aguda Linfoblástica en Pediatría | 7 |
| Tratamiento y Supervivencia de Leucemia Aguda Linfoblástica | 8 |
| Factores pronósticos..... | 8 |
| Edad..... | 9 |
| Respuesta al tratamiento | 10 |
| Prefase esteroidea | 10 |
| Inducción a la remisión..... | 11 |
| Perfiles de expresión génica..... | 12 |
| Genes candidatos..... | 13 |
| <i>Gen Leucemia/Linfoma célula B - 2 (BCL2)</i> | 13 |
| <i>Gen Inhibidor de apoptosis asociado a X (XIAP)</i> | 14 |
| TECNICA DE RT-qPCR (PCR en tiempo real) | 14 |
| JUSTIFICACION..... | 16 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 16 |
| HIPOTESIS | 16 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| Objetivo general..... | 17 |
| Objetivos específicos..... | 17 |
| SUJETOS Y METODOS..... | 17 |
| Diseño del estudio | 17 |
| Grupo de estudio | 17 |
| CRITERIOS DE SELECCION | 18 |
| Criterios de inclusión..... | 18 |
| Criterios de exclusión | 18 |
| Criterios de eliminación..... | 18 |
| DESCRIPCION OPERATIVA DEL ESTUDIO..... | 18 |
| DEFINICION CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE LAS VARIABLES | 20 |
| CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA..... | 21 |
| ANALISIS ESTADISTICO | 22 |

| | |
|--|-----------|
| ANALISIS DE CONCORDANCIA | 22 |
| CONSIDERACIONES ETICAS | 24 |
| RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES | 25 |
| RECURSOS FINANCIEROS | 25 |
| ANALISIS ESTADISTICO | 26 |
| DISCUSION..... | 55 |
| CONCLUSIÓN..... | 57 |
| REFERENCIAS..... | 58 |
| ANEXO 1. GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A PREFASE ESTEROIDEA..... | 63 |
| Anexo 2. PCR en tiempo real..... | 66 |
| ANEXO 3. TECNICA DE EXTRACCION RNA, cDNA, REVERSO TRANSCRIPCION Y RT-qPCR | 71 |
| ANEXO 4 ESQUEMA DE LA DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO..... | 75 |
| ANEXO 5. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO..... | 76 |
| ANEXO 6. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS | 77 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| L.A.L. | Leucemia Aguda Linfoblástica |
| E.M.R. | Enfermedad Mínima Residual |
| S.N.C. | Sistema Nervioso Central |
| B.F.M. | Berlín – Frankfurt - Munster |
| G.C. | Glucocorticoides |
| MDR1 | Gen 1 de Resistencia a Multidroga |
| MRP1 | Proteína 1 Relacionada a Gen de Resistencia a Multidroga |
| LRP | Proteína de Resistencia Pulmonar |
| BCRP | Proteína de Resistencia a Cáncer de Mama |
| SJCRH | St Jude Children's Research Hospital |
| D.H.L. | Deshidrogenasa láctica |
| L.A.L. – B | Leucemia Aguda Linfoblástica de inmunofenotipo B |
| L.A.L. – T | Leucemia Aguda Linfoblástica de inmunofenotipo T |
| T.C.P.H | Trasplante de Células Pluripotenciales Hematopoyéticas |
| C.O.G. | Childrens Oncology Group |
| L.C.R. | Líquido Cefaloraquídeo |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| FISH | Hibridación fluorescente in situ |
| P.E.G. | Perfiles de expresión de génica |
| A.M.O. | Aspirado de médula ósea |
| S.L.E. | Supervivencia Libre de Evento |

ANTECEDENTES

Panorama actual de Leucemia Aguda Linfoblástica en Pediatría

Desde su reconocimiento 150 años atrás, la Leucemia Aguda Linfoblástica ha sido el foco de una importante actividad de investigación y consecuente progreso. Aunque la primera descripción de un paciente con leucemia fue publicada en 1827 (1), no fue hasta 1845 que Virchow en Alemania y Bennet en Escocia en reporte de casos separados, reconocieron esta como una enfermedad distinta, "sangre blanca". Dos años después, Virchow introdujo el término Leucemia para esta entidad e inicio una serie de investigaciones que fueron publicadas en 1856. Un año después, Friedreich describió el concepto Leucemia Aguda y en 1878 Neumann estableció la existencia de Leucemia Mielogénica Aguda. (1)

La Leucemia Linfoblástica Aguda (L.A.L.) es la neoplasia más frecuente en la infancia, representa el 28 al 30% de todos los cánceres en la población pediátrica, y respecto a las Leucemias constituye el 80% de todas las leucemias de la edad pediátrica, el 15% son Leucemia de estirpe mieloblástica y el 5% restante son Leucemias Crónicas. (2,3). En E.E.U.U. son diagnosticados cada año entre 2500 y 3500 niños con L.A.L. En México esta cifra se encuentra entre los 1000 y 1500 casos al año (4, 5, 6)

El pico de incidencia máximo se establece entre los dos y los cinco años de edad. En cuanto al sexo, la L.A.L. predomina ligeramente en los varones, sobre todo en la edad puberal. Las diferencias geográficas son notables en esta enfermedad; mientras que, en los países menos desarrollados, como norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las L.A.L. de estirpe T, en los países industrializados la L.A.L. de estirpe B es con mucho la más frecuente de las hemopatías malignas. (3,7)

Tratamiento y Supervivencia de Leucemia Aguda Linfoblástica

La supervivencia de los pacientes afectados de L.A.L. se ha incrementado notablemente en los últimos 30 años. En el 2000, los resultados de importantes grupos colaborativos para el tratamiento de leucemia infantil de ensayos clínicos realizados en la década pasada reportaron sin diferencias significativas entre éstos, tasas de supervivencia libre de enfermedad a 5 años entre 71% a 83% (tabla 1) y tasas de remisión total usualmente mayor a 98%. A pesar de estos excelentes resultados, el 25% de los pacientes fracasan en el tratamiento, por lo que son necesarias nuevas estrategias que nos permitan seleccionar a los pacientes que se puedan curar con tratamientos menos tóxicos y a los que se beneficien de terapias más agresivas. (8,9)

Los factores considerados para la mejoría dramática en la supervivencia durante los últimos años incluyen la identificación y combinación de drogas antineoplásicas a través de ensayos clínicos aleatorizados, el reconocimiento de sitios santuarios y la instauración de tratamiento profiláctico a sistema nervioso central (SNC) intensificación de esquemas terapéuticos e importantemente la estratificación del tratamiento basado en el riesgo. La mayoría de los protocolos terapéuticos actuales nacionales e internacionales para L.A.L. tienden a estratificar pacientes en diversos grupos terapéuticos. (10) En nuestro país, el Consejo Nacional para la prevención y el Tratamiento del Cáncer y la Adolescencia, establece los siguientes criterios clínicos y bioquímicos y moleculares para establecer los grupos de tratamiento de pacientes pediátricos de nuestro país. (10,23)

Factores pronósticos

Desde la década de los 50's Burchenal entre otros identificaron factores clínicos que conferían mayor riesgo de falla de respuesta al tratamiento en los pacientes con L.A.L., inicialmente reportaron la cuenta leucocitaria como uno de estos factores, fue así como veinte años más tarde fue diseñado el primer protocolo de tratamiento para L.A.L. de alto riesgo de recaída. (11,12,13) Actualmente, estos factores pronósticos han sido trascendentes en la estratificación de pacientes de acuerdo al grupo de riesgo asignado para definir el esquema terapéutico a utilizar. (14,15)

Edad

Aún cuando los pacientes con L.A.L. menores de un año representan sólo el 2-3% de la población con L.A.L., este grupo tiene un resultado inferior debido en parte a las características de alto riesgo asociadas (ejemplo, cuenta leucocitaria alta, enfermedad extramedular extensa, inmunofenotipo proB) así como la incrementada incidencia de toxicidad relacionada al tratamiento. (16,17)

Los adolescentes con L.A.L. tienen un pronóstico inferior respecto al resto de los pacientes pediátricos. Las razones para esta discrepancia no son del todo completamente entendidas hasta el momento, se plantean como posibles explicaciones los esquemas quimioterápicos menos intensivos, y toxicidad incrementada. De hecho, los resultados han mostrado ser mejores al incrementar dosis y disminuir intervalos, haciendo estos esquemas más intensos. (18,19,20,21,22,23,24)

Los pacientes con carga leucocitaria elevada al diagnóstico (>50,000 leucocitos/mm³) tienen mal pronóstico respecto al grupo de pacientes con menor cuenta. Este grupo de pacientes se ha asociado con mayor presencia de factores como menores de un año de edad, presencia de masa mediastinal con leucemia de inmunofenotipo T, hepatomegalia y esplenomegalia. (25,26)

El diagnóstico preciso y tratamiento exitoso de las leucemias agudas se basa en el reconocimiento de la población de células leucémicas determinando su linaje maligno e incluso su grado de maduración a través del Inmunofenotipo. (27,28,29,30,31)

Históricamente el marcador de inmunofenotipo T ha sido un marcador de pobre pronóstico en comparación con precursores de células B, mejorando la supervivencia con intensificación de tratamiento. (32,33)

Recientemente con la terapia dirigida en base a grupos de riesgo, el resultado de estos pacientes ha mejorado respecto años anteriores demostrado por diversos grupos colaborativos, por ejemplificar, el grupo Nórdico para el tratamiento de L.A.L. en pacientes pediátricos reportó una supervivencia libre de enfermedad de 61% a 5 años, respecto 79% de S.L.E. a 5 años observada en pacientes con L.A.L. de inmunofenotipo B. (10,34,35)

En el estudio citogenético de las L.A.L. se incluye las anormalidades cromosómicas detectadas. La translocación (9;22) es detectada en aproximadamente 2-4% de los niños con L.A.L.-B y la translocación (4;11) con genes de fusión MLL-AF4 en 1-2% de los niños menores de 12 meses de edad con L.A.L. (37,38)

En el proceso de dirigir tratamientos en base a riesgo y factores pronósticos, se ha disminuido o eliminado el impacto de factores tales como género masculino y raza negra, así mismo como incrementado evidencia respecto al mayor poder pronóstico de factores esencialmente moleculares. Recientemente los estudios genómicos amplios han comenzado a esclarecer el entendimiento de la leucemogénesis, su pronóstico y en algunas instancias, estimular el desarrollo de terapia blanco. (39)

Respuesta al tratamiento

La respuesta al tratamiento refleja diversos componentes, como la genética de las células leucémicas y la farmacodinamia y farmacogenética del huésped, por ello, este factor tiene una mayor fuerza pronóstica que cualquier otra característica clínica o biológica evaluada a la fecha.

La respuesta al tratamiento es uno de los indicadores pronóstico más útiles en leucemia aguda linfoblástica infantil. Existen actualmente dos estrategias de medición de respuesta al tratamiento claramente estandarizadas: la evaluación de respuesta a la prefase esteroidea en sangre periférica (ventana esteroidea) y la evaluación de la inducción a la remisión en sangre de médula ósea por medio de Enfermedad Mínima Residual (E.M.R.). Ambas tienen como objetivo determinar el grado de respuesta de acuerdo a la quimiosensibilidad de las células leucémicas a diversos fármacos, y estableciendo una importante utilidad pronóstica.

Prefase esteroidea

Los glucocorticoides (GC) han sido involucrados en los esquemas terapéuticos desde la aparición de éstos como parte de la prefase esteroidea e inducción a la remisión leucémica. El principal mecanismo de acción antineoplásica de los GC es a través de la vía de apoptosis. (45)

El grupo alemán Berlín-Frankfurt-Munster (BFM) estableció desde 1987 el valor pronóstico de este criterio. Riehm y colaboradores establecieron como parte del protocolo ALL-BFM 93 la

administración de siete días de corticoesteroide y una dosis de metotrexate intratecal, considerando el valor de corte de linfoblastos en sangre periférica de 1000/microlitro para asignar a los pacientes en dos grupos, como buenos o malos respondedores a prednisona. El nivel de blastos leucémicos circulantes después de una semana de quimioterapia es asociado con riesgo de recaída. (41)

La utilidad de este método ha sido bien apreciado y empleado por otros muchos grupos de estudio internacionales como el Grupo de Leucemia Infantil y el Concilio de Investigación en Cáncer Infantil, entre otros. (42,43, 44)

El mecanismo de sensibilidad o Resistencia en vivo a glucocorticoides en leucemia aguda linfoblástica pediátrica no ha sido completamente entendida. Diferentes estudios con microarreglos han sido realizados para lograr mayor señalización del efecto de prednisona en los blastos leucémicos y así entender la resistencia al glucocorticoide.

En función de lo anterior, recientemente se han tratado de identificar los fundamentos que expliquen esta diversidad en la sensibilidad de las células leucémicas al esteroide.

La hipótesis de esta quimioresistencia de blastos leucémicos a glucocorticoides gira en torno a que se trata de una característica intrínseca molecular de las células de L.A.L. por lo que en la última década se ha remarcado la importancia de realizar estudios traslacionales sobre perfiles de expresión génica de blastos leucémicos a diferentes fases del diagnóstico y tratamiento de un paciente con L.A.L., por ejemplo comportamiento génico a GC in vitro, así como en vivo las diferentes modificaciones génicas previo a la aplicación de prednisona, durante y posterior a la misma, e incluso la asociación de la expresión génica inicial y su asociación con la respuesta a diversos fármacos. (46)

Inducción a la remisión

La respuesta a la inducción a la remisión ha sido un criterio para evaluación del tratamiento antineoplásico en la leucemia aguda linfoblástica en pacientes pediátricos, que ha sido instituido por los principales grupos colaborativos en todo el mundo. Consiste en evaluar presencia de células leucémicas residuales posterior a la fase de inducción que consiste en diversos fármacos

quimioterápicos a través de un análisis por citometría de flujo en sangre de médula ósea del paciente.

Perfiles de expresión génica

Los perfiles de expresión génica consisten en analizar el grado de expresión de diversos genes por diversos métodos de tecnología molecular como FISH, RT-PCR, qRT-PCR, microarreglos, entre otros. Han sido utilizados para establecer asociación esencialmente con respuesta al tratamiento y tasas de recaída tanto en las neoplasias más frecuentes en adultos como cáncer de próstata, de ovario, colorectal, entre otros (47,48,49)

Los P.E.G. en niños con L.A.L. fueron inicialmente realizados para asociarlos con los subgrupos citogenéticos con factor pronóstico, como pacientes con rearrreglo cromosómico del gen MLL, la translocación 9;22 entre otros. (50,51,52)

Se postula que los P.E.G. pueden iniciar a consolidarse como una herramienta clínicamente relevante para la estratificación de tratamiento en el curso temprano de la L.A.L. en niños y podría contribuir a una mejoría en los resultados del tratamiento por definir una terapia óptima para cada paciente. (10,53)

A través de estudios previos identificando P.E.G. en niños con L.A.L. se han logrado identificar un gran número de genes relacionados con la respuesta al tratamiento específicamente con la resistencia a diversos fármacos antineoplásicos utilizados en la fase de inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento de pacientes con L.A.L.

Sin embargo, existen diversos estudios que han permitido determinar genes directamente involucrados con la función antineoplásica por G.C. Consideramos a continuación los resultados directamente relacionados con la expresión génica en niños con L.A.L. y su asociación con la respuesta a tratamiento posterior a búsqueda en las siguientes fuentes: PubMed, Ovid, EBSCOhost, MedicLatina, SCIELO.

Se mencionan a continuación el conjunto de genes asociados a respuesta a prefase esteroidea así como en algunos casos a resultado en supervivencia en pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica obtenido de la revisión de la literatura de las fuentes mencionadas y la implicación clínica de cada uno de ellos. Se anexa (ANEXO 1. Genes candidatos asociados a

prefase esteroidea) la información detallada de cada uno de los genes. (símbolo, localización genética, coordenadas genómicas, sinópsis clínica, estructura génica, modelo animal, mapeo, características bioquímicas, etc)

Genes candidatos

Gen Proteína 2 asociada a Caspasa 8 (CASP8AP2)

CASP8AP2 se considera un gen proapoptico, mecanismo esencial en la división y proliferación celular. El grupo colaborativo de St Jude Children's Research Hospital (SJCRH), Flotho y colaboradores demostraron que los pacientes con expresión disminuida del gen CASP8AP2 tuvieron una S.L.E. más baja ($p=0.02$) y una tasa más alta de recaída de leucemia ($p=0.01$) y representó un predictor independiente de respuesta a tratamiento. La sobreexpresión de CASP8AP2 fue asociada con mayor propensión a apoptosis en linfoblastos leucémicos. (41,42,43)

Gen Leucemia/Linfoma célula B – 2 (BCL2)

El gen BCL2 codifica una proteína de capa interna de membrana mitocondrial localizada en la membrana mitocondrial que su principal función es interferir con la muerte celular programada independiente del ciclo de división celular.

BCL2 es un gen predominantemente asociado a muerte celular, sin embargo también participa menos determinante en funciones como ciclo celular y comunicación celular.

Coustan Smith y colaboradores estudiaron la expresión de este gen en 52 niños al diagnóstico de L.A.L., detectaron que los pacientes con niveles menores de expresión de BCL fueron significativamente asociados con la presencia de translocaciones cromosómicas ($p=0.01$), sin embargo pacientes con niveles más altos de expresión no fueron asociados con mala respuesta a tratamiento. (33) Posteriormente, el rol de BCL2 en su asociación con mala respuesta al tratamiento esteroideo en niños con L.A.L. no ha sido claramente concluyente. (32,34,35)

Gen Inhibidor de apoptosis asociado a X (XIAP)

Pertence a una familia de multigenes que los miembros muestran homología extensa a baculovirus IAP's y codifican proteínas que demuestran inhibición significativa de apoptosis.

La expresión génica incrementada de XIAP, así como la sobrerregulación postranscripcional de la proteína ha sido evidenciada recientemente por Hundsdorfer y colaboradores asociada con mayor incidencia de mala respuesta a la prednisona en pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica ($p < 0.0001$) (40)

Resumen

| Gen | Localización del gen | Función | Implicación Clínica (Referencias) |
|----------|----------------------|---|---|
| CASP8AP2 | 6q15 | Proliferación celular Proapoptosis | Subexpresión relacionada con mala respuesta a esteroides y menos supervivencia libre de enfermedad (41,42,43) |
| BCL2 | 18q21.33 | Antiapoptosis | Sobreexpresión relacionada con mala respuesta a esteroides (32,33,34,35) |
| XIAP | Xq25 | Antiapoptosis Proteína inhibidora de apoptosis | Subexpresión relacionada con buena respuesta a esteroides (40) |

Por lo anterior, de acuerdo a la literatura revisada y comentada podemos establecer que la expresión de un conjunto de genes (CASP8, Bcl2, XIAP) se asocia a determinada respuesta a la prefase esteroidea y a su vez con potencial pronóstico reflejado en la supervivencia libre de enfermedad.

TECNICA DE RT-qPCR (PCR en tiempo real)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final es una técnica diseñada con base en el principio de la replicación del ADN, la cual se utiliza para sintetizar una secuencia específica de ADN in vitro y consta de 3 fases: desnaturalización, amplificación y elongación.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR punto final, en la que la adición de marcadores nos permite detectar y cuantificar el producto sintetizado en tiempo real. Una de sus aplicaciones

es la detección de cambios en la expresión génica, ya que al ser cuantitativa, nos permite determinar los niveles de ARNm de cualquier gen de interés en las condiciones de estudio.

Por su mayor factibilidad en base a infraestructura y costo más económico, la técnica de RT-qPCR ha sido preferida para este estudio.

JUSTIFICACION

La Leucemia Aguda Linfoblástica constituye el cáncer más frecuente en la población pediátrica, a pesar de la mejoría en supervivencia la cual a nivel internacional en países en vías de desarrollo se reporta de 75%, por lo que aún el 25% de los pacientes presentan falla a tratamiento. En el pasado, los factores considerados determinantes de la supervivencia se establecían meramente clínicos, al día de hoy la hipótesis de que los factores biológico moleculares de cada uno de los casos específicamente genéticos de cada leukemia explican el comportamiento de cada paciente. Es conveniente identificar genes con un determinado nivel de expresión que se asocie con resistencia al tratamiento y sea posible identificarlos al momento de diagnóstico.

La identificación e incorporación de perfiles de expresión génica relacionados con la apoptosis y característicos de un patrón de respuesta terapéutica que además demuestre un significativo impacto en la supervivencia de los pacientes permitirá proponer a nivel nacional e internacional una más adecuada asignación a grupos de tratamiento, contribuyendo esto además de incrementar tasas de remisión, una menor toxicidad en pacientes con mejor pronóstico que no requieren esquemas de tratamiento intensos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una asociación entre el perfil de expresión de genes apoptoicos y la respuesta a la prefase esteroidea con impacto en la supervivencia de pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica?

HIPOTESIS

El perfil de expresión de genes apoptoicos se asocia con la respuesta a la prefase esteroidea con un impacto favorable en la supervivencia de pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica

OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar el perfil de expresión de genes apoptóticos que se asocie con respuesta a la prefase esteroidea y supervivencia de pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica que ingresen al Servicio de Pediatría del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Objetivos específicos

- Definir el diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica en pacientes con sospecha del padecimiento.
- Evaluar la expresión de los genes CASP8, Bcl2, XIAP, al diagnóstico por medio de qRT-PCR en los pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica
- Evaluar la respuesta a la prefase esteroidea en relación a la cantidad de blastos en sangre periférica
- Establecer asociación de la expresión de genes mencionados con la respuesta a la prefase esteroidea en los pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica
- Determinar la supervivencia libre de enfermedad de cada paciente y su asociación con la expresión génica y respuesta a la prefase esteroidea

SUJETOS Y METODOS

Diseño del estudio

- Estudio de Cohorte

Grupo de estudio

- Pacientes menores de 17 años de edad con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica que presenten al diagnóstico más de 1000 blastos en sangre periférica que reciban tratamiento con prefase esteroidea por 7 días y cuenten con biometría hemática al día 8 de iniciada la prefase.

CRITERIOS DE SELECCION

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica (para mayor referencia ver definición operacional)
- Pacientes menores de 17 años del servicio de Hemato – Oncología Pediátrica
- Pacientes con cuenta de blastos mayor a 1000 en sangre periférica al diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica
- Carta de consentimiento y asentimiento firmados si corresponde.

Criterios de exclusión

- Pacientes con tratamiento antineoplásico previo, incluyendo esteroides.
- Paciente sin biometría hemática al diagnóstico o posterior a prefase esteroidea

Criterios de eliminación

- Paciente que no concluya la prefase esteroidea por cualquier razón

DESCRIPCION OPERATIVA DEL ESTUDIO

(ANEXO 3)

Diagnóstico, Tratamiento y Análisis de Expresión Génica

Procedimientos iniciales. Aquellos pacientes que ingresen al servicio con el diagnóstico presuntivo de Leucemia Aguda Linfoblástica serán considerados para realizar el procedimiento de aspirado de médula ósea (A.M.O.) con el objetivo de obtener material para realizar inmunofenotipo por citometría de flujo y análisis citogenético. En este mismo procedimiento de realizar el A.M.O. para fin de diagnóstico e inmunofenotipificación, se utilizará un remanente de la misma muestra para este proyecto de investigación para realizar la extracción de RNA y posteriormente la expresión génica por qRT-PCR

Confirmación del Diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica

El diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica se confirmará con los hallazgos en el A.M.O. y en el inmunofenotipo por citometría de flujo de la misma muestra de tejido.

El frotis del aspirado de médula ósea será valorado por la Onco Hematóloga Pediatra del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto (Dra. Lourdes Correa González) y el Investigador principal en quienes se determinará concordancia interobservador para determinar el diagnóstico de L.A.L. el cual se establece con presencia de más del 25% de blastos en médula ósea.

Se realizará prueba de citometría de flujo para la determinación de inmunofenotipo utilizando marcadores de linaje convencionales, tanto linfoides como mieloides, para determinar el tipo de leucemia. Serán considerados para el proyecto exclusivamente los casos de leucemia aguda linfoblástica. Esta prueba será realizada por el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P.

La muestra tomada de médula ósea para establecer el diagnóstico es utilizada para determinación de cantidad de DNA (ploidia) y análisis citogenético (translocaciones 9;22 y 4;11).

Asignación del Tratamiento de Esteroides y de Inducción a la Remisión

Toda vez confirmado el diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica, los pacientes recibirán el esquema de prefase esteroidea del día 0 al día 7 del diagnóstico. (Prednisona 40mg/m²/día cada 8 hrs)

Transporte y Almacenamiento de la Muestra de Tejido para el Análisis de Expresión

La muestra de tejido neoplásico se obtendrá de la toma del primer aspirado de médula ósea, antes de iniciar la ventana de esteroide. La muestra se introducirá inmediatamente en un tubo colector estéril de vidrio con anticoagulante K₃EDTA de 5mL (BD Vacutainer, Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA), etiquetado con un número consecutivo que se registrará en la Hoja de Recolección de Datos. El volumen del aspirado de médula ósea requerido será de al menos 2mL. Se colocará para su transporte en un contenedor portátil con hielo. Posteriormente, dentro de la primer hora subsecuente a la toma de la muestra, se realizará la extracción de RNA.

Extracción de RNA:

Se extraerá RNA total de la muestra de tejido neoplásico de médula ósea. Se obtendrán las células mononucleares por separación con un medio de gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences Inc, Piscataway, NJ, USA). Para el procedimiento de extracción de RNA se utilizará el reactivo TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posterior al procedimiento de extracción con TRIZOL[®] Reagent, se procederá a la purificación de la muestra utilizando columnas de centrifugación con membranas de sílica (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

Realización de RT-qPCR

La Técnica de transcripción reversa y RT-qPCR se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del instituto Nacional de Pediatría a cargo del D. en C. Oscar Pérez González y el investigador principal del protocolo. (ANEXO 3 TECNICA DE EXTRACCION RNA, cDNA, REVERSO TRANSCRIPCION Y RT-qPCR)

DEFINICION CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

Variable independiente

| Código | Nombre | Significado | Escala de Medición | Indicador |
|-------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|
| ExpGenCASP8 | Expresión de gen Caspasa8 | Expresión de gen Caspasa8 | Dicotómica | Baja=0 Alta=1 |
| ExpGenBCL2 | Expresión de gen BCL2 | Expresión de gen BCL2 | Dicotómica | Baja=0 Alta=1 |
| ExpGenXIAP | Expresión de gen XIAP | Expresión de gen XIAP | Dicotómica | Baja=0 Alta=1 |

Variable Dependiente

| Código | Nombre | Significado | Escala de Medición | Indicador |
|---------|-----------------------------------|---|--------------------|---------------------------------------|
| RespTto | Respuesta a prefase esteroidea | Número de blastos en sangre periférica (SP) medido por biometría hemática al día 8 de iniciado el esteroide Buena respuesta=>1000 blastos en SP Mala respuesta= >1000 blastos en SP | Dicotómica | Buena respuesta=1 Mala respuesta=2 |
| SLE | Supervivencia Libre de Enfermedad | Tiempo en meses que el sujeto persiste sin enfermedad a partir de terminada la prefase esteroidea | Cuantitativa | Meses |

CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Se estimó el tamaño de muestra para cada uno de los genes de interés, siendo seleccionado al final aquel que presentaba las diferencias más pequeñas en proporción.

Se calculó el tamaño de la muestra con base en los datos reportados por Flotho y cols.* donde menciona una proporción de 64% de los casos con subexpresión vs 35% de sobreexpresión de CASP8AP2 en el grupo con mala respuesta a tratamiento.

Así, la estimación de la muestra, utilizando la fórmula para tamaño muestral para la comparación de dos proporciones (con B=0.80 y a=0.05), dio como resultado 45 casos para cada grupo con un total de 90.

$$n = \left(\frac{z_{\alpha} \sqrt{2 p(1-p)} + z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right)^2$$

donde:

n es el número de sujetos necesarios para cada una de las muestras

z_{α} es el valor correspondiente al riesgo alfa

z_{β} es el valor correspondiente al riesgo beta

p_1 es el valor de la proporción en el grupo de referencia, placebo, control o tratamiento habitual

p_2 es el valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento, intervención o técnica

p es la media de las dos proporciones p_1 y p_2

ANALISIS ESTADISTICO

Se utilizará estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión según el tipo de variable, para enlistar las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio y definir el tipo de distribución de datos a analizar con pruebas de normalidad.

Análisis bivariado

- Se realizará la prueba de Chi cuadrada para determinar la asociación entre la expresión de los genes de interés y la respuesta al tratamiento, en forma bivariada.

Análisis Multivariado

- Análisis multivariado por modelo de regresión de Cox para determinar el impacto conjunto de la expresión de los genes de interés. ^(71, 72)

ANALISIS DE CONCORDANCIA

Se revisaron inicialmente 18 laminillas de aspirado de médula ósea de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica y de pacientes sin diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica como: Purpura Trombocitopénica idiopática, tumores de sistema nervioso central, sarcoma de Ewing, Neuroblastoma, Rbdomiosarcoma, Histiocitosis.

Fue revisado por dos observadores:

- Juan José Ortiz Zamudio
- Lourdes Cecilia Correa González

Procedimiento

- Se seleccionaron 18 laminillas de aspirados de medula ósea
- Se aleatorizó y se marcaron numéricamente
- Posterior valoración en ese orden y diagnóstico de LA (0=no, 1=si)

Se calcularon los siguientes índices de concordancia inter-observador

Concordancia Interobservador

```
(dtab <- table(dat$JJ,dat$CC))
```

```
##      0 1  
##    0 7 0  
##    1 2 9
```

```
CKappa(dtab)
```

```
##           value    ASE  
## Unweighted 0.7778 0.1444
```

```
## Kappa           lwr upr  
## Unweighted 0.4947  1
```

Kappa = 0.77, 95%IC [0.49 - 1.0]

Posterior a ello, se incrementó el número de laminillas evaluadas por ambos observadores a 30 laminillas de aspirados de médula ósea con y sin diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica.

Con los siguientes datos de concordancia interobservador:

Concordancia Interobservador

```
(dtab <- table(dat$JJ1,dat$CC1))
```

```
##  
##      0 1  
##    0 13 0  
##    1  3 14
```

```
CKappa(dtab)
```

```
##           value    ASE  
## Unweighted 0.8018 0.1064  
## Weighted   0.8018 0.1064
```

```
## Kappa           lwr upr  
## Unweighted 0.5932  1  
## Weighted   0.5932  1
```

Kappa = 0.80, 95%IC [0.59 - 1.0]

Se analizó la concordancia intraobservador del investigador principal para el diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica, con los siguientes datos:

Concordancia Intraobservador

```
(dtab <- table(dat$JJ1,dat$JJ2))
```

```
##  
##      0  1  
##  0 12  1  
##  1  0 17
```

```
CKappa(dtab)
```

```
##           value      ASE  
## Unweighted 0.9315 0.06718  
## Weighted   0.9315 0.06718  
##  
## Kappa           lwr upr  
## Unweighted 0.7998  1  
## Weighted   0.7998  1
```

Kappa = 0.93, 95%IC [0.79 - 1.0]

CONSIDERACIONES ETICAS

Será necesario incluir una carta de consentimiento y asentimiento informado (ANEXO 5 CONSENTIMIENTO INFORMADO) que se apegue a la Ley General de Salud, a la Conferencia Internacional de Armonización y a las Buenas Prácticas Clínicas para contar con el permiso del paciente y/o su tutor para el análisis de la muestra del aspirado de médula ósea.

Aseguraremos también el apego del estudio a los señalamientos de la UNESCO a través de la "Declaración universal sobre el genoma humano y los derechos humanos".

El proyecto fue sometido a revisión y aprobado por el comité de Ética en Investigación del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, con fecha de aprobación el día 24 de Junio del 2014 con el número de registro: **47-14**.

Consideraciones de Bioseguridad

El desarrollo del experimento se apega a los estatutos de la Ley Federal de Salud en Materia de Bioseguridad. Durante el experimento se considera el empleo de equipo de protección tales como guantes de látex, anteojos protectores y bata de laboratorio para evitar el contacto directo con el material tóxico-biológico que sea empleado. Así mismo, el desecho de los residuos tóxico-biológicos y del material punzo-cortante se realizará en contenedores específicos para cada tipo de residuos.

RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES

Se realizará el aspirado de médula ósea para diagnóstico de L.A.L. por parte del Oncólogo Pediatra del servicio de Onco Hematología Pediátrica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

Se realizará el lisamiento celular, extracción d RNA, amplificación y realización de cDNA en el Laboratorio de Investigación Traslacional en Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.S.L.P. por parte del investigador principal y la Lic. en Biotecnología América Susana Mares García.

Se realizará la técnica de qRT-PCR en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría en México D.F., por parte del investigador principal y el M. en C. Oscar Pérez González.

RECURSOS FINANCIEROS

Se sometió a consideración de financiamiento en la Subdirección de Salud Reproductiva y Atención a la Infancia y Adolescencia a través de la LE Carmen Martínez K. Responsable del Programa Estatal de Cáncer en la Infancia. Se declara sin conflicto de interés.

Fue proporcionado el material necesario para la expresión génica de los genes candidatos a través de RT PCR por el Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, por medio del Dr. Oscar Pérez González.

ANALISIS ESTADISTICO

1. Análisis de dispersión
2. Curva ROC
3. Análisis de Supervivencia por Kaplan Meier
 - o Análisis supervivencia global
 - o Análisis supervivencia para expresión de cada gen
 - o Análisis de supervivencia para la prefase esteroidea
 - o Análisis de supervivencia para expresión de gen y prefase esteroidea
4. Regresión de Cox

1. Análisis de dispersion de expresión de cada gen hacia su gen de referencia

Se realizó la dispersion del gen de referencia en las muestras de análisis de expression de gen Caspasa y encontramos una media de 15.6 con desviación estandar de 2.4 por lo que podemos considerar que el 95.4% de la muestra estará entre valores de 10.6 a 21.1 con un valor outlier de 5.22 que fue el valor mínimo. Al analizar el grado de asimetría encontramos fue de -1.001 lo que sugiere un sesgo en rangos considerable.

Estadísticos descriptivos

| | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. |
|------------------------|----|--------|--------|---------|------------|
| CTprom18S | 47 | 5.22 | 21.18 | 15.6174 | 2.49904 |
| N válido (según lista) | 47 | | | | |

Estadísticos descriptivos

| | N | Media | Asimetría | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | Estadístico | Estadístico | Estadístico | Error típico |
| CTprom18S | 47 | 15.6174 | -1.001 | .347 |
| N válido (según lista) | 47 | | | |

Se realizó la dispersion del gen de referencia en las muestras de análisis de expression de gen BCL2 y encontramos una media de 15.6 con desviación estandar de 1.12 por lo que podemos

considerar que el 95.4% de la muestra estará entre valores de 13.4 a 17.8. Al analizar el grado de asimetría encontramos fue de 1.22 lo que sugiere un sesgo en rangos considerable.

Estadísticos descriptivos

| | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. |
|------------------------|----|--------|--------|---------|------------|
| CTprom18S | 47 | 13.67 | 20.04 | 15.6666 | 1.12835 |
| N válido (según lista) | 47 | | | | |

Estadísticos descriptivos

| | N | Media | Asimetría | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | Estadístico | Estadístico | Estadístico | Error típico |
| CTprom18S | 47 | 15.6666 | 1.224 | .347 |
| N válido (según lista) | 47 | | | |

Se realizó la dispersión del gen de referencia en las muestras de análisis de expresión de gen XIAP y encontramos una media de 14.8 con desviación estándar de 1.46 por lo que podemos considerar que el 95.4% de la muestra estará entre valores de 12.0 a 17.6. Al analizar el grado de asimetría encontramos fue de 0.542 lo que sugiere un sesgo en rangos considerable.

Estadísticos descriptivos

| | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. |
|------------------------|----|--------|--------|---------|------------|
| CTprom18S | 47 | 12.37 | 18.79 | 14.8643 | 1.46076 |
| N válido (según lista) | 47 | | | | |

Estadísticos descriptivos

| | N | Media | Asimetría | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | Estadístico | Estadístico | Estadístico | Error típico |
| CTprom18S | 47 | 14.8643 | .542 | .347 |
| N válido (según lista) | 47 | | | |

2. Curva COR

Para determinar la sobre expresión o sub expresión de cada gen, se determinó un punto de corte (Curva ROC/Cor) para lo cual se definió como variable de desenlace la respuesta a la prefase esteroidea, considerando un mínimo de 80% de sensibilidad. Mostramos los puntos de corte en base al 83% de sensibilidad para cada gen:

| Gen | Nivel de sensibilidad | Sobreexpresión | Subexpresión |
|-----------------|-----------------------|----------------|--------------|
| CASP8AP2 | 80% | < 17.07 | > 17.07 |

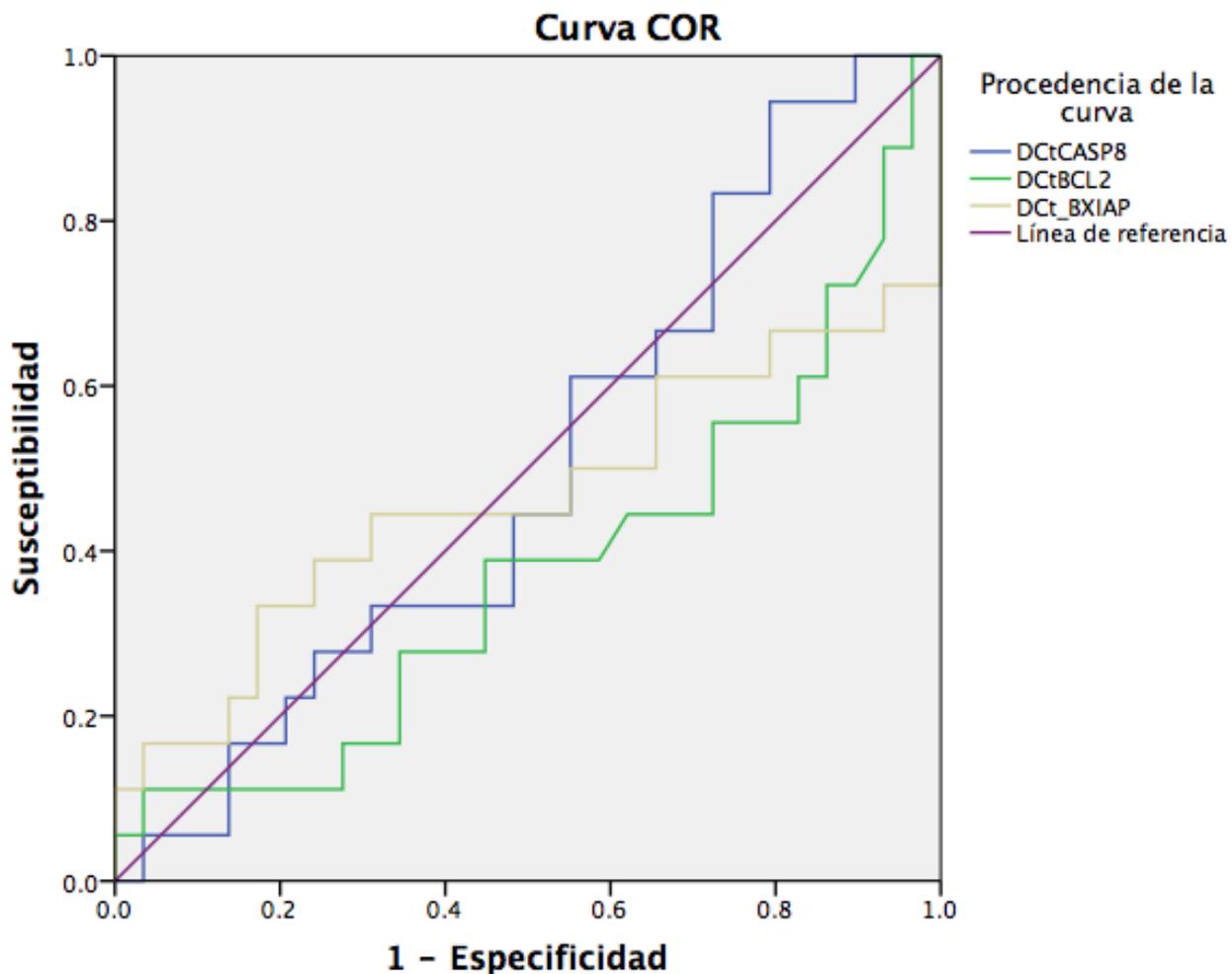
| | | | |
|-------------|-----|---------|---------|
| BCL2 | 80% | < 15.18 | > 15.18 |
| XIAP | 80% | < 18.36 | >18.36 |

Resumen del proceso de los casos

| | |
|-----------------------|----|
| Positivo ^b | 18 |
| Negativo | 29 |
| Perdido | 1 |

b. El estado real positivo es N.(corresponde a no respuesta a la prefase esteroidea)

De los 47 pacientes analizados en el estudio, el 38% (18/47) de los pacientes mostraron MALA respuesta a la Prefase esteroidea (Ventana esteroidea), mientras que el 61% (29/47) de los pacientes presentó BUENA respuesta a la prefase esteroidea.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Área bajo la curva

| Variables resultado de contraste | Área |
|----------------------------------|------|
| DCtCASP8 | .500 |
| DCtBCL2 | .376 |
| DCt_BXIAP | .464 |

*Se anexan coordenadas bajo la curva (anexo estadístico-1) para cada uno de los tres genes y cada una de las 47 muestras de pacientes analizados.

3. Análisis de Supervivencia Global

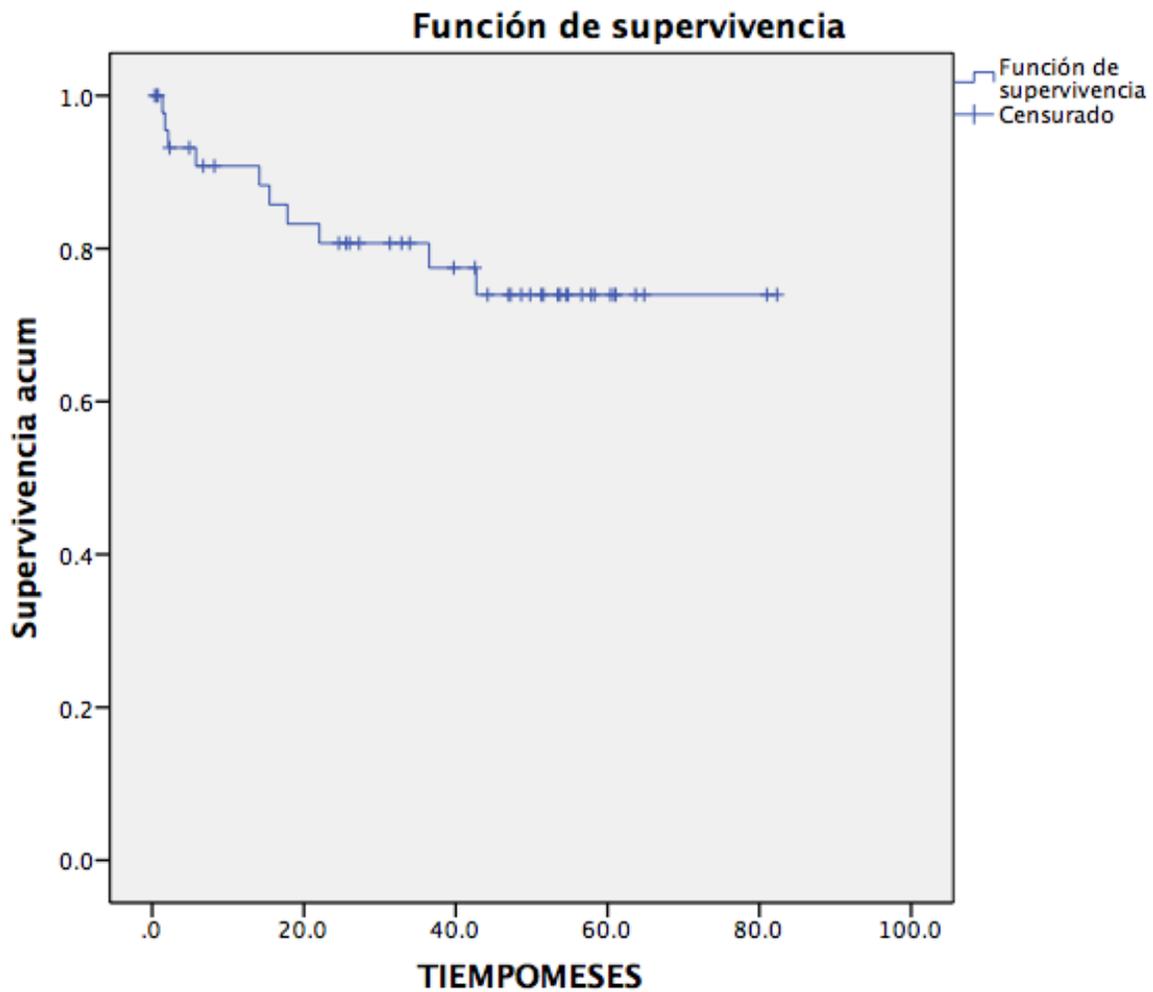
Respecto al análisis de Supervivencia Global con Kaplan Meier se encontró una supervivencia global de 78.7 % con una estimación de la media de 65.57 con límites de 56.47 a 74.68.

Resumen del procesamiento de los casos

| Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
|----------|---------------|-----------|------------|
| | | Nº | Porcentaje |
| 47 | 10 | 37 | 78.7% |

Media del tiempo de supervivencia

| Media | | | |
|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | Límite inferior | Límite superior |
| 65.579 | 4.644 | 56.478 | 74.681 |



Análisis de supervivencia para expresión de gen

De acuerdo a la expresión de CASP8:

Resumen del procesamiento de los casos

| ExpCASP8_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
|-------------|----------|---------------|-----------|------------|
| | | | Nº | Porcentaje |
| Alta | 12 | 3 | 9 | 75.0% |
| Baja | 35 | 7 | 28 | 80.0% |
| Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

Con lo anterior encontramos que el 74.4% de los pacientes mostraron subexpresión del gen CASP8 al diagnóstico, y el 25.5% de los pacientes tuvieron sobreexpresión de este gen al diagnóstico.

Medias del tiempo de supervivencia

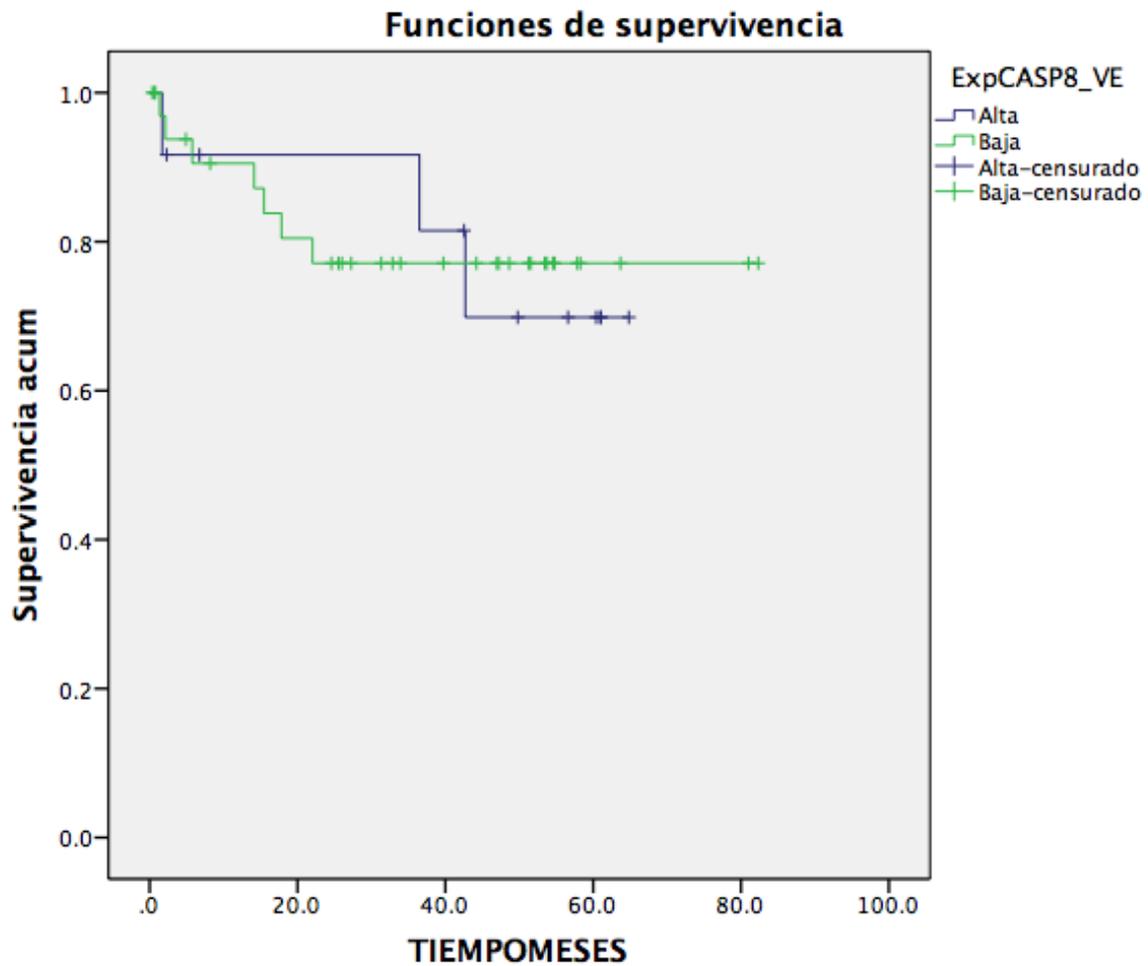
| ExpCASP8_VE | Media ^a | | | |
|-------------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Alta | 54.110 | 5.687 | 42.964 | 65.256 |
| Baja | 66.110 | 5.418 | 55.490 | 76.729 |
| Global | 65.579 | 4.644 | 56.478 | 74.681 |

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales

| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | .021 | 1 | .884 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | .019 | 1 | .890 |
| Tarone-Ware | .000 | 1 | .989 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de ExpCASP8_VE.



En el análisis de la supervivencia los valores de Chi cuadrada para la expresión de este gen con su nivel de significancia ajustado por grados de libertad no se encontró significancia estadística.

De acuerdo a la expresión de BCL2:

Resumen del procesamiento de los casos

| BCL2_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
|---------|----------|---------------|-----------|------------|
| | | | Nº | Porcentaje |
| Alta | 5 | 1 | 4 | 80.0% |
| Baja | 42 | 9 | 33 | 78.6% |
| Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

Con lo anterior encontramos que el 89% de los pacientes mostraron subexpresión del gen BCL2 al diagnóstico, y solo 5 pacientes (10.7%) tuvieron sobreexpresado este gen al diagnóstico.

Medias del tiempo de supervivencia

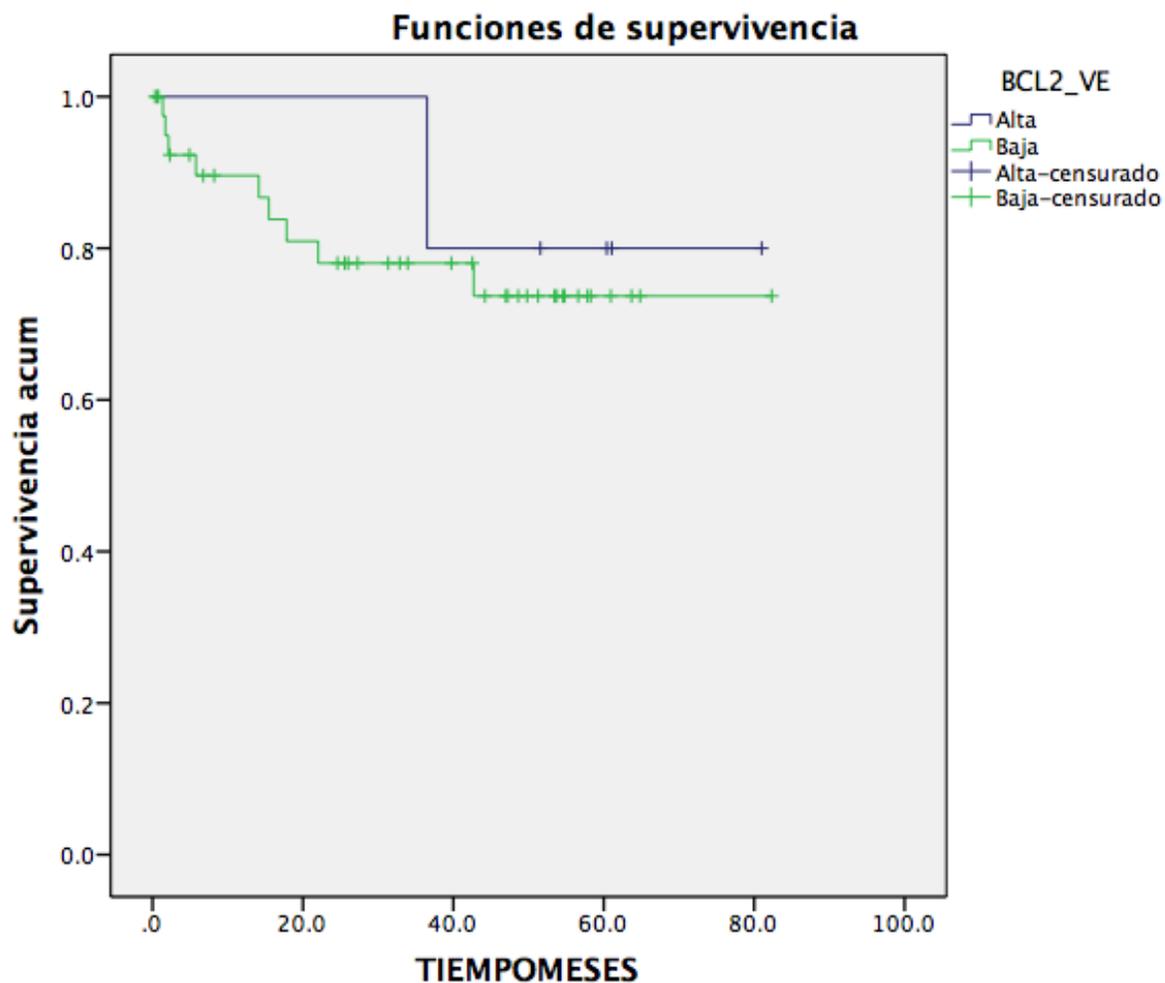
| BCL2_VE | Media ^a | | | |
|---------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Alta | 72.100 | 7.960 | 56.498 | 87.702 |
| Baja | 64.826 | 5.092 | 54.846 | 74.807 |
| Global | 65.579 | 4.644 | 56.478 | 74.681 |

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales

| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | .158 | 1 | .691 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | .383 | 1 | .536 |
| Tarone-Ware | .267 | 1 | .605 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de BCL2_VE.



En el análisis de la supervivencia los valores de Chi cuadrada para la expresión de este gen con su nivel de significancia ajustado por grados de libertad no se encontró significancia estadística.

De acuerdo a la expresión de XIAP:

Resumen del procesamiento de los casos

| XIAP_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
|---------|----------|---------------|-----------|------------|
| | | | Nº | Porcentaje |
| Alta | 3 | 2 | 1 | 33.3% |
| Baja | 44 | 8 | 36 | 81.8% |
| Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

Con lo anterior encontramos que el 93.6% de los pacientes mostraron subexpresión del gen XIAP al diagnóstico, y solo 3 pacientes (6.4%) tuvieron sobreexpresado este gen al diagnóstico.

Medias del tiempo de supervivencia

| XIAP_VE | Media ^a | | | |
|---------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Alta | 23.800 | 10.655 | 2.917 | 44.683 |
| Baja | 67.853 | 4.574 | 58.888 | 76.818 |
| Global | 65.579 | 4.644 | 56.478 | 74.681 |

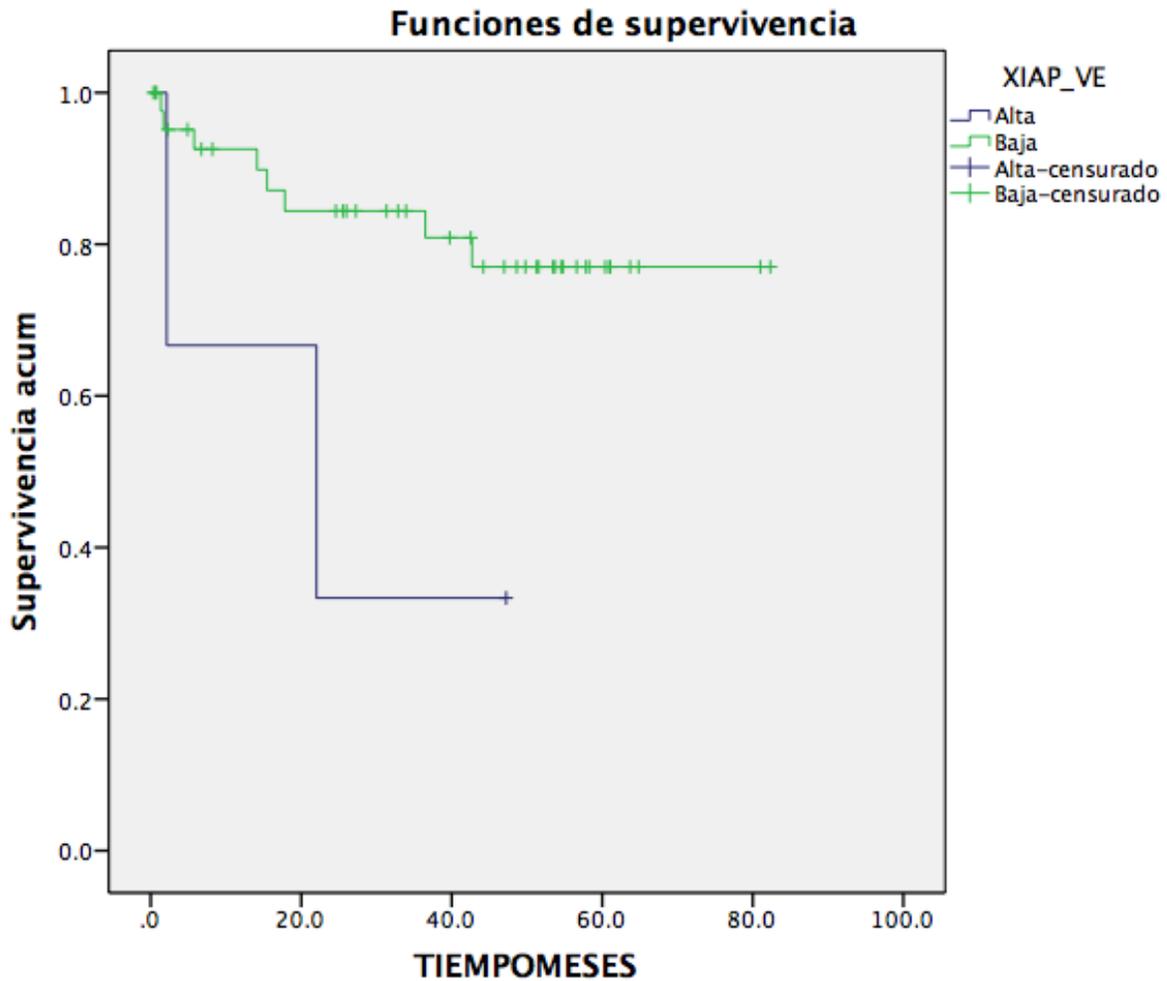
a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales

| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|-------------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 3.717 | 1 | .054 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | 3.946 | 1 | .047 |
| Tarone-Ware | 3.888 | 1 | .049 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de XIAP_VE.

En el análisis de la supervivencia los valores de Chi cuadrada para la expresión de este gen con su nivel de significancia ajustado por grados de libertad encontramos valores con significancia estadística para las pruebas de Breslow y Tarone-Ware.



La gráfica de supervivencia muestra para el grupo de pacientes con subexpresión una supervivencia de 81.8% a comparación de la supervivencia mostrada de 33.3% para el grupo de pacientes con sobreexpresión de XIAP.

Análisis de supervivencia en base a la prefase esteroidea

En base al análisis de supervivencia considerando la respuesta a la prefase esteroidea (mala vs buena) con comparaciones globales:

Del grupo de mala respuesta a la prefase esteroidea la supervivencia encontrada fue de 72.2% mientras que el grupo de pacientes con buena respuesta a la prefase esteroidea mostró una estimación de supervivencia libre de enfermedad de 82.8%. Sin mostrar en el análisis de comparaciones globales significancia estadística. (Chi cuadrada >0.05)

Resumen del procesamiento de los casos

| RespVentana | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
|-------------|----------|---------------|-----------|------------|
| | | | Nº | Porcentaje |
| N | 18 | 5 | 13 | 72.2% |
| S | 29 | 5 | 24 | 82.8% |
| Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

Medias del tiempo de supervivencia

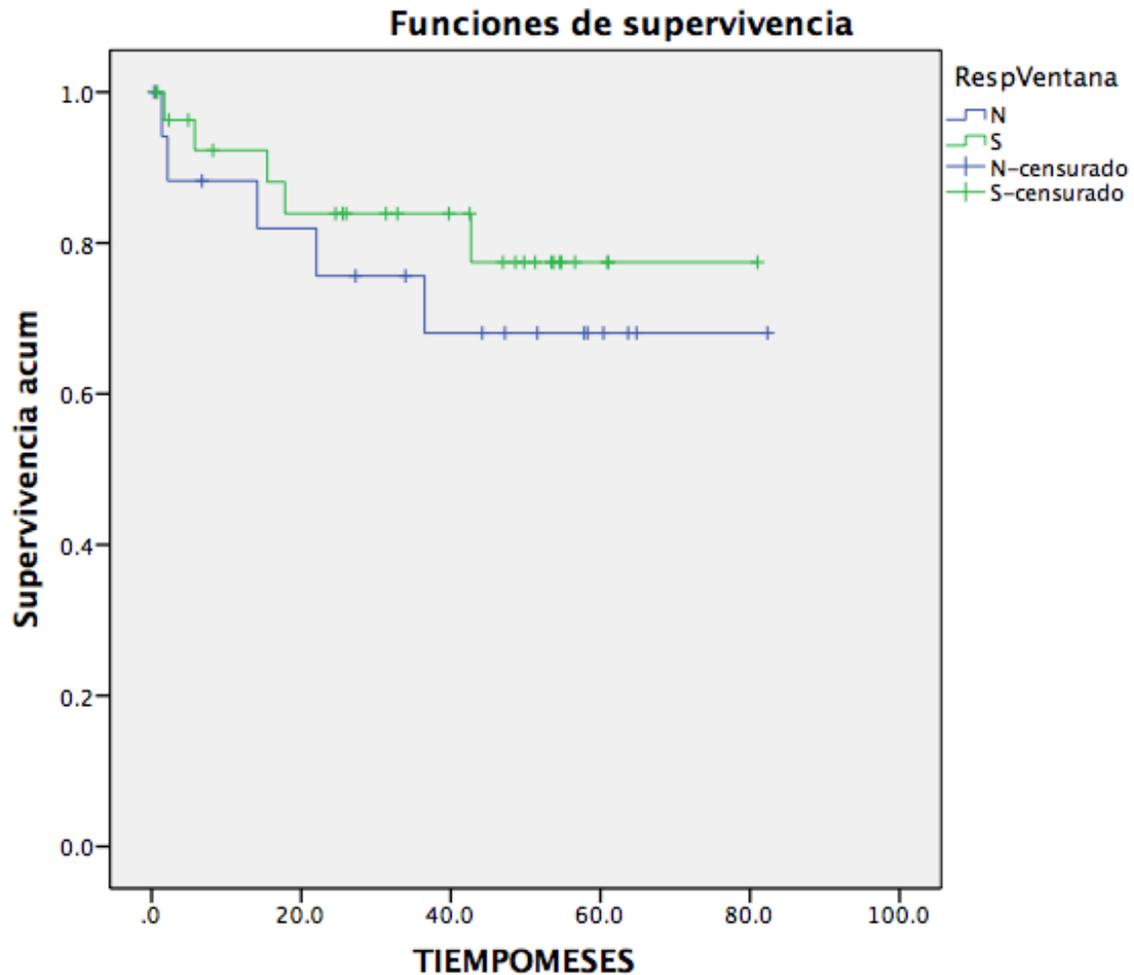
| RespVentana | Media ^a | | | |
|-------------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
| | Estimación | Error típico | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| N | 61.288 | 7.936 | 45.733 | 76.843 |
| S | 67.174 | 5.539 | 56.318 | 78.030 |
| Global | 65.579 | 4.644 | 56.478 | 74.681 |

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales

| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | .539 | 1 | .463 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | .632 | 1 | .426 |
| Tarone-Ware | .594 | 1 | .441 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de RespVentana.



Análisis de supervivencia respecto a la prefase esteroidea y gen CASP8

En base al análisis de supervivencia considerando la respuesta a la prefase esteroidea (mala vs buena respuesta a prefase esteroidea) y su asociación con la determinada expresión de gen CASP8:

- De los pacientes con buena respuesta a la prefase esteroidea el 72% (29 pacientes) mostraron SUBEXPRESION del gen CASP8, con una supervivencia del 85.7% de los pacientes
- De los pacientes con mala respuesta a la prefase esteroidea (18) el 77% de los pacientes mostraron SUBEXPRESION del gen CASP8, con una supervivencia del 71.4% de los pacientes.
- En global, la SUB EXPRESION del gen CASP8 se presentó en 35/47 pacientes del estudio (74.4%)
- Destaca que los pacientes que presentaron sobreexpresión del gen CASP8 y fueron buenos respondedores a la prefase esteroidea (2) mostraron 100% de supervivencia libre de enfermedad.

| Resumen del procesamiento de los casos | | | | | |
|--|-------------|-----------|---------------|-----------|--------------|
| RespVentana | ExpCASP8_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
| | | | | Nº | Porcentaje |
| N | Alta | 4 | 1 | 3 | 75.0% |
| | Baja | 14 | 4 | 10 | 71.4% |
| | Global | 18 | 5 | 13 | 72.2% |
| S | Alta | 8 | 2 | 6 | 75.0% |
| | Baja | 21 | 3 | 18 | 85.7% |
| | Global | 29 | 5 | 24 | 82.8% |
| Global | Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

De acuerdo a los valores de Chi cuadrada para el gen CASP8 existe significancia sin embargo al ajustarse de acuerdo a grados de libertad la significancia no resulta estadísticamente significativa

Comparaciones globales^a

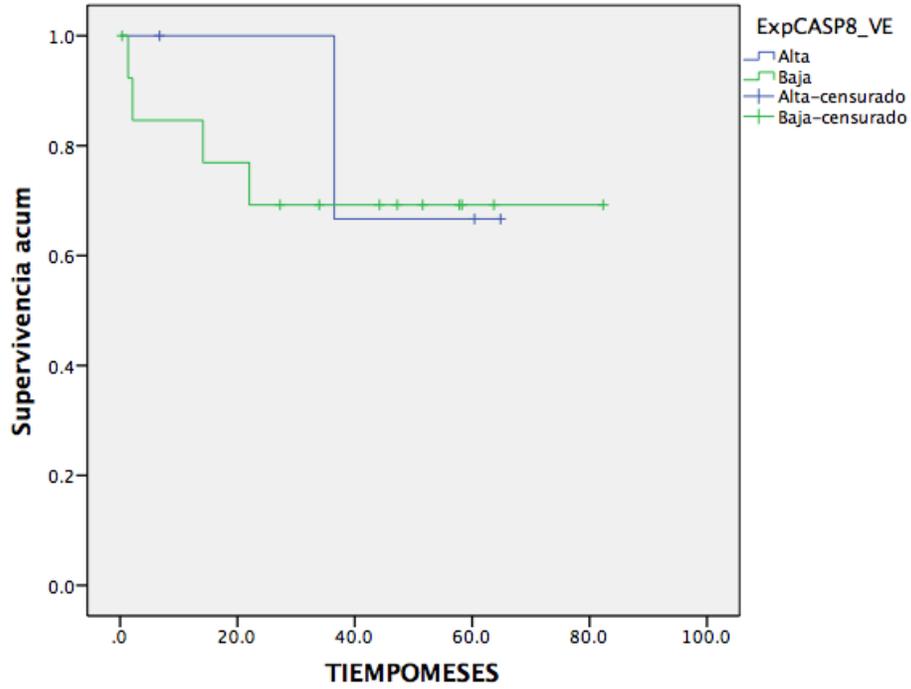
| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | .040 | 1 | .841 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | .006 | 1 | .938 |
| Tarone-Ware | .013 | 1 | .909 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de ExpCASP8_VE.^a

a. Ajustado para RespVentana.

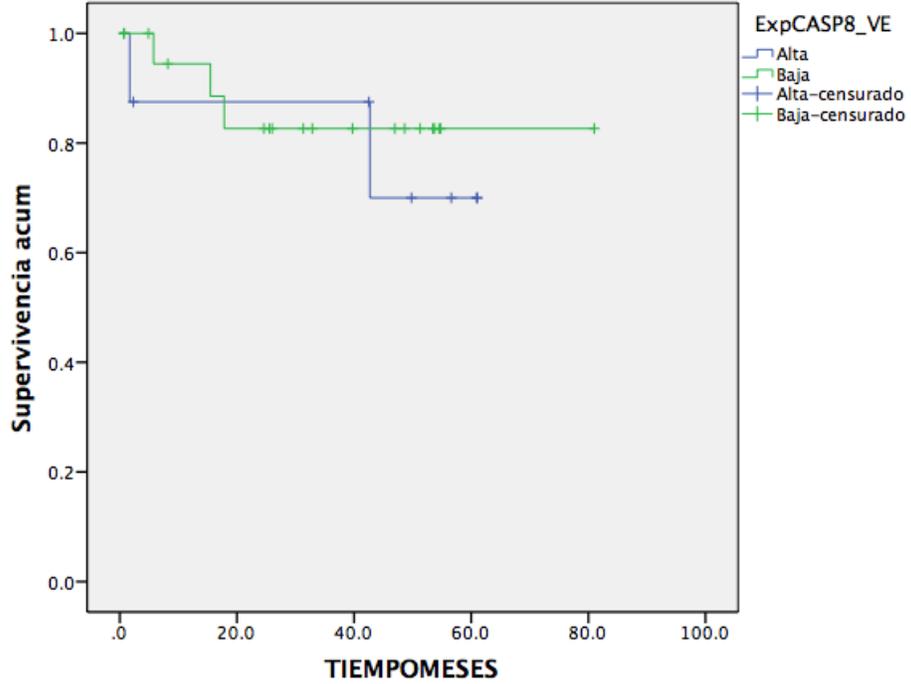
Funciones de supervivencia

RespVentana = N



Funciones de supervivencia

RespVentana = S



Análisis de supervivencia respecto a la prefase esteroidea y gen BCL2

En base al análisis de supervivencia considerando la respuesta a la prefase esteroidea (mala vs buena respuesta) y su asociación con la determinada expresión de gen BCL2:

- De los pacientes con buena respuesta a la prefase esteroidea (29) el 93% de los pacientes mostraron SUBEXPRESION del gen BCL2, con una supervivencia del 81.5% de los pacientes
- En global, la SUB EXPRESION del gen BCL2 se presentó en 42/47 pacientes del estudio (89.3%)
- Destaca que los pacientes que presentaron sobreexpresión del gen BCL2 y fueron buenos respondedores a la prefase esteroidea (2) mostraron 100% de supervivencia libre de enfermedad.

| Resumen del procesamiento de los casos | | | | | |
|--|-------------|-----------|---------------|-----------|--------------|
| RespVentana | BCL2_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
| | | | | Nº | Porcentaje |
| N | Alta | 3 | 1 | 2 | 66.7% |
| | Baja | 15 | 4 | 11 | 73.3% |
| | Global | 18 | 5 | 13 | 72.2% |
| S | Alta | 2 | 0 | 2 | 100.0% |
| | Baja | 27 | 5 | 22 | 81.5% |
| | Global | 29 | 5 | 24 | 82.8% |
| Global | Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

No se observaron diferencias significativas en el análisis de expresión génica de BCL2 respecto a la prefase esteroidea.

Comparaciones globales^a

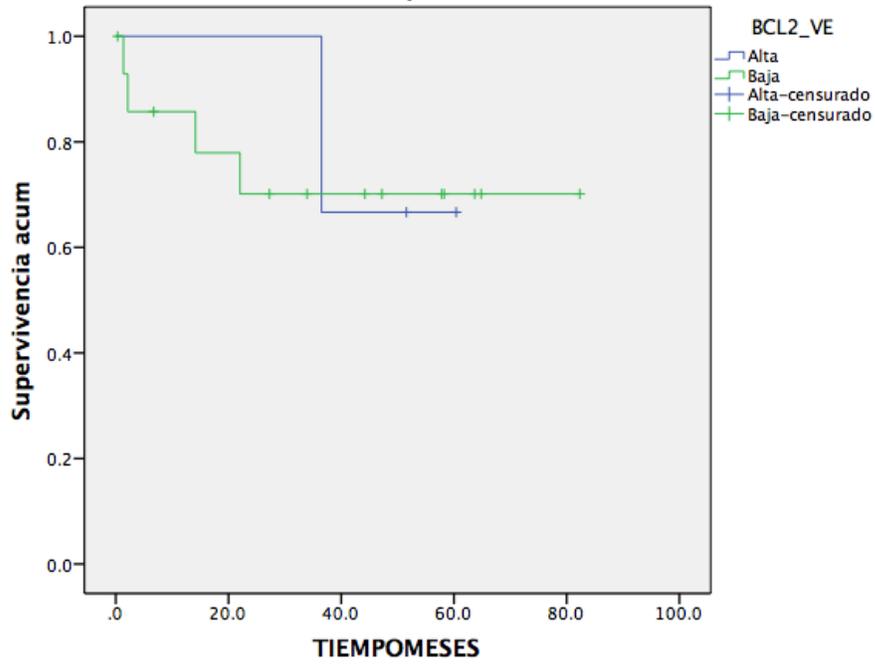
| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
|--------------------------------|--------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | .283 | 1 | .594 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | .627 | 1 | .429 |
| Tarone-Ware | .467 | 1 | .494 |

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de BCL2_VE.^a

a. Ajustado para RespVentana.

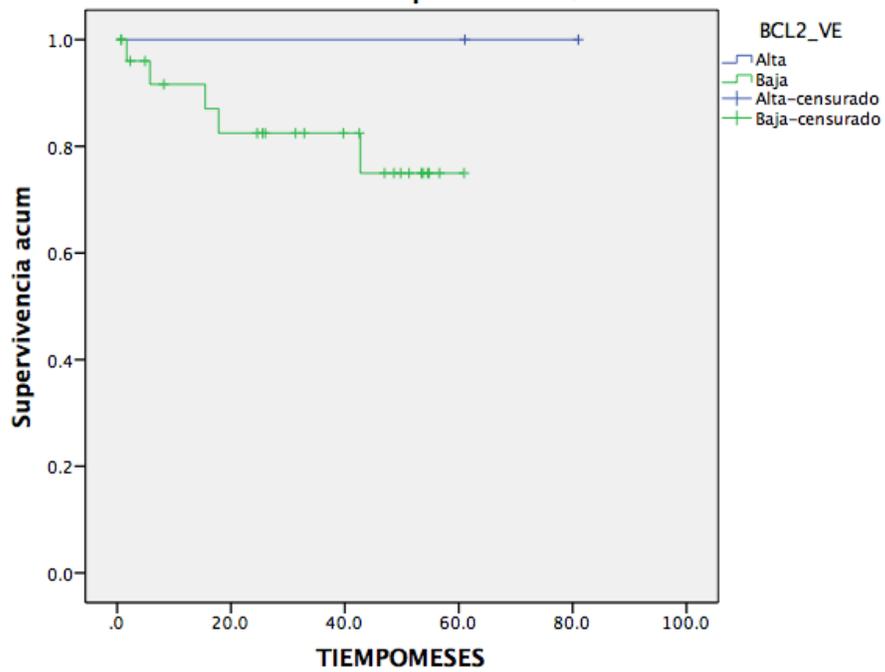
Funciones de supervivencia

RespVentana = N



Funciones de supervivencia

RespVentana = S



Análisis de supervivencia respecto a la prefase esteroidea y gen XIAP:

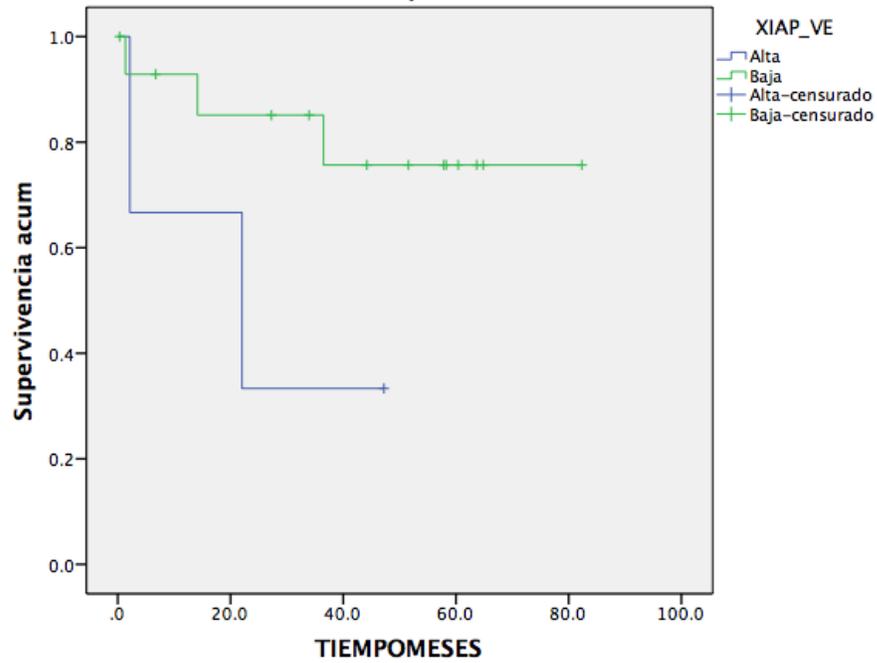
En base al análisis de supervivencia considerando la respuesta a la prefase esteroidea (mala vs buena respuesta a prefase esteroidea) y su asociación con la determinada expresión de gen XIAP:

- De los pacientes con buena respuesta a la prefase esteroidea (29) el 100% de los pacientes mostraron SUBEXPRESION del gen XIAP, con una supervivencia del 82.8% de los pacientes
- De los pacientes con mala respuesta a la prefase esteroidea (18) el 83% de los pacientes mostraron SUBEXPRESION del gen XIAP, con una supervivencia del 80% de los pacientes.
- En global, la SUB EXPRESION del gen XIAP se presentó en 44/47 pacientes del estudio (93.6%)
- Destaca que los tres pacientes que presentaron sobreexpresión del gen XIAP tuvieron una supervivencia de tan solo el 33.3% de los pacientes que presentaron este perfil de expresión.

| Resumen del procesamiento de los casos | | | | | |
|---|---------|----------|---------------|-----------|------------|
| RespVentana | XIAP_VE | Nº total | Nº de eventos | Censurado | |
| | | | | Nº | Porcentaje |
| N | Alta | 3 | 2 | 1 | 33.3% |
| | Baja | 15 | 3 | 12 | 80.0% |
| | Global | 18 | 5 | 13 | 72.2% |
| S | Baja | 29 | 5 | 24 | 82.8% |
| | Global | 29 | 5 | 24 | 82.8% |
| Global | Global | 47 | 10 | 37 | 78.7% |

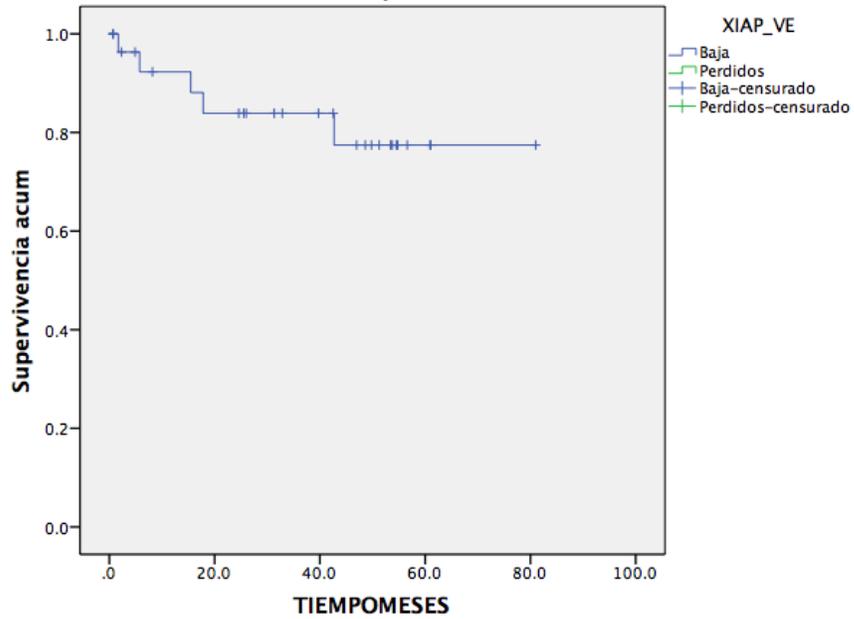
Funciones de supervivencia

RespVentana = N



Funciones de supervivencia

RespVentana = S



ANALISIS MULTIVARIANTE

Se realizó análisis por medio de modelo de regresión de Cox incluyendo inicialmente como variables a expresión de cada gen estudiado y valorar su influencia para la explicación del modelo. Fueron considerados 44 casos para el estudio y fueron excluidos 4 casos, uno de ellos con valores perdidos y 3 por ser se surcados antes del evento más temprano.

Resumen del proceso de casos

| | | N | Porcentaje |
|----------------------------------|--|----|------------|
| Casos disponibles en el análisis | Evento ^a | 10 | 20.8% |
| | Censurado | 34 | 70.8% |
| | Total | 44 | 91.7% |
| Casos excluidos | Casos con valores perdidos | 1 | 2.1% |
| | Casos con tiempo negativo | 0 | 0.0% |
| | Casos censurados antes del evento más temprano en un estrato | 3 | 6.3% |
| | Total | 4 | 8.3% |
| Total | | 48 | 100.0% |

a. Variable dependiente: TIEMPOMESES

Codificaciones de variables categóricas^{a,c,d}

| | | Frecuencia | (1) |
|-----------------------|------|------------|-----|
| CASP8_VE ^b | Alta | 12 | 1 |
| | Baja | 35 | 0 |
| BCL2_VE ^b | Alta | 5 | 1 |
| | Baja | 42 | 0 |
| XIAP_VE ^b | Alta | 3 | 1 |
| | Baja | 44 | 0 |

a. Variable de categoría: CASP8_VE (ExpCASP8_VE)

b. Codificación de parámetros de indicador

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo^a

| -2 log de la verosimilitud | Global (puntuación) | | | Cambio desde el paso anterior | | | Cambio desde el bloque anterior | | |
|----------------------------|---------------------|----|------|-------------------------------|----|------|---------------------------------|----|------|
| | Chi-cuadrado | gl | Sig. | Chi-cuadrado | gl | Sig. | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
| 68.126 | 4.031 | 3 | .258 | 2.711 | 3 | .438 | 2.711 | 3 | .438 |

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

c. Variable de categoría: BCL2_VE (BCL2_VE)

d. Variable de categoría: XIAP_VE (XIAP_VE)

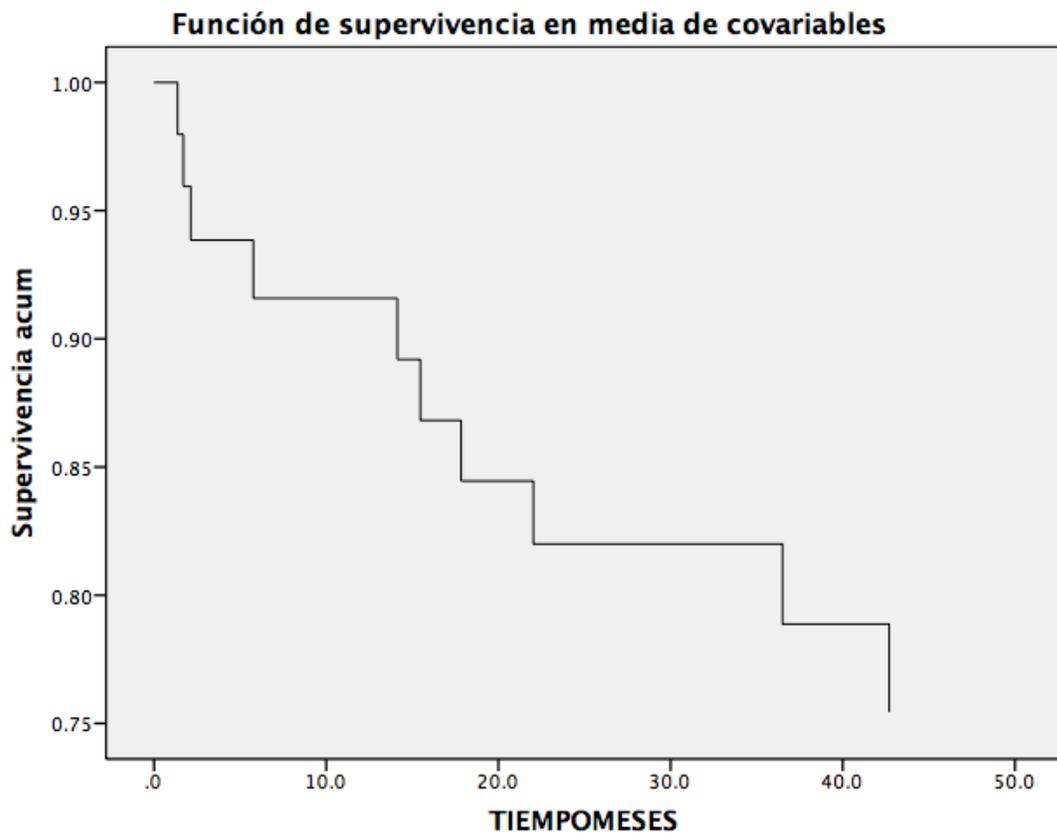
Lo resultante en el análisis de regresión de Cox se reporta sin significado estadístico una vez que se ajusta el valor de B de cada gen de acuerdo a los grados de libertad, siendo la expresión del gen XIAP el más cercano a significancia con un valor de 0.075. La sobreexpresión del gen XIAP demuestra 1.4 veces más riesgo de morir.

Variabes en la ecuación

| | B | ET | Wald | gl | Sig. | Exp(B) |
|----------|-------|-------|-------|----|------|--------|
| CASP8_VE | .425 | .754 | .318 | 1 | .573 | 1.530 |
| BCL2_VE | -.386 | 1.103 | .123 | 1 | .726 | .680 |
| XIAP_VE | 1.498 | .841 | 3.174 | 1 | .075 | 4.472 |

Medias de las covariables

| | Media |
|----------|-------|
| CASP8_VE | .273 |
| BCL2_VE | .114 |
| XIAP_VE | .068 |



MODELO DE REGRESION DE COX

Se realizó análisis multivariante por medio de modelo de regresión de Cox incluyendo como variables a expresión de cada gen estudiado, la respuesta a la prefase esteroidea, respuesta a la inducción a la remisión y la edad, y así valorar su influencia para la explicación del modelo. Fueron considerados 44 casos para el estudio y 3 casos excluidos.

Resumen del proceso de casos

| | | N | Porcentaje |
|----------------------------------|--|----|------------|
| Casos disponibles en el análisis | Evento ^a | 10 | 20.8% |
| | Censurado | 34 | 70.8% |
| | Total | 44 | 91.7% |
| Casos excluidos | Casos con valores perdidos | 1 | 2.1% |
| | Casos con tiempo negativo | 0 | 0.0% |
| | Casos censurados antes del evento más temprano en un estrato | 3 | 6.3% |
| | Total | 4 | 8.3% |
| Total | | 48 | 100.0% |

a. Variable dependiente: TIEMPOMESES

Codificaciones de variables categóricas^{a,c,d,e,f}

| | | Frecuencia | (1) |
|--------------------------|------|------------|-----|
| RespVentana ^b | N | 18 | 1 |
| | S | 29 | 0 |
| RespIR ^b | N | 6 | 1 |
| | S | 41 | 0 |
| CASP8_VE ^b | Alta | 12 | 1 |
| | Baja | 35 | 0 |
| BCL2_VE ^b | Alta | 5 | 1 |
| | Baja | 42 | 0 |
| XIAP_VE ^b | Alta | 3 | 1 |
| | Baja | 44 | 0 |

a. Variable de categoría: RespVentana

b. Codificación de parámetros de indicador

c. Variable de categoría: RespIR

d. Variable de categoría: CASP8_VE (ExpCASP8_VE)

e. Variable de categoría: BCL2_VE (BCL2_VE)

f. Variable de categoría: XIAP_VE (XIAP_VE)

Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo^a

| -2 log de la verosimilitud | Global (puntuación) | | | Cambio desde el paso anterior | | | Cambio desde el bloque anterior | | |
|----------------------------|---------------------|----|------|-------------------------------|----|------|---------------------------------|----|------|
| | Chi-cuadrado | gl | Sig. | Chi-cuadrado | gl | Sig. | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
| 65.316 | 7.434 | 6 | .283 | 5.521 | 6 | .479 | 5.521 | 6 | .479 |

a. Bloque inicial número 1. Método = Introducir

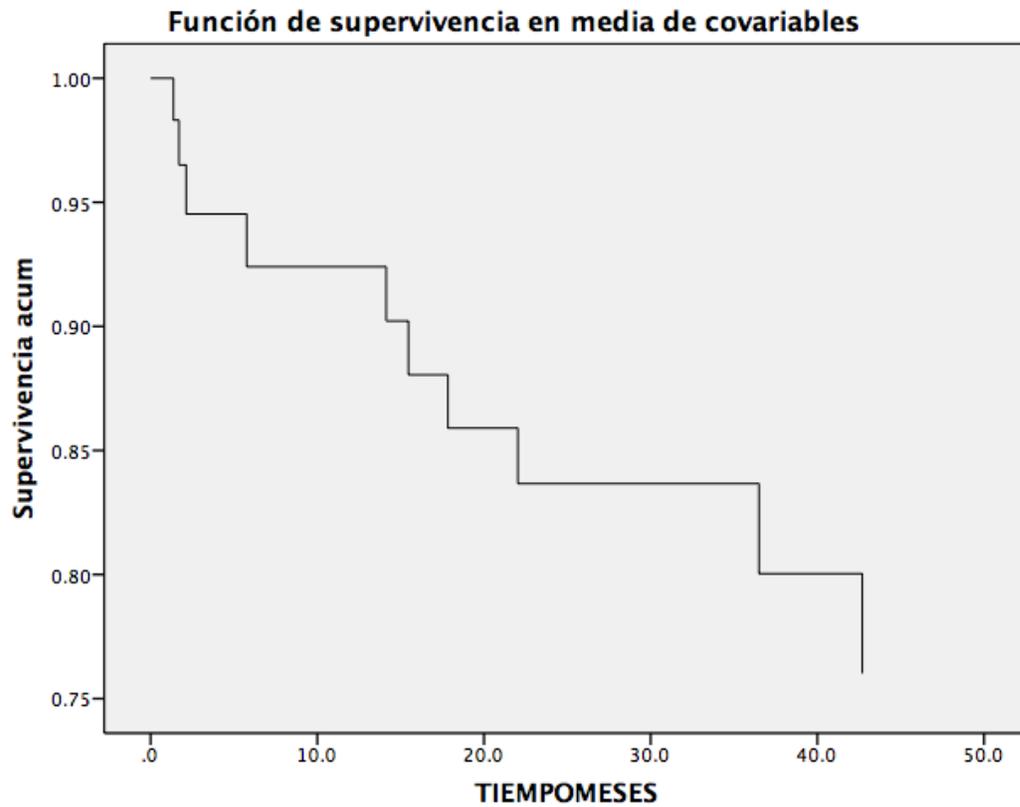
Lo resultante en el análisis de regresión de Cox se reporta sin significado estadístico una vez que se ajusta el valor de B de cada variable de acuerdo a los grados de libertad, en el caso de la expresión de XIAP tuvo un valor no significativo para la explicación del modelo (0.69). El significado de XIAP aumenta, tanto en riesgo como en la tendencia al significado estadístico. La sobreexpresión del gen XIAP demuestra 1.9 veces más riesgo de morir.

Variables en la ecuación

| | B | ET | Wald | gl | Sig. | Exp(B) |
|-------------|-------|-------|-------|----|------|--------|
| RespVentana | -.049 | .794 | .004 | 1 | .950 | .952 |
| RespIR | 1.642 | .938 | 3.066 | 1 | .080 | 5.167 |
| EdadDx | -.020 | .080 | .066 | 1 | .798 | .980 |
| CASP8_VE | .652 | .805 | .656 | 1 | .418 | 1.919 |
| BCL2_VE | -.224 | 1.178 | .036 | 1 | .849 | .799 |
| XIAP_VE | 1.917 | 1.055 | 3.302 | 1 | .069 | 6.799 |

Medias de las covariables

| | Media |
|-------------|-------|
| RespVentana | .386 |
| RespIR | .114 |
| EdadDx | 6.586 |
| CASP8_VE | .273 |
| BCL2_VE | .114 |
| XIAP_VE | .068 |



En conclusión del análisis multivariante realizado por medio de un modelo de regresión de Cox, no se encontró una variable estadísticamente significativa que explique el comportamiento de los resultados.

Análisis de expresión de gen asociado a supervivencia

| Expresión de CASP8 | VIVO | MUERTO |
|--------------------|------|--------|
| SobreCASP8 | 10 | 3 |
| SubCASP8 | 27 | 7 |

| Expresión de BCL2 | VIVO | MUERTO |
|-------------------|------|--------|
| SobreBCL2 | 4 | 1 |
| SubBCL2 | 33 | 9 |

| Expresión de XIAP | VIVO | MUERTO |
|-------------------|------|--------|
| SobreXIAP | 1 | 2 |
| SubXIAP | 36 | 8 |

- En general observamos que la subexpresión génica es más común en toda la población estudiada, sin embargo, una tendencia respecto a la función biológica de cada gen ha sido observada y se describe a continuación.
- En los pacientes vivos el gen con mayor sobreexpresión fue CASP8, lo cual concuerda en la literatura internacional al ser conocido como un proapoptico que al sobreexpresarse inducirá una mayor muerte celular de la estirpe leucémica.
- A su vez, este mismo grupo de pacientes que muestra mayor supervivencia, presentan la mayor prevalencia de subexpresión de los genes BCL2 y XIAP en comparación con el gen CASP8. Lo cual también responde a la lógica en función biológica de ambos genes que son antiapopticos, por tanto que al ser subexpresados permitirá una mayor presencia de muerte celular programada.
- Por lo anterior podemos concluir que el patron de expresión asociado con una mayor supervivencia sería: **sobre expresión de CASP8 con sub expresión de BCL2 y XIAP.**

Análisis de perfil de expresión asociado a supervivencia

Con la intención de establecer el perfil de expresión más observado en nuestra muestra estudiada para su asociación con la respuesta en la supervivencia establecimos los perfiles de expresión génica presentados al diagnóstico de cada paciente. Detectamos cinco posibles combinaciones

PERFIL DE EXPRESION GENICA PROPUESTO COMO FACTOR PRONOSTICO EN LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA EN NIÑOS

1. SubCASP8+SubBCL2+SobreXIAP = 3
2. SubCASP8 + SobreBCL2 + SubXIAP = 2
3. SubCASP8 + SubBCL2 + SubXIAP = 30
4. SobreCASP8 + SobreBCL2 + SubXIAP = 3
5. SobreCASP8 + SubBCL2 + SubXIAP = 9

| COMBINACION | VIVO | MUERTO |
|-------------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | 2 |
| 2 | 2 | 0 |
| 3 | 25 | 5 |
| 4 | 2 | 1 |
| 5 | 7 | 2 |
| | 37 | 10 |

- El perfil de expresión más prevalente al diagnóstico de los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica en nuestra población estudiada fue la Subexpresión Caspasa8/Subexpresión BCL2/Subexpresión XIAP encontrada en 30 casos, tanto para el grupo de vivo y muerto (vivo=67.5%, muerto=50%).
- A destacar lo siguiente, el Segundo perfil de expresión más observado en nuestra población fue la Sobreexpresión CASP8 + Subexpresión BCL2 + Subexpresión XIAP, el cual fue claramente detectado más en el grupo de pacientes vivos y con diferencia clara a favor de pacientes vivos vs muertos en comparación con otras combinaciones, lo que lleva a sugerir que este perfil de expresión podría asociarse con mayor supervivencia.

DISCUSION

La Leucemia Aguda Linfoblástica en el paciente pediátrico ha presentado importantes avances en la supervivencia libre de enfermedad en las últimas tres décadas, considerando que los factores que han determinado este satisfactorio cambio han ido evolucionando a lo largo de este tiempo.

Inicialmente los criterios clínicos considerados como edad y cuenta leucocitaria al momento del diagnóstico de la enfermedad, género, presencia de enfermedad leucémica mediastinal o visceral masiva al diagnóstico entre otros fueron de los más importantes para asignar el riesgo de los pacientes a falla de tratamiento y por ende a disminución en la supervivencia.

Actualmente existe la postura e interés internacional en demostrar que el mayor factor determinante del comportamiento de la leucemia aguda linfoblástica estriba más en la capacidad propia de cada padecimiento para mostrar resistencia a determinados fármacos. A su vez, esta resistencia parece ser determinada por la expresión de diferentes genes relacionados a mecanismo de acción de algunos fármacos, entre ellos los glucocorticoides que es el agente terapéutico con mayor capacidad antineoplásica por sí solo.

El objetivo de nuestro estudio fue identificar un perfil de expresión de genes involucrados en la respuesta a la prefase esteroidea, considerado éste como uno dentro de los factores moleculares pronósticos que en la actualidad se consideran más importantes por su impacto en la supervivencia de los pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica.

El desarrollo de una alteración en el proceso de apoptosis en células leucémicas es uno de los principales factores que podría influir en la respuesta terapéutica. Dos de los genes involucrados en el proceso de apoptosis BCL2 y CASPASA8 han sido estudiados en perfiles de expresión para apoyar la importancia de éstos en la evolución terapéutica de leucemia aguda linfoblástica.

Jiao y colaboradores encontraron una sub expresión del gen CASPASA asociado a una pobre supervivencia libre de enfermedad al comparar con la respuesta al tratamiento al final de la inducción en una muestra de 39 pacientes y posteriormente en una cohorte con mayor cantidad de pacientes. Sin embargo este patrón de expresión de este gen ha mostrado controversial impacto, Yang y colaboradores no lograron demostrar la influencia de algún patrón de la expresión de CASPASA en la respuesta al tratamiento con esteroides al haber estudiado tres genes involucrados en el fenómeno de apoptosis; mientras que Flotho y colaboradores encontraron que la sub expresión de este gen predijo una supervivencia libre de enfermedad más baja y por ende más probabilidades de recaída en futuro ($p=0.02$ y $p=0.01$ respectivamente).

En la intención de definir un papel más claro del comportamiento de CASPASA, en nuestro estudio no logramos comprobar la influencia estadísticamente significativa de su expresión respecto a la respuesta a la prefase esteroidea.

Encontramos como patrón de expresión, que la sub expresión del gen CASPASA fue la más observada en la población estudiada (74% de los pacientes), a su vez asociado a una supervivencia mayor a la global del estudio (78.7%) y al promedio nacional reportada de 70%.

E incluso en relación con la respuesta a la prefase esteroidea, un indicador pronóstico considerado a nivel mundial, en nuestro estudio se logró identificar una tendencia más clara al respecto del beneficio de la sub expresión de CASPASA8 al ser asociado a buena respuesta a la prefase esteroidea, se encontró en el mayor número de casos de nuestro estudio (21/47 pacientes) y alcanzó la mayor supervivencia reportada al analizar la expresión de este gen en relación con la prefase esteroidea que fue de 85.7%.

Lo anterior habiendo perdido significado estadístico posterior al ajuste de acuerdo a grados de libertad, lo cual consideramos posiblemente un efecto del corto tiempo de análisis del estudio con posibles datos además de clínicamente significativos de manera estadística al tener un seguimiento de la muestra.

De acuerdo a la expresión del gen BCL2, un gen anti apoptoico, ya estudiado en la biología molecular de la leucemia aguda linfoblástica en niños ha revelado un papel destacado como influyente en la respuesta al tratamiento con glucocorticoides, investigadores alemanes publicaron la asociación estadísticamente significativa de la sobre expresión de BCL2 con buena respuesta a la prednisona ($p=0.002$), como único factor determinante significativo en su estudio, habiendo además analizado la expresión de otros genes y la función de la proteína sin haber significado estadístico.

Sin embargo la mayoría de los estudios que analizan la asociación de expresión de este gen con la respuesta esteroidea y supervivencia han demostrado que la sobre expresión de este gen antiapoptoico se relaciona con menor tasa de respuesta al esteroide y menor supervivencia de los pacientes, referido lo anterior de manera estadísticamente significativa por Yang y colaboradores.

Esto mismo evidenciado por Baghdassarian y colaboradores al evaluar el rol de BCL2 en la citotoxicidad a esteroides encontraron que pacientes con expresión incrementada es asociada a pobre respuesta al tratamiento con esteroides en niños con leucemia aguda linfoblástica. Mientras que autores asiáticos no encontraron significado estadístico al estudiar la expresión del gen BCL2 entre otros genes con la asociación de respuesta prednisona, ni efecto en la supervivencia. Según la información respecto a la influencia de este gen en la respuesta biológica al tratamiento con glucocorticoides, parece lógico inferir que al ser un gen anti apoptoico, su sub expresión en células leucémicas, éstas estarían más expuestas a muerte celular programada y por ende a una mayor remisión de la población leucémica.

En nuestro estudio, encontramos que el 89% de los pacientes mostraron subexpresión del gen BCL2 al diagnóstico, sin significado estadístico. En relación de la expresión de este gen y su asociación con la respuesta a prefase esteroidea la mayor población de nuestro estudio mostró subexpresión del gen BCL2 y en ambos patrones de respuesta a la prefase esteroidea (buena y mala) la supervivencia observada fue de 81.5% y 51.3% respectivamente. Lo que sugiere una asociación positiva entre sub expresión de este gen y buena respuesta al tratamiento.

Cabe destacar que en la población estudiada, tuvimos dos pacientes con sobre expresión de BCL2 de los cuales mostraron una supervivencia del 100%, por lo que por lo anterior no se puede establecer una asociación confiable de una posible benéfica asociación por el muy limitado número de pacientes con este comportamiento, por lo que podemos concluir que la mayor asociación de la respuesta a la prefase esteroidea a una determinada expresión de este gen sería hacia la subexpresión y con un impacto favorable en la supervivencia, lo cual es lo más escrito en la literatura internacional.

El Gen XIAP codifica una proteína que inhibe directamente el fenómeno de apoptosis, a través de la regulación negativa de al menos dos enzimas relacionadas con apoptosis (caspasa 3 y caspasa 7). Hundsdoerfer y colaboradores recientemente investigaron la actividad transcripcional del gen en el fundamento que la sobreexpresión de este gen se relaciona con Resistencia a la quimioterapia. Estos mismos autores reportaron que la expresión incrementada de XIAP correlacionó con pobre respuesta a la prefase esteroidea ($p=0.005$) sugiriendo que la inhibición de XIAP podría considerarse como una prometedora intervención terapéutica para alcanzar mayor apoptosis de células leucémicas y por ende mayor remisión de la enfermedad.

En nuestro estudio, el 93.6% de los pacientes mostraron sub expresión del gen XIAP al diagnóstico de la enfermedad, con una supervivencia de 81.8%, mayor a la global del estudio, así como a la reportada a nivel nacional. Al analizar la asociación del patron de sub expresión de XIAP con la supervivencia fue de estadísticamente significativo ($p=0.04$)

La evidencia de una mayor respuesta al tratamiento y supervivencia libre de enfermedad al mostrar una sub expresión de este gen, se observe al encontrar que todos los pacientes con Buena respuesta a la prefase esteroidea tuvieron expresión disminuida de XIAP, y a su vez con una supervivencia de 82.8%, también mayor a la global.

En el grupo de pacientes con mala respuesta a la prefase esteroidea predominó la subexpresión igualmente (83% de los pacientes) con una supervivencia libre de enfermedad también mayor (80%) a la global.

En el escaso grupo de pacientes con mala respuesta a la prefase esteroidea que presentaron sobre expresión de XIAP tuvo una supervivencia libre de enfermedad mucho más pobre de 33.3%.

Aunque la tasa de cura de los niños con LAL es aproximadamente de 80% lo referido en países de primer mundo y menor en países en vías de desarrollo, muchos pacientes no logran la curación completa actualmente. La Resistencia a medicamentos constituye una causa importante de falla al tratamiento.

Sin duda consideramos una limitante de nuestro estudio el tamaño de la muestra estudiada así como el seguimiento en tiempo de estos pacientes que sugerimos podría detectarse una asociación más sólida estadísticamente al lograr un mayor tiempo de seguimiento.

La influencia de diversos genes y su expresión en la respuesta de los pacientes al esteroide en leucemia aguda linfoblástica es aún controversial, sin embargo en nuestro estudio podemos concluir que la sub expresión del gen XIAP se asocia estadísticamente significativo con respuesta favorable al tratamiento así como un impacto positivo en la supervivencia libre de enfermedad de estos pacientes.

CONCLUSIÓN

- El perfil de expresión génica asociado, de acuerdo a nuestros resultados, a mejor respuesta a tratamiento y por ende mayor supervivencia libre de enfermedad es la sobre expresión de gen Caspasa 8 con subexpresión de BCL2 y XIAP.
- La sobre expresión del gen XIAP al diagnóstico de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica parece asociarse de manera independiente y estadísticamente significativa con menor supervivencia libre de enfermedad.
- Se requieren de estudios con mayor número de pacientes y seguimiento a largo plazo para demostrar lo propuesto en este estudio.

REFERENCIAS

1. CHILDHOOD LEUKEMIAS ED. CHING HON PUI CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS 2006. PÁG. 3
2. BELSON M., KINGSLEY B., HOLMES A. RISK FACTORS FOR ACUTE LEUKEMIA IN CHILDREN: A REVIEW. ENVIRON HEALTH PERSPECT 2007 (115):138–145
3. LASSALETTA AA. LEUCEMIAS. LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA. PEDIATR INTEGRAL 2004;VIII(5):435-442
4. MEJÍA-ARANGURÉ J., FAJARDO-GUTIÉRREZ A, BERNÁLDEZ-RÍOS R, PAREDES-AGUILERA R, FLORES-AGUILAR H, MARTÍNEZ-GARCÍA M. INCIDENCIA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO, DE 1982 A 1991. SALUD PUBLICA MEX. 2000, 42:431-437.
5. JUÁREZ-OCAÑA S., GONZÁLEZ-MIRANDA G., MEJÍA-ARANGURÉ J., RENDÓN-MACÍAS M., MARTÍNEZ-GARCÍA M., FAJARDO-GUTIÉRREZ A. FREQUENCY OF CÁNCER IN CHILDREN RESIDING IN MÉXICO CITY AND TREATED IN THE HOSPITALS OF THE INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (1996–2001). BMC CÁNCER 2004, 4:50.
6. CUEVAS-URIÓSTEGUI M., VILLASÍS-KEEVER M., FAJARDO-GUTIÉRREZ A. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN ADOLESCENTES. SALUD PUBLICA MEX 2003, 45 SUPL 1:S115-S123.
7. KADAN-LOTTICK N., NESS K., BHATIA S., GURNEY J. SURVIVAL VARIABILITY BY RACE AND ETHNICITY IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. JAMA 2003, 290:2061-2063
8. PUI CH, EVANS WE. TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. N. ENG J MED 2006, 354 (2):166-178
9. SCHRAPPE M ET AL. LONG TERM RESULTS OF LARGE PROSPECTIVE TRIALS IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. LEUKEMIA 2000; 14(12):2193-2194
10. PIETERS R. CARROLL WL. BIOLOGY AND TREATMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. PEDIATR CLIN N AM 55 (2008) 1–20
11. BURCHENAL JH, KARNOFSKY DA, KINGSLEY-PILLERS EM, ET AL. THE EFFECTS OF THE FOLIC ACID ANTAGONISTS AND 2,6-DIAMINOPURINE ON NEOPLASTIC DISEASE, WITH SPECIAL REFERENCE TO ACUTE LEUKEMIA. CANCER 1951;4(3):549–69.
12. AUR RJ. SUCCESSFUL REMISSION INDUCTION IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AT HIGH RISK FOR TREATMENT FAILURE. CANCER 1971; 27(6):1332–6.
13. ARICO M ET AL. OUTCOME OF TREATMENT IN CHILDREN WITH PHILADELPHIA CHROMOSOME-POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. N ENGL J MED 2000;342(14):998–1006.
14. PUI CH, ET AL. OUTCOME OF TREATMENT IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA WITH REARRANGEMENTS OF THE 11Q23 CHROMOSOMAL REGION. LANCET 2002;359(9321):1909–15.
15. GLEISSNER B ET AL. CD 10-NEGATIVE PRE-B ACUTE LYMPHO- BLASTIC LEUKEMIA (ALL): A DISTINCT HIGH-RISK SUBGROUP OF ADULT ALL ASSOCIATED WITH A HIGH FREQUENCY OF MLL ABERRATIONS. RESULTS OF

- THE GERMAN MULTICENTER TRIALS FOR ADULT ALL (GMALL). *BLOOD* 2005;106(13):4054–6.
16. PUI CH, GAYNON PS, BOYETT JM, ET AL. OUTCOME OF TREATMENT IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA WITH REARRANGEMENTS OF THE 11Q23 CHROMOSOMAL REGION. *LANCET* 2002;359:1909–15.
 17. KRIVTSOV AV, ARMSTRONG SA. MLL TRANSLOCATIONS, HISTONE MODIFICATIONS AND LEUKAEMIA STEM-CELL DEVELOPMENT. *NAT REV CANCER* 2007;7:823–33
 18. TRICOLI JV, SEIBEL NL, BLAIR DG, ET AL. UNIQUE CHARACTERISTICS OF ADOLESCENT AND YOUNG ADULT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA, BREAST CANCER, AND COLON CANCER. *J NATL CANCER INST.* 2011;103:628–635.
 19. NACHMAN J. CLINICAL CHARACTERISTICS, BIOLOGIC FEATURES AND OUTCOME FOR YOUNG ADULT PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA. *BR J HAEMATOL.* 2005;130:166–173.
 20. PUI CH, CARROLL WL, MESHINCHI S, ET AL. BIOLOGY, RISK STRATIFICATION, AND THERAPY OF PEDIATRIC ACUTE LEUKEMIAS: AN UPDATE. *J CLIN ONCOL.* 2011;29:551–565.
 21. RUBNITZ JE, WICHLAN D, DEVIDAS M, ET AL. PROSPECTIVE ANALYSIS OF TEL GENE REARRANGEMENTS IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A CHILDREN’S ONCOLOGY GROUP STUDY. *J CLIN ONCOL.* 2008;26:2186–2191
 22. MULLIGHAN CG, WILLMAN CHL ADVANCES IN THE BIOLOGY OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA FROM GENOMICS TO THE CLINIC. *JOURNAL OF ADOLESC AND YOUNG ADULT ONCOLOGY* 2011(1): 77-86
 23. BARRY E, DEANGELO DJ, NEUBERG D, ET AL. FAVORABLE OUTCOME FOR ADOLESCENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATED ON DANA FARBER CANCER INSTITUTE ALL CONSORTIUM PROTOCOLS. *J CLIN ONCOL* 2007;25(7):813–9.
 24. RIBERA JM, ORIOL A. ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN ADOLESCENTS AND YOUNG ADULTS *HEMATOL ONCOL CLIN N AM* 23 (2009) 1033–1042
 25. PUI, C.-H., CHESSELLS, J. M., CAMITTA, B., ET AL. CLINICAL HETEROGENEITY IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH 11Q23 REARRANGEMENTS. *LEUKEMIA*, 2003; 17: 700–6.
 26. EGUIGUREN J., *BLOOD* 1992
 27. CHILDHOOD LEUKEMIAS. CHING-HON PUI. ED. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. PRIMERA EDICIÓN 1999, PP 439-472
 28. OTTENSMEIER C. THE CLASSIFICATION OF LYMPHOMAS AND LEUKEMIAS. *CHEM BIOL INTERACT.* 2001 JUN 1;135-136:653-64.
 29. KALEEM Z, CRAWFORD E, PATHAN MH, JASPER L, COVINSKY MA, JOHNSON LR, WHITE G. FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF ACUTE LEUKEMIAS. DIAGNOSTIC UTILITY AND CRITICAL ANALYSIS OF DATA. *ARCH PATHOL LAB MED.* 2003 JAN;127(1):42-8.
 30. CRAIG FE, FOON KA. FLOW CYTOMETRIC IMMUNOPHENOTYPING FOR HEMATOLOGIC NEOPLASMS. *BLOOD.* 2008 JAN 15
 31. LEE ST KIM HJ KIM SH DEFINING AN OPTIMAL NUMBER OF IMMUNOPHENOTYPIC MARKERS FOR LINEAGE ASSIGNMENT OF ACUTE

- LEUKEMIAS BASED ON THE EGIL SCORING SYSTEM. KOREAN J LAB MED. 2006 DEC;26(6):393-9.**
- 32. AMYLYN MD, SHUSTER J, PULLEN J, ET AL. INTENSIVE HIGH-DOSE ASPARAGINASE CONSOLIDATION IMPROVES SURVIVAL FOR PEDIATRIC PATIENTS WITH T CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND ADVANCED STAGE LYMPHOBLASTIC LYMPHOMA: A PEDIATRIC ONCOLOGY GROUP STUDY. LEUKEMIA 1999;13(3):335-42.**
 - 33. GOLDBERG JM, SILVERMAN LB, LEVY DE, ET AL. CHILDHOOD T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: THE DANA-FARBER CANCER INSTITUTE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CONSORTIUM EXPERIENCE. J CLIN ONCOL 2003;21(19):3616-22.**
 - 34. PIETERS R, DEN BOER ML, DURIAN M, ET AL. RELATION BETWEEN AGE, IMMUNOPHENOTYPE AND IN VITRO DRUG RESISTANCE IN 395 CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: IMPLICATIONS FOR TREATMENT OF INFANTS. LEUKEMIA 1998;12(9):1344-8.**
 - 35. ROTS MG, PIETERS R, PETERS GJ, ET AL. ROLE OF FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE AND FOLYLPOLYGLUTAMATE HYDROLASE IN METHOTREXATE ACCUMULATION AND POLYGLUTAMYLATION IN CHILDHOOD LEUKEMIA. BLOOD 1999;93(5):1677-83.**
 - 36. OTTMANN OG, PFEIFER H. MANAGEMENT OF PHILADELPHIA CHROMOSOME POSITIVE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (Ph ALL) HEMATOLOGY 2009 (2):371-381**
 - 37. JEHA S., PUI CH. RISK-ADAPTED TREATMENT OF PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. HEMATOL ONCOL CLIN N AM 23 (2009) 973-990**
 - 38. LANINGHAM FH. CHILDHOOD CENTRAL NERVOUS SYSTEM LEUKEMIA: HISTORICAL PERSPECTIVES, CURRENT THERAPY, AND ACUTE NEUROLOGICAL SEQUELAE NEURORADIOLOGY. 2007 NOVEMBER ; 49(11): 873-888**
 - 39. PUI CH. CARROLL WL., MESHINCHI S., ARCELI RJ. BIOLOGY, RISK STRATIFICATION, AND THERAPY OF PEDIATRIC ACUTE LEUKEMIAS: AN UPDATE. J. CLIN ONCOL 2011; 29(5):551-565**
 - 40. PUI CH. TREATMENT OF ACUTE LEUKEMIAS. ED. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. SECOND EDITION**
 - 41. RIEHM H, REITER A, SCHRAPPE M, BERTHOLD F, DOPFER R, GEREIN V, ET AL. CORTICOSTEROID-DEPENDENT REDUCTION OF LEUKOCYTE COUNT IN BLOOD AS A PROGNOSTIC FACTOR IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDHOOD (THERAPY STUDY ALL-BFM 83). KLIN PAEDIATR 1987;199:151-60.**
 - 42. DORDELMANN M ET AL. PREDNISONE RESPONSE IS THE STRONGEST PREDICTOR OF TREATMENT OUTCOME IN INFANT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD 1999;94:1209-17.**
 - 43. LILLEYMAN JS ET AL. CLEARANCE OF MARROW INFILTRATION AFTER 1 WEEK OF THERAPY FOR CHILDHOOD LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA: CLINICAL IMPORTANCE AND THE EFFECT OF DAUNORUBICIN: THE MEDICAL RESEARCH COUNCIL'S WORKING PARTY ON CHILDHOOD LEUKAEMIA. BR J HAEMATOL 1997;97:603-6.**

44. MANABE A. ET AL. SIGNIFICANCE OF THE COMPLETE CLEARANCE OF PERIPHERAL BLASTS AFTER 7 DAYS OF PREDNISOLONE TREATMENT IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: THE TOKYO CHILDRENS CANCER STUDY GROUP STUDY L99-15. HAEMATOLOGICA 2008; 93(8):1155-1160
45. LAUDET V, GRONEMEYER H. THE NUCLEAR RECEPTOR FACTS BOOK. LONDON, UNITED KINGDOM: ACADEMIC PRESS; 2002.
46. CARIO G. ET AL. INITIAL LEUKEMIC GENE EXPRESSION PROFILES OF PATIENTS WITH POOR IN VIVO PREDNISONE RESPONSE ARE SIMILAR TO THOSE OF BLASTS PERSISTING UNDER PREDNISONE TREATMENT IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. ANN HEMATOL (2008) 87:709-716
47. VAARALA MH, PORVARI KS, KYLLONEN AP, MUSTONEN MV, LUKKARINEN O, VIHKO PT. SEVERAL GENES ENCODING RIBOSOMAL PROTEINS ARE OVEREXPRESSED IN PROSTATE CANCER CELL LINES: CONFIRMATION OF L7A AND L37 OVEREXPRESSION IN PROSTATE CANCER TISSUE SAMPLES. INT J CANCER 1998;78:27-32
48. WELSH JB, ZARRINKAR PP, SAPINOSO LM, KERN SG, BEHLING CA, MONK BJ, ET AL. ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILES IN NORMAL AND NEOPLASTIC OVARIAN TISSUE SAMPLES IDENTIFIES CANDIDATE MOLECULAR MARKERS OF EPITHELIAL OVARIAN CANCER. PROC NATL ACAD SCI USA 2001;98:1176-81.
49. POGUE-GEILE K, GEISER JR, SHU M, MILLER C, WOOL IG, MEISLER AI, ET AL. RIBOSOMAL PROTEIN GENES ARE OVEREXPRESSED IN COLORECTAL CANCER: ISOLATION OF A cDNA CLONE ENCODING THE HUMAN S3 RIBOSOMAL PROTEIN. MOL CELL BIOL 1991;11:3842-9
50. YEOH EJ, ROSS ME, SHURTLEFF SA, ET AL. CLASSIFICATION, SUBTYPE DISCOVERY, AND PREDICTION OF OUTCOME IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BY GENE EXPRESSION PROFILING. CANCER CELL. 2002; 1:133-143.
51. MOOS PJ, RAETZ EA, CARLSON MA, ET AL. IDENTIFICATION OF GENE EXPRESSION PROFILES THAT SEGREGATE PATIENTS WITH CHILDHOOD LEUKEMIA. CLIN CANCER RES. 2002;8:3118-3130.
52. TSUTSUMI S, TAKETANI T, NISHIMURA K, ET AL. TWO DISTINCT GENE EXPRESSION SIGNATURES IN PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH MLL REARRANGEMENTS. CANCER RES. 2003;63:4882-4887.
53. CARIO G. ET AL. DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES DETERMINE MOLECULAR TREATMENT RESPONSE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD. 2005; 105:821-826
54. P. RHEIN ET AL. GENE EXPRESSION SHIFT TOWARDS NORMAL B CELLS, DECREASED PROLIFERATIVE CAPACITY AND DISTINCT SURFACE RECEPTORS CHARACTERIZE LEUKEMIC BLASTS PERSISTING DURING INDUCTION THERAPY IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA LEUKEMIA (2007) 21, 897-905
55. COUSTAN-SMITH E. CLINICAL RELEVANCE OF BCL-2 OVEREXPRESSION IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD. 1996; 87:1140-1146.
56. FINDLEY HW. EXPRESSION AND REGULATION OF BCL-2, BCL-XL, AND BAX CORRELATE WITH P53 STATUS AND SENSITIVITY TO APOPTOSIS IN

- CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD 1997; 8(15): 2986-2993**
- 57. LIU T. DIVERSITY OF THE APOPTOTIC RESPONSE TO CHEMOTHERAPY IN CHILDHOOD LEUKEMIA. LEUKEMIA 2002(16): 223-232**
 - 58. HOLLEMAN A. THE EXPRESSION OF 70 APOPTOSIS GENES IN RELATION TO LINEAGE, GENETIC SUBTYPE, CELLULAR DRUG RESISTANCE, AND OUTCOME IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BLOOD. 2006; 107:769-776**
 - 59. HUNSDOERFER P. ET AL. XIAP EXPRESSION IS POST-TRANSCRIPTIONALLY UPREGULATED IN CHILDHOOD ALL AND IS ASSOCIATED WITH GLUCOCORTICOID RESPONSE IN T-CELL ALL. PEDIATR BLOOD CANCER. 2010 AUG;55(2):260-6**
 - 60. FLOTHO C. ET AL. GENES CONTRIBUTING TO MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CASP8AP2. BLOOD. 2006;108(3):1050-7**
 - 61. DEEPA BHOJWANI ET AL. HIGH RISK CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. CLIN LYMPHOMA MYELOMA 2009; 9 (SUPPL 3): S222.**
 - 62. CAMPANA D. MOLECULAR DETERMINANTS OF TREATMENT RESPONSE IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. HEMATOLOGY 2008: 366-73.**
 - 63. CHIARETTI S, LI X, GENTLEMAN R, ET AL. GENE EXPRESSION PROFILE OF ADULT T-CELL ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IDENTIFIES DISTINCT SUBSETS OF PATIENTS WITH DIFFERENT RESPONSE TO THERAPY AND SURVIVAL. BLOOD. 2004;103:2771-2778.**
 - 64. CARIO G, STANULLA M, FINE BM, ET AL. DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES DETERMINE MOLECULAR TREATMENT RESPONSE IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD. 2005;105:821-826.**
 - 65. HOLLEMAN A. GENE-EXPRESSION PATTERNS IN DRUG-RESISTANT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS AND RESPONSE TO TREATMENT. N ENGL J MED. 2004;351:533-542.**
 - 66. FLOTHO C. A SET OF GENES THAT REGULATE CELL PROLIFERATION PREDICTS TREATMENT OUTCOME IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. BLOOD. 2007;110:1271-1277**
 - 67. PROTOCOLOS TÉCNICOS. CONSEJO NACIONAL PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA. 2010**
 - 68. THE CALCULATIONS ARE THE CUSTOMARY ONES BASED ON THE NORMAL APPROXIMATION TO THE BINOMIAL DISTRIBUTION. SEE FOR EXAMPLE HYPOTHESIS TESTING: CATEGORICAL DATA - ESTIMATION OF SAMPLE SIZE AND POWER FOR COMPARING TWO BINOMIAL PROPORTIONS IN BERNARD ROSNER'S FUNDAMENTALS OF BIostatISTICS.**
 - 69. LWANGA SK, LEMESHOW S. SAMPLE SIZE DETERMINATION IN HEALTH STUDIES. A PRACTICAL MANUAL. GENEVA: WORLD HEALTH ORGANISATION, 1991.**

ANEXO 1. GENES CANDIDATOS ASOCIADOS A PREFASE ESTEROIDEA

Gen Proteína 2 asociada a Caspasa 8

Nombres alternativos: Proteína mayor asociada a FLICE (FLASH)

Símbolo: CASP8AP2

Localización citogenética: 6q15

Coordenadas genómicas: 6:90,539,618 - 90,584,154

Clonación

El gen CASP8AP2, el cual fue llamado inicialmente FLASH, fue clonado de una línea celular de ratón con linfoma de células T. La proteína codificada por este gen consta de 1962 aminoácidos y con una masa molecular calculada de 219.1 kD. Ha sido identificada su mayor expresión en corazón, cerebro, timo, pulmón, testículos y bazo en estudios en modelos animales.

Posteriormente, esta proteína fue clonada de tejido humano identificando una extensión de 1982 aminoácidos, compartiendo el 66% de identidad con el gen clonado de ratón, caracterizándose por la ausencia de la región CED4 encontrada en ratón.

Función génica

Usando análisis por medio de luciferasa, se ha mostrado que la inhibición de la expresión de FLASH suprimió la activación de la subunidad 1 del factor nuclear kappa (NFKB) inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) en células renales embrionarias. El efecto contrario en expresión o sobreexpresión de FLASH, incremento de activación de NFKB explicado por la oligomerización de un dominio llamado NAD (dominio de activación de NFKB). Este mecanismo es esencial en la división celular.

A través de estudios de transcripción se encontró que la depleción de de FLASH resultó en niveles proteicos de histona H4 y como consecuencia en un bloqueo del ciclo celular en fase S.

Por análisis de inmunoprecipitación, Kiriya y colaboradores (2009) encontraron que FLASH interactúa con ARS2 (proteína de resistencia de arsenita) en células humanas, ambas proteínas localizadas a nivel nuclear, y demostrando que la desregulación de cualquiera de éstas, inhibieron el crecimiento celular. Definiendo además con resultados de mutación que la expresión adecuada de este gen es requerida para la progresión hacia y a través de fase S de ciclo celular.

Mapeo

El gen CASP8AP2 es localizado en el cromosoma 6q15.

Gen Leucemia/Linfoma célula B - 2

Símbolo: BCL2

Localización citogenética: 18q21.33

Coordenadas genómicas: 18:60,790,578-60,986,612

Sinopsis clínica

En cultivos celulares estudiados por Pegoraro y cols en 1984 mostraron las siguientes translocaciones: t(8;14) y t(14;18), ambas translocaciones características de linfoma de Burkitt y Linfoma Folicular. Posteriormente Tsujimoto y colaboradores (1984) detectaron el rearrreglo de DNA homólogo segmentario en células leucémicas y células de linfoma folicular con la translocación 14;18 pero no en otras células neoplásicas o células normales B o T. Así entonces, Tsujimoto concluyó que el gen BCL2, aún no relacionado con otros oncogenes podría ser importante en la patogénesis de la neoplasias de células B con esta translocación.

Cleary y colaboradores en 1986 por medio de análisis de secuencias de nucleótidos mostraron que este gen codifica una proteína de 26kD homóloga a una proteína del Virus Epstein Barr (VEB).

Función génica

Ngan y colaboradores (1988) encontraron la proteína BCL2 inmunoreactiva en las células neoplásicas de casi todos los linfomas foliculares, mientras que ésta misma no fue detectada en folículos afectados por procesos no neoplásicos o células de tejido linfoide normal.

Por medio de diversos estudios de inmunolocalización, Hockenbery y colaboradores en 1990 demostraron que BCL2 es una proteína de capa interna de membrana mitocondrial con una masa molecular relativa de 25,000. La sobreexpresión de BCL2 bloquea la muerte antiapoptótica de la línea de células de linfocitos proB.

Así entonces BCL2 es único entre los protooncogenes, localizada en la membrana mitocondrial e interfiriendo con la muerte celular programada independiente del ciclo de división celular.

BCL2 puede activar a la proteína RAF1 en la mitocondria y esto mejora la resistencia a apoptosis.

Vaux y colaboradores determinaron los efectos biológicos de BCL2 en células de la médula ósea. Ellos encontraron que BCL2 coopera con MYC para promover la proliferación celular de precursores de células B, algunas de las cuales sufren transformación neoplásica, demostrando así el potencial oncogénico de BCL2.

En estudios realizados por Tsujimoto (1989) demostraron que la sobreproducción de BCL2 resulta en un crecimiento celular descontrolado.

Se ha evidenciado que BCL2 actúa por inhibir la pérdida celular mediada por apoptosis más que por estimulación de producción celular.

La función antiapoptótica de BCL2 es sobrerregulada por adición de Interleucina-2 (IL-2).

Este protooncogen mantiene una reactividad inmune demostrada en ratones transgénicos sobreproductores de BCL2 quienes muestran una persistencia de células secretoras de Inmunoglobulinas y extendiendo el tiempo de vida de células B, contribuyendo lo anterior a apoyar que la modulación de la expresión de BCL2 es un determinante en la vida y muerte de los linfocitos normales.

En estudios realizados por Larsden y colaboradores se ha logrado establecer que el mecanismo de muerte celular controlado por BCL2 no requiere la activación de Caspasa 9 o su activador APAF1.

Lin y colaboradores (2004) mostraron que la interacción de BCL2 con un receptor nuclear llamado NUR77, el cuál es importante sitio de acción de agentes antineoplásicos para inducir la muerte celular permitió un cambio conformacional en la estructura de BCL2 conduciendo a un fenotipo opuesto del habitual de BCL2 resultando en un promotor de muerte celular.

Respecto a su implicación clínico pronóstica, BCL2 ha demostrado ser uno de los predictores más fuertes para menor supervivencia en Linfomas de células B grandes difusas. (Lossos y colaboradores 2004)

Estructura génica

BCL2 consiste de al menos 2 exones separados por al menos 15kb.

Modelo animal

En modelos experimentales se han establecido diversas funciones por Bcl2 entre éstas:

Es conocido como un potente regulador de la supervivencia celular en neuronas.

Importante regulador de muerte celular de fotorreceptores en procesos de degeneración retiniana.

La sobreexpresión de Bcl2 produce un incremento significativo en el proceso de replicación de miocitos y su índice mitótico.

Se ha sugerido que Bcl2 es un regulador crucial del proceso de autofagia inducida por ejercicio in vivo, y la inducción de autofagia contribuye a los efectos benéficos metabólicos del ejercicio.

Gen Inhibidor de apoptosis asociado a X

Nombres alternativos: Inhibidor 3 de apoptosis (API3), Proteína similar IAP (ILP), Proteína inhibidora de apoptosis de mamífero, homólogo A (MIHA)

Símbolo: XIAP

Localización citogenética: Xq25

Coordenadas genómicas: X:122,993,661 - 123,047,828

Descripción

Junto con Inhibidor de apoptosis tipo 2 (HIAP1) e Inhibidor de apoptosis tipo 1 (HIAP2), pertenecen a una familia de multigenes que los miembros muestran homología extensa a baculovirus IAP's y codifican proteínas que demuestran inhibición significativa de apoptosis.

Clonación

Duckett y colaboradores clonaron el gen XIAP en 1996, lo reportaron como un gen que codifica un polipéptido de 497 aminoácidos con una masa de 57 kD.

Uren y colaboradores (1996) demostraron que XIAP en células de mamífero redujeron significativamente la apoptosis mediada por una caspasa relacionada a apoptosis (ICE), así también como la inhibición de apoptosis mediada por menadiona, que es un importante generador de radicales libres.

Función génica

La proteína inhibidora de apoptosis asociada a X (XIAP), inhibe al menos dos miembros de la familia de proteasas de muerte celular, Caspasa-3 (CASP3) y caspasa-7 (CASP7). Como las caspasas son altamente conservadas en mundo animal y son los principales efectores de apoptosis estos hallazgos sugieren como las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP'S) proveen evidencia a través de este mecanismo de acción como supresores de muerte celular

La proteína codificada por XIAP tiene múltiples interacciones conocidas y algunas recientemente reportadas a través de las cuales ejerce su efecto antiapoptoico. Entre éstos, a través de su unión y consecuente inhibición de Caspasa-9. (Srinivasula y colaboradores 2001), inactivación del sistema JNK sin afectar su expresión (Tang y colaboradores 2001). Kim y colaboradores demostraron una mayor supervivencia celular a nivel endotelial vascular en donde XIAP ejerce un rol importante por su interacción con Caveolina-1 (Cav-1) un regulador importante en la producción de Oxido nítrico (ON), compitiendo activamente con la sintasa de ON en el dominio de fijación de Caveolina, permitiendo así mayor producción del mismo.

Así también existen sistemas moleculares que influyen en la desregulación del efecto antiapoptoico de XIAP, entre estos, mayor activación del Ligando inductor de apoptosis relacionado al Factor de necrosis Tumoral (TRAIL) incrementando los niveles de expresión algunas caspasas como caspasa-3, predominantemente si las células son portadores de alguna mutación en el gen XIAP. (Cummins y colaboradores 2004). La expresión del gen COMMD1, una proteína asociada con la homeostasis del cobre intracelular, que a su vez conduce a un incremento en las concentraciones de este elemento en medio intracelular genera una reducción en la expresión de XIAP aumentando su degradación y por ende disminuyendo significativamente su capacidad para inhibir Caspasa-3. (Mufti y colaboradores 2006).

Características bioquímicas

La proteína codificada por XIAP posee un dominio llamado BIR3 el cual es el principal sitio de unión para formar un complejo heterodímero con caspasa-9, ocasionando la homodimerización de ésta última. Así entonces XIAP secuestra a caspasa-9 en un estado monomérico, lo cual conduce a la inhibición de la actividad catalítica. (Shiozaki y colaboradores 2003)

Estructura génica

El gen XIAP está conformado por 6 exones (Rigaud y colaboradores 2006)

Mapeo

Rajcan-Separovic (1996) y colaboradores utilizaron técnicas de hibridación in situ para mapear el gen XIAP en el cromosoma Xq25.

Modelo animal

En modelos animales se ha mutado el gen XIAP, en donde se ha notado una ausencia de incremento de apoptosis dependiente o independiente de apoptosis. Lo anterior acompañado de un incremento en la expresión de proteínas como Ciap-1 y Ciap-2, sugiriendo la existencia de un mecanismo compensatorio en la ausencia de expresión de XIAP que podría ser provisto por estas moléculas. (Harlin y colaboradores 2001)

Anexo 2. PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final es una técnica diseñada con base en el principio de la replicación del ADN, la cual se utiliza para sintetizar una secuencia específica de ADN *in vitro* y consta de 3 fases: desnaturalización, amplificación y elongación.

La técnica de PCR requiere de modificaciones cíclicas de temperaturas, ya que cada fase necesita de una temperatura específica para llevarse a cabo. Debido a que los cambios en la temperatura y el tiempo que se mantienen son factores críticos para la PCR, se utiliza un termociclador, que es un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante tiempos y ciclos programados.

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR punto final, en la que la adición de marcadores nos permite detectar y cuantificar el producto sintetizado en tiempo real. Una de sus aplicaciones es la detección de cambios en la expresión génica, ya que al ser cuantitativa, nos permite determinar los niveles de ARNm de cualquier gen de interés en las condiciones de estudio.

Existen dos clases principales de marcadores utilizados para detectar y cuantificar los productos amplificados durante la PCR en tiempo real: específicos y no específicos.

Los marcadores específicos emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a amplicones específicos. La mayoría utiliza el fenómeno de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET por sus siglas en inglés) para emitir señales fluorescentes, captadas por el termociclador a medida que se va formando el producto. Entre sus ventajas están la precisión, análisis rápido y directo; pero su mayor desventaja es el diseño correcto de las sondas ya que está implicado directamente en la eficiencia de la interacción con el amplicón.

Los marcadores no específicos usan colorantes fluorescentes que se intercalan en las dobles cadenas de ADN durante la PCR. Una vez que el colorante se une a la doble cadena, emite una señal fluorescente que es detectada por el equipo. Así el aumento en la síntesis del producto de la PCR es proporcional a la fluorescencia detectada en cada ciclo de elongación. Dentro de los colorantes, el más utilizado es SYBR Green I, el cual no necesita un diseño experimental adicional ya que no reconoce una secuencia específica para intercalarse en la doble cadena de ADN. La principal desventaja de estos colorantes es que se unen a cualquier secuencia de doble cadena, emitiendo una señal fluorescente tanto para productos específicos como para inespecíficos. El SYBR Green no emite fluorescencia mientras está en solución, únicamente cuando está intercalado en la doble cadena de ADN.

Para llevar a cabo una cuantificación mediante la PCR en tiempo real se realiza una modificación del protocolo de la PCR punto final, adicionando una fase previa a la amplificación para la activación de la enzima y una fase posterior a la amplificación denominada curva de disociación.

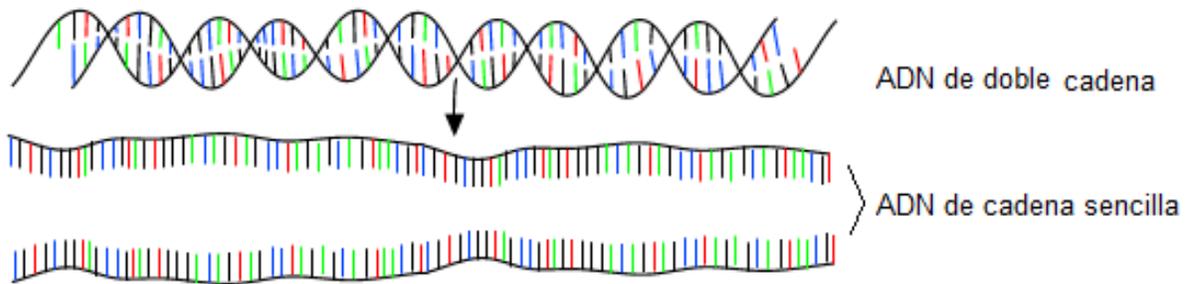
La primera fase de la reacción es la desnaturalización, consta de un solo ciclo en el que se aumenta la temperatura hasta 95°C, la cual se mantiene por 10 minutos. Su objetivo es la desnaturalización de la doble cadena de ADN y la activación de la ADN polimerasa.

La segunda fase es la amplificación y consta de 3 ciclos continuos que se repiten de 30 a 50 veces dependiendo de la cantidad inicial de ADN. Estos tres ciclos son: desnaturalización, hibridación de los cebadores y elongación.

La desnaturalización consiste en la elevación y mantenimiento de la temperatura a 95°C durante 10-15 segundos para separar la doble cadena de ADN en dos cadenas sencillas. Esto sucede puesto que los enlaces del hidrógeno que unen las bases de una a otra cadena son débiles y se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, que son enlaces covalentes más fuertes, permanecen intactos.

En la Figura 1 se muestra la desnaturalización de la doble cadena de ADN por efecto del aumento de la temperatura.

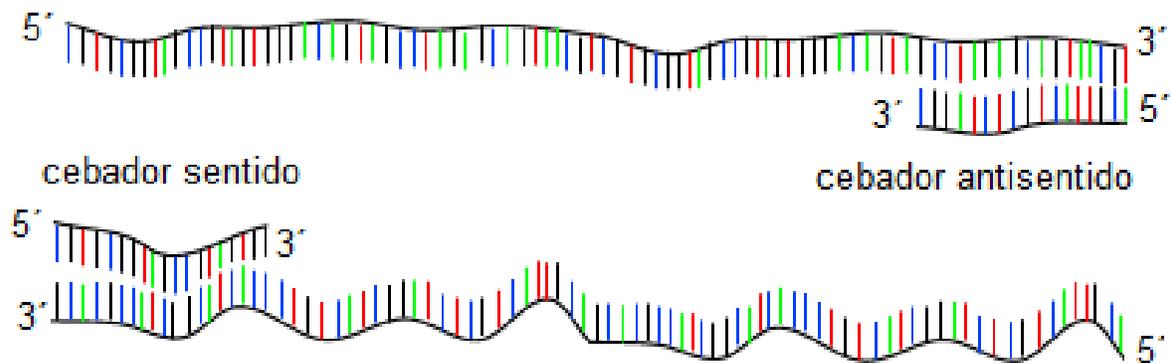
Figura 1. Desnaturalización del ADN por efecto del calor (modificada de Vierstraete, 1999).



La hibridación de cebadores es la unión de estas secuencias sintéticas de nucleótidos con la secuencia molde específica de ADN, tanto en sentido como en antisentido, limitando de esta manera la región que se va a amplificar. Esta interacción entre secuencias complementarias se promueve con la modificación de la temperatura (entre 40°C y 65°C) a la cual se hibridan los cebadores con la secuencia molde de ADN, dependiendo de la longitud y la secuencia de bases de los cebadores. Tanto la temperatura como el tiempo que debe mantenerse la misma, permite que los cebadores se unan a la secuencia molde con alta especificidad generando una región de ADN de doble cadena que es necesario para que la ADN polimerasa lo reconozca como sitio de iniciación de la elongación.

En la Figura 2 se muestra la hibridación de los cebadores: sentido y antisentido con la secuencia molde de ADN.

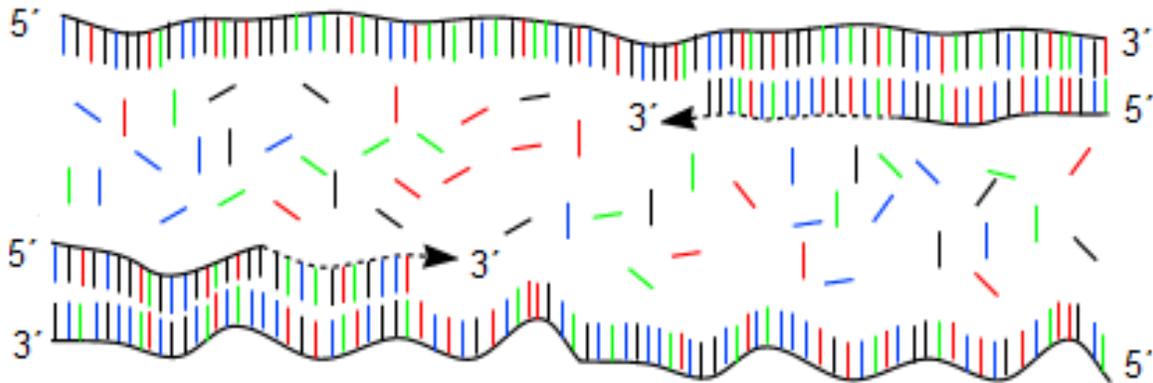
Figura 2. Hibridación de los cebadores con la cadena molde de ADN (modificada de Vierstraete, 1999).



El tercer ciclo es la elongación, durante este proceso se sintetizan dos nuevas moléculas de ADN de doble cadena, ambas idénticas a la original, mediante la unión de nucleótidos complementarios a la cadena molde por la acción de la ADN polimerasa, la cual tras reconocer la región de ADN-cebadores de doble cadena, comienza la polimerización a 72°C. El producto sintetizado se denomina amplicón. La Figura 3 muestra la incorporación de estos nucleótidos a la cadena molde de ADN.

Durante la fase de amplificación, dado que se adicionó SYBR Green, obtenemos de manera gráfica la cinética de la reacción de amplificación en tiempo real. El comportamiento de la reacción está constituida por tres fases: la fase basal, en la que la fluorescencia no presenta cambios significativos dado que el producto amplificado no rebasa los límites de detección; la fase logarítmica de amplificación, en la que se sintetiza exponencialmente el producto produciendo un aumento de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón generado; y finalmente, la fase

de plateau o fase de saturación, en la que ya sea por una disminución en la actividad de la ADN polimerasa o por la limitación de alguno de los reactivos, se restringe la síntesis del amplicón.
 Figura 3. Incorporación de nucleótidos complementarios (modificada de Vierstraete, 1999).



El punto de inflexión entre la fase basal y la fase logarítmica se denomina punto de cruce (PC) y representa el punto crítico en el que la reacción se estabiliza y comienza una síntesis del producto de manera exponencial, por lo tanto, el equipo comienza a detectar un aumento en la fluorescencia proporcional al producto generado. En la Figura 4 se presenta la cinética de la reacción de amplificación donde se denotan sus diferentes fases.

La última fase denominada curva de disociación nos indica la temperatura a la cual se disocia por completo el producto sintetizado durante la fase de amplificación y consta de tres pasos: desnaturalización, hibridación y disociación.

El primer paso es la desnaturalización, en el que se eleva la temperatura a 95°C y se mantiene por 1 segundo para que el producto sintetizado durante la amplificación se desnaturalice por completo, el SYBR Green que se había intercalado en la doble cadena sintetizada es liberado, por lo tanto, el equipo detecta una pérdida total de la fluorescencia.

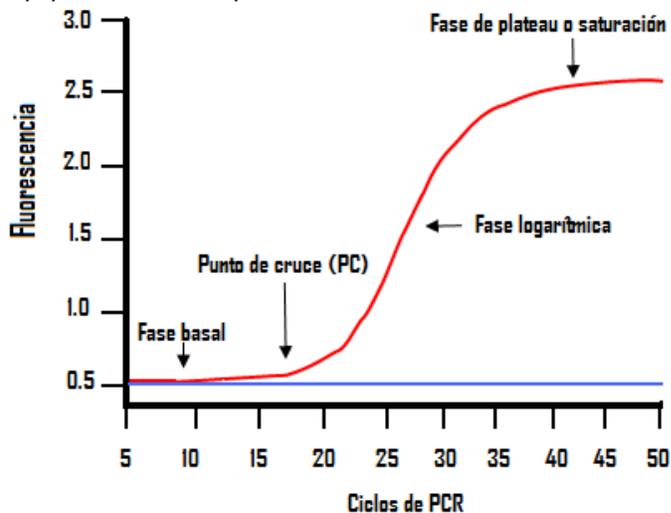


Figura 4. Cinética de la reacción de amplificación.

Posteriormente, comienza el proceso de hibridación, en el que se disminuye la temperatura a 65°C y se mantiene por 15 segundos, promoviendo la re-naturalización del ADN en doble cadena. En este proceso en contraparte al proceso anterior se obtiene un máximo de fluorescencia debido a que el SYBR Green se intercala en la doble cadena de ADN.

El último paso es la disociación, en el que se eleva la temperatura paulatina y constantemente desde 65°C hasta 95°C con una rampa de 0.1°C/segundo. En esta fase el producto sintetizado durante la amplificación se desnaturaliza, liberando al SYBR Green, lo que produce una pérdida de fluorescencia detectada de manera continua por el equipo. La derivada de la fluorescencia contra la temperatura se grafica obteniendo un área bajo la curva que representa el producto amplificado,

en esta misma gráfica se muestra la temperatura a la cual se pierde completamente la fluorescencia, es decir, la temperatura de disociación del amplicón. En la Figura 5 se muestran dos curvas de disociación de amplicones distintos, denotando diferentes temperaturas de disociación.

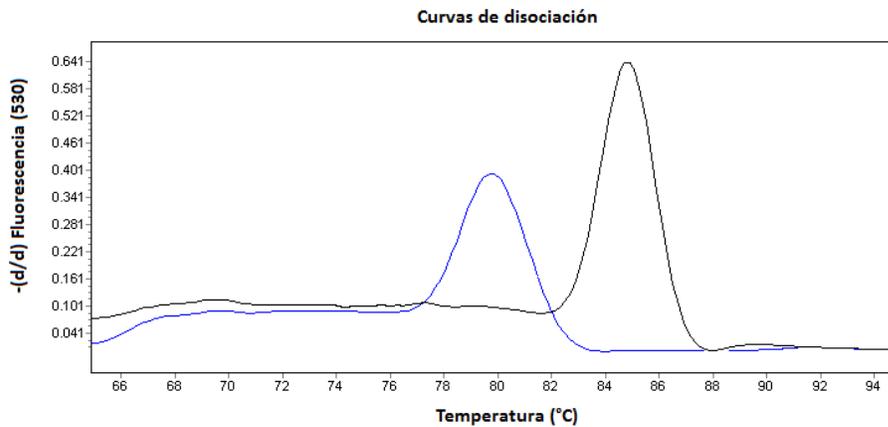


Figura 5. Curva de disociación de dos productos de la PCR con distintas temperaturas de disociación.

Cuantificación absoluta

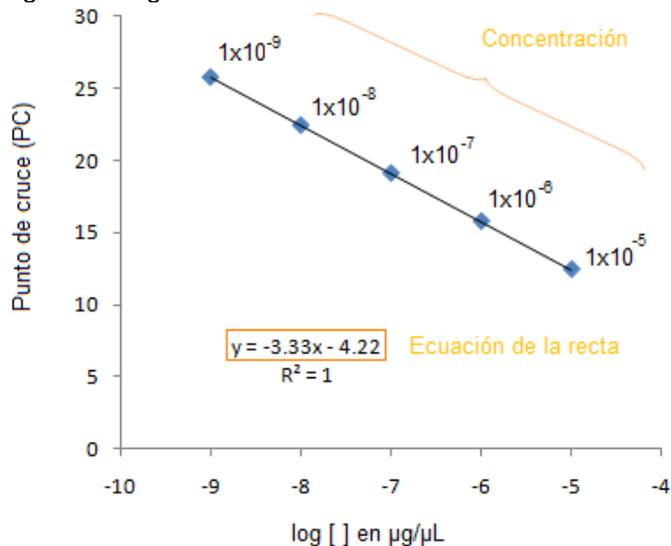
Uno de los procesos mediante el cual se calcula la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra es la cuantificación absoluta. En esta cuantificación se relacionan los puntos de cruce (PC) de las muestras con los PC de una curva estándar externa.

Para la obtención de la curva estándar externa se parte de una concentración conocida de ADN o ARN y se preparan diluciones seriadas con diferencia de un orden de magnitud, mismas que posteriormente son amplificadas en las condiciones establecidas para el gen de estudio. Es importante calcular la eficiencia de la reacción (E) de la curva estándar, ya que los datos serán válidos solamente si la eficiencia obtenida oscila entre 1.8 y 2.0. La fórmula utilizada para calcularla es:

$E = 10^{-1/m}$ donde m es el valor de la pendiente de la ecuación de recta de la curva estándar.

Una vez concluida la reacción de amplificación de la curva estándar, se obtienen los PC de las diluciones, los cuales se grafican en el eje de las ordenadas frente al logaritmo de su concentración en el eje de las abscisas, con el objetivo de obtener la regresión lineal y, posteriormente, calcular la ecuación de la recta, que será utilizada para sustituir los valores de los PC de las muestras problemas y así tener su concentración. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de la regresión lineal de una curva estándar.

Figura 6. Regresión lineal de una curva estándar.

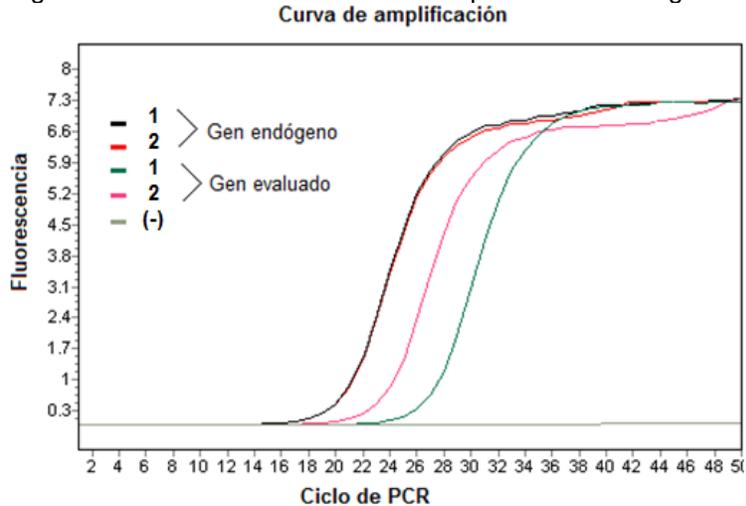


Cuantificación relativa

La cuantificación relativa se utiliza para obtener la relación de los cambios en los niveles de expresión del gen estudiado en comparación con un gen de referencia. La cuantificación relativa se calcula comparando el cociente de los niveles de expresión del gen evaluado frente a la expresión del gen de referencia.

En la Figura 7, se muestra un ejemplo de la cinética de la reacción de amplificación de dos muestras tratadas diferencialmente, donde se observa que independientemente del tratamiento la amplificación del gen endógeno se conserva, mientras que los niveles del gen evaluado varían dependiendo del tratamiento.

Figura 7. Cinética de la reacción de amplificación de un gen endógeno y un gen evaluado.



Veces de activación

El cálculo de las veces de activación es una representación gráfica de los resultados de la cuantificación relativa comparando los datos obtenidos con un valor de referencia seleccionado arbitrariamente. Este valor puede ser una de las muestras, un control de tratamiento o una unidad arbitraria. A este dato se le denomina con un valor unitario y todos los valores de las muestras evaluadas se refieren a él.

ANEXO 3. TECNICA DE EXTRACCION RNA, cDNA, REVERSO TRANSCRIPCION Y RT-qPCR

Se utilizarán las muestras de mRNA de todos los casos incluidos. Será verificado la concentración antes de proceder a la reverso transcripción, para asegurar homogeneidad en todas las muestras. De la misma forma, se hará un concentrado equivalente de todos los mRNA considerados para validación, el cual será utilizado para el control de referencia de la qRT-PCR.

REVERSO TRANSCRIPCIÓN

Usaremos el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, donde seguiremos el protocolo (manual) de la casa comercial.

Para sintetizar el ADNc de cadena sencilla a partir de ARN total utilizando el kit de High Capacidad cDNA de reverso transcripción se ejecutará el siguiente protocolo:

- 1- Preparar la transcripción reversa 2x master Mix
- 2- Añadir ARN total a la 2x RT Master Mix para crear una mezcla 1x
- 3- Realizar la transcripción inversa en un termociclador

Utilizar las reacciones (ADNc) de transcripción inversa directamente para aplicaciones de PCR cuantitativa.

Almacenar la reacciones (ADNc) de la transcriptasa reversa

Cantidad de entrada de ARN total

Se utilizará un máximo de 2 g de ARN total por 20-l reacción

Preparación de la 2x inversa transcripción master Mix

Preparar el 2x RT master mix utilizando los componentes del kit antes de la preparación de la placa de reacción.

Para preparar el 2x RT mezcla maestra (por 20-l de reacción):

1. Dejar que los componentes del kit descongelar en el hielo.
2. Haciendo referencia a la tabla a continuación, calcular el volumen de componentes necesarios para preparar el número requerido de reacciones. Preparar la master mix RT en hielo.
3. Coloque los 2x RT master mix sobre hielo y mezclar suavemente

Preparación de las reacciones de transcripción reversa de cDNA

Para preparar las reaciones de RT cADN

Pipetear 10 ul de master mix 2x RT en cada pozo de una placa de reacción de 96 pozos o de tubo individual.

Pipetear 10ul de muestra de ARN en cada pozo, pipeteando arriba y abajo dos veces para mezclar.

Sellar las placas o tubos.

Centrifugar brevemente la placa o los tubos, para dejar abajo el contenido y eliminar las burbujas de aire.

Coloque la placa o los tubos en hielo hasta que esté listo para cargar el termociclador.

Realización de la reverso transcripción

1. Programa de las condiciones en ciclos del termociclador usando uno de los ciclos de los termocicladores listados en el protocolo comercial.
2. Ajuste el volumen de reacción de 20 l.

3. Cargue las reacciones en el termociclador.
4. Iniciar la ejecución de la reverso transcripción

Almacenamiento de las reacciones cADN de la reverso transcripción

Puede almacenar las placas o los tubos de RT cDNA elaborados con los kits de High Capacity Reverse transcripción para el almacenamiento a corto plazo o largo plazo.

PCR Tiempo real (qRT-PCR)

Detallamos los pasos a seguir para la realización de qRT-PCR de acuerdo al manual de la casa comercial Applied Biosystems

Amplificación de qRT-PCR

Amplificación de la diana utilizando cDNA como plantilla es el segundo paso en la etapa de dos pasos de RT-PCR.

En este paso, la ADN polimerasa amplifica ADNc diana, utilizando cebadores de secuencia específicos y escinde la sonda TaqMan para generar una señal fluorescente que es medido por el sistema de PCR en tiempo real.

Manejo y preparación de los reactivos

Siga estas las siguientes indicaciones para asegurar un rendimiento óptimo de la PCR:

Mantenga los ensayos TaqMan en el congelador, lejos de la luz, hasta que esté listo para usarlos. Debido a que la exposición excesiva a la luz puede afectar las sondas fluorescentes.

Antes de usar los reactivos:

Mezclar bien la mezcla de TaqMan haciendo girar la botella.

Descongele ensayos TaqMan colocandolos en el hielo. Una vez descongelado, resuspender los ensayos en el vórtex, y a continuación centrifugar brevemente.

Descongele las muestras congeladas, colocándolas en hielo. Una vez descongeladas, resuspenda las muestras en el vortex brevemente, y luego centrifugar brevemente.

Preparación de la mezcla de reacción de PCR

Determine el número total de reacciones de PCR para llevar a cabo. En cada placa de reacción, incluyendo:

Un ensayo de expresión génica para cada muestra de ADNc

No hay controles de plantilla (NTCs) para cada ensayo en la placa.

Puede ejecutar múltiples ensayos en la placa de reacción.

Incluir controles para cada ensayo que se ejecuta en una placa.

Applied Biosystems recomienda realizar 3 repeticiones de cada reacción.

Conforme a la tabla a continuación, calcular el volumen total requerido para el componente de cada reacción.

Etiquete un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, agregue todos los componentes al tubo rotulado, posteriormente tape el tubo.

Coloque el tubo brevemente en el vortex para mezclar los componentes.

Centrifugar el tubo brevemente para enviar hacia abajo el contenido y eliminar burbujas de aire.

Prepare la placa de reacción PCR

Transfiera el volumen apropiado de la mezcla de reacción de PCR a cada pozo de la placa

Cubrir la placa de reacción con una película adhesiva óptica.
 Centrifugar la placa brevemente para girar hacia abajo el contenido y eliminar las burbujas de aire.
 Retire la película adhesiva óptica.
 Conforme a la tabla abajo, agrega ADNc o agua a cada pozo.
 Cubrir la placa de reacción con una película adhesiva óptica nueva.
 Centrifugar la placa brevemente, mover hacia abajo el contenido y eliminar las burbujas de aire.
 Si es requerido por su sistema en tiempo real PCR, aplique una almohadilla de compresión para la placa.

Configurar una placa o experimento

Volumen de muestra:

| Reaction plate format | Reaction volume (µL) |
|--|----------------------|
| 384-well plate | 10.0 |
| 96-well and 48-well plates (both Standard and Fast) | 20.0 |

Ejecutar la placa de reacción PCR

1. En el software del sistema, abra el documento o experimento que corresponde a la placa de reacción.
2. Carga de la placa de reacción en el sistema de PCR en tiempo real.
3. Inicie la ejecución.

Usando sodas TaqMan específicas

Para diseñar sondas y cebadores específicos para un experimento de cuantificación:

Determinar la plantilla y amplicon.

Diseño de los cebadores de secuencia especializados y sondas TaqMan

Determinar las concentraciones óptimas de los cebadores de secuencia.

Determinar la concentración óptima de la sonda TaqMan específica

Realizar la Qrt-PCR

Determinar la plantilla blanco

Una plantilla blanco es una secuencia de ADN, incluyendo una gDNA de ADNc, o plásmido secuencia de nucleótidos.

Diseño cebadores para amplificar amplicones (segmentos cortos de ADN) dentro de la meta secuencia.

Los amplicones más cortos son los mejores. Los resultados que se obtienen para tamaño de amplificación oscilan desde 50 hasta 150 pb.

Determinar la concentración de óptima del cebador

El propósito de este procedimiento es determinar las concentraciones mínimas de cebador que producen el ciclo umbral (CT) para cada sonda sin una disminución en el ΔR_n .

Para determinar la concentración de cebador óptimo:

Conforme a la tabla a continuación, preparar una mezcla de reacción PCR.

En una placa de reacción óptica, cargar al menos 3 repeticiones de cada uno de los siguientes condiciones

Ejecutar la placa de reacción en el sistema en tiempo real PCR utilizando los siguientes perfiles térmicos

Determinar la concentración de la sonda óptima

El propósito de este procedimiento es determinar las concentraciones mínimas de la sonda sin disminuir la ΔR_n .

Una concentración de cebadores de 900-nM y una sonda de 250-nM proporciona un ensayo altamente reproducible y sensible.

Para determinar la concentración óptima de una sola sonda de ensayos:
Conforme a la tabla a continuación, preparar una mezcla de reacción PCR.

En una placa de reacción óptica, cargar al menos 3 repeticiones en cada intervalo de 50 nM de 50 a 250 nM

Ejecutar la placa en su sistema en tiempo real PCR utilizando los siguientes ciclos térmicos perfil

Tabular los resultados de la TC y la ΔR_n . Seleccione las concentraciones mínimas de sonda producen el mínimo CT y la más alta ΔR_n .

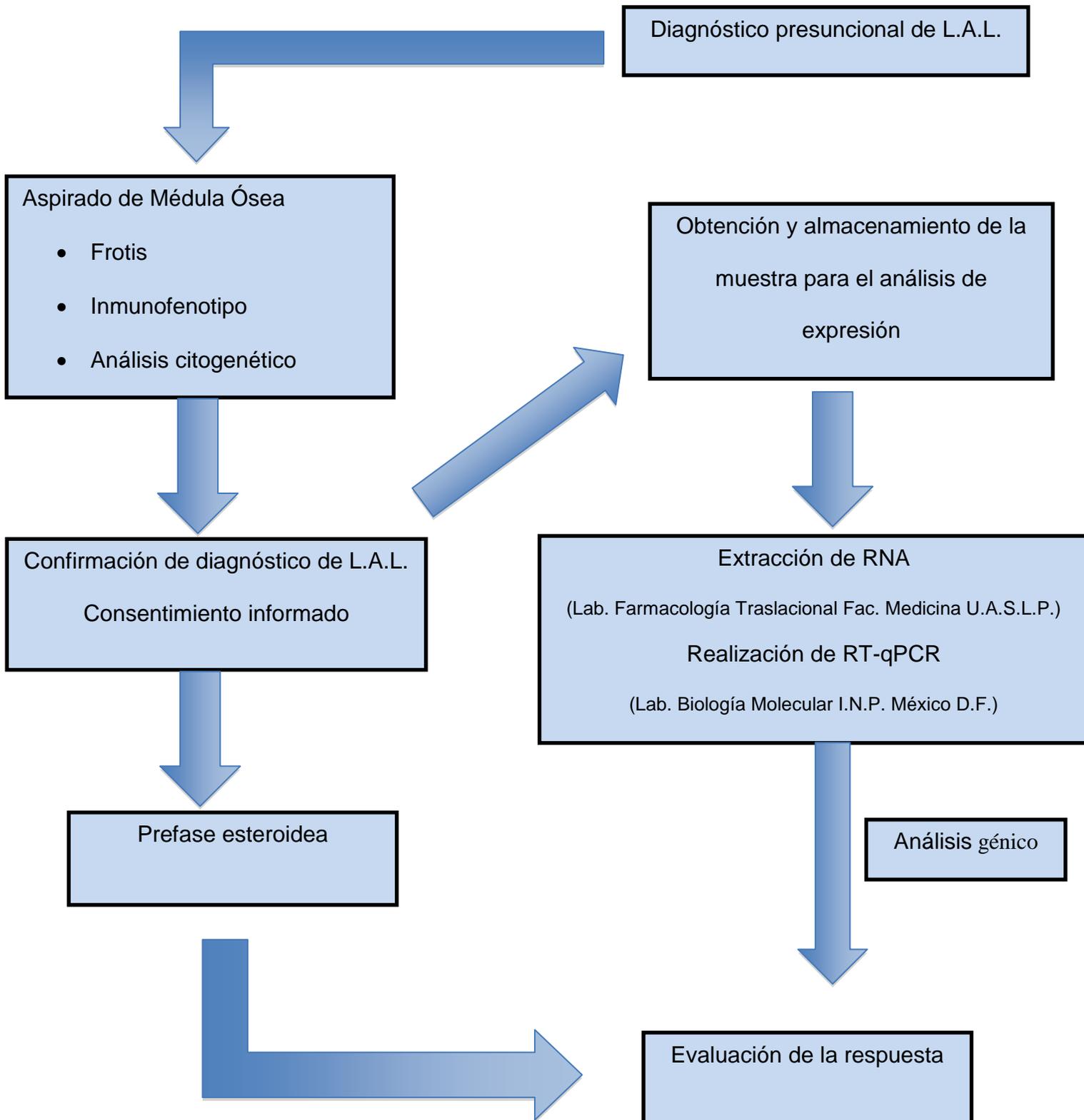
Realizar PCR en tiempo real

Para los ensayos de rutina que se optimizan como se describe aquí, realice qRT-PCR de la siguiente manera:

1. Conforme a la tabla a continuación, preparar una mezcla de reacción de PCR, a continuación, transferir el apropiado volumen a cada pocillo de una placa de reacción óptica.
2. Conforme a la tabla abajo, agrega un molde de ADNc o de agua a cada pocillo.
3. Ejecutar la placa en su sistema en tiempo real PCR utilizando los siguientes ciclos térmicos perfil.

Se identificará el nivel de expresión de cada uno de los genes candidatos reportándose numéricamente, así como la comparación con un gen estándar (control) el cual determinara el nivel de sobre o subexpresión independiente.

ANEXO 4 ESQUEMA DE LA DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO



ANEXO 5. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DE ESTUDIO TITULADO:

Expresión diferencial de un conjunto de genes candidatos y su asociación con respuesta a prefase esteroidea en pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica

I. INTRODUCCIÓN Es importante que lea y comprenda la siguiente explicación acerca de la enfermedad de su hijo y la posibilidad de que sea incluido en el estudio arriba mencionado, aquí se describe claramente el propósito, beneficios y riesgos que condiciona el ingreso al estudio. También deberá entender que el hecho de rechazar la participación de su hijo (a) en el estudio no cambiará las decisiones médicas que se tomen con respecto al tratamiento de la enfermedad.

II. OBJETIVO

Yo (padre o tutor) _____
voluntariamente acepto que mi hijo (nombre del paciente) _____

Participe en el estudio, cuyo propósito es identificar los perfiles de expresión génica en blastos linfoides de pacientes con leucemia aguda linfoblástica.

III. PROCEDIMIENTOS Estoy informado de que con la finalidad de conocer el diagnóstico preciso de la enfermedad que tiene mi hijo(a), será necesario realizarle un aspirado de médula ósea para obtener una muestra con la finalidad de establecer el diagnóstico, aun que no ingrese al estudio. He sido informado que el aspirado es un procedimiento que se realizará con todas las medidas higiénicas necesarias y bajo sedación, esto último con la finalidad de que mi hijo (a) no tenga dolor durante el aspirado. Para ingresar al estudio será necesario que parte de la muestra del aspirado de médula ósea sea destinada al estudio de análisis de los perfiles de expresión génica, sin la necesidad de tomar alguna otra muestra más.

IV. BENEFICIOS La identificación de los perfiles de expresión génica de interés para el proyecto permitirá en un futuro asignar el tratamiento de inducción a la remisión de forma más adecuada a la biología de la leucemia.

V. RIESGOS Mi hijo (a) no será sometido a algún riesgo agregado a los procedimientos diagnósticos y terapéuticos que de rutina se realizan a todos los pacientes que presentan alguna neoplasia maligna, tales como el aspirado de médula ósea y la aplicación de quimioterapia, los cuales son necesarios para el diagnóstico y tratamiento del tipo de cáncer que mi hijo(a) tiene. Las pruebas de genómica que se realicen a la muestra del aspirado de médula ósea no implican riesgos o efectos indeseables en mi hijo (a).

VI. ALTERNATIVA DE RECHAZO

Si yo o mi hijo decidimos no participar en el estudio, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento serán iguales que en otros pacientes tratados en el Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.

VII. CONFIDENCIALIDAD Entiendo que cualquier información que se obtenga en este estudio será confidencial y que ni mi nombre ni el de mi hijo (a) serán mencionados en el reporte del estudio.

VIII. DISPONIBILIDAD DE LA INFORMACION El resultado de las pruebas diagnósticas será notificado inmediatamente al contar con el reporte oficial, por el médico responsable del proyecto de investigación adscritos al servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto. Los resultados completos derivados del proyecto de investigación serán publicados en revistas científicas para su divulgación a la comunidad científica nacional e internacional.

IX. DERECHO A DESERTAR Soy libre de retirar del estudio a mi hijo (a) en cualquier momento. En el caso de que tome esta decisión, el tratamiento y seguimiento no cambiarán.

San Luis Potosí, S.L.P., a _____ de _____ de 20__.

Nombre y Firma del Padre o Tutor

Firma del Investigador

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo

Investigador Responsable: Dr. Juan José Ortiz Zamudio. Médico Adscrito al Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto. Av. Venustiano Carranza #2395. Zona Universitaria C.P. 78210. Col. Los Filtros. San Luis Potosí, S.L.P. Tel. 8-342700

ANEXO 6. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Protocolo

Expresión de un conjunto de genes candidatos y su asociación con respuesta a prefase esteroidea en pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica

NOMBRE: _____ No. Caso: _____

GÉNERO: M _____ F _____ EDAD: _____ a _____ m FECHA DE A.M.O. _____

BIOMETRIA HEMÁTICA AL DIAGNÓSTICO: Fecha _____

Hgb _____ Leucocitos _____ Plaquetas _____ Blastos _____

INMUNOFENOTIPO AL

DIAGNÓSTICO: _____

ANALISIS CITOGENETICO AL DIAGNÓSTICO: Fecha _____

Translocación 9;22: Positiva _____ Negativa _____

Translocación 4;11: Positiva _____ Negativa _____

ÍNDICE DE D.N.A. AL DIAGNÓSTICO: Fecha _____

Resultado _____ Hipodiploidia _____ Hiperdiploidia _____

INFILTRACION A SNC AL DIAGNOSTICO

Positiva _____ Negativa _____

RESPUESTA A PREFASE ESTEROIDEA

BLASTOS EN BIOMETRIA HEMÁTICA AL DÍA 0: _____

BLASTOS EN BIOMETRIA HEMÁTICA AL DÍA 8: _____

RESPUESTA A LA PREFASE ESTEROIDEA: Buena _____ Mala _____