



U A E M

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**



**FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA ACADÉMICA
JEFATURA DE POSGRADO**

**VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG EN CÉLULAS
PRECURSORAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO B**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA
MOLECULAR**

**QUE PRESENTA:
Q.F.B. JACQUELINE SÁNCHEZ HERRERA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESÚS SANTA OLALLA TAPIA**

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO 2018

CUERNAVACA MORELOS JUNIO 2018

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría; bajo la dirección del Dr. Jesús Santa Olalla Tapia.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Gabriela Castañeda Corral, Dr. Juan José Acevedo, Dr. Oscar Alberto Pérez González y la Dra. Nydia Carol Bailón Franco; así como a los miembros del comité sinodal: Dra. Gabriela Castañeda Corral, Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz, Dr. Oscar Alberto Pérez González y Dra. Nydia Carol Bailón Franco por el tiempo dedicado a este proyecto. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 598826 otorgada durante los estudios de Maestría. Y a los apoyos otorgados para la realización de estancias por parte de programas de fortalecimiento de la calidad del 2016 y 2017

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO Y LA CÉLULA TRONCAL HEMATOPOYÉTICA.....	4
NICHOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS	5
MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN PROCESOS DE AUTORRENOVACIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CTHS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	7
VÍA DE SONIC HEDGEHOG	7
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE TIPO B.....	11
PAPEL DE LA VÍA DE SONIC HH EN LOS EVENTOS DE TRANSFORMACIÓN.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
GENERAL	33
PARTICULARES	33
MATERIALES Y METODOS	34
MATERIALES	34
MÉTODOS	35
RESULTADOS	51
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN

La LLAB resulta ser una enfermedad de gran importancia en el sector infantil debido a que es la neoplasia de mayor incidencia, con una frecuencia del 75% de la totalidad de las neoplasias malignas diagnosticadas en este sector de la población, el éxito en el tratamiento de esta patología radica en la adecuada estadificación de riesgo en el que se encuentre el paciente, lo cual está vinculado directamente con el grado de indiferenciación, así como la presencia de factores genéticos (translocaciones) y celulares (tasa de proliferación, etapa preferente del ciclo celular) lo que permiten determinar el esquema de tratamiento.

Actualmente en México el éxito en el tratamiento se encuentra alrededor del 65%; por debajo de los estándares en países desarrollados. Así mismo, se reporta que alrededor del 30% de los niños con LLA fallecen por falla terapéutica, la cual es consecuencia de la falla en la respuesta a los medicamentos en alguna de las fases del tratamiento. Por lo anterior, es necesario buscar nuevas moléculas blanco que permitan establecer tratamientos más efectivos; de esta manera, es necesario identificar y caracterizar los mecanismos que se presentan en el proceso de transformación de nuestra población e investigar si éstos están relacionados con la falta de respuesta terapéutica en alguna de las fases del tratamiento.

Nuestra propuesta es que el factor de mayor importancia en el desarrollo de resistencia al En donde la una de las vías de señalización que se ha demostrado que participa en estas respuestas celulares es la vía de Sonic HH, que resulta ser característica distintiva de varias Células Troncales, y que en los últimos años se ha relacionado con las CTHLs. Por lo que proponemos que la vía de Sonic HH en las poblaciones de células leucémicas, podría estar asociada a la falla de respuesta a la inducción de la remisión durante su tratamiento. A partir del presente proyecto pudimos evidenciar la activación de la vía mediante la detección del RNAm de los genes blanco GLI-1 y BMI-1 en un 96.15% de los casos analizados, así mismo se mostró que a diferencia de lo reportado en la bibliografía para otras neoplasias oncológicas no se detecta al gen blanco PTC-1 (que posee actividad represora de dicha vía). En el análisis de la variable de clasificación de riesgo en función de la detección de dicha vía mediante sus genes blanco, se notó una tendencia entre los altos índices de detección de BMI-1 y la clasificación de alto la supervivencia global del grupo de estudio con un valor de 65% a 82 meses. Se muestra una tendencia entre la detección baja del factor de transcripción GLI-3 y BMI-1, así como de la detección alta de GLI-3 y

BMI-1 y la disminución de la supervivencia de los pacientes. La totalidad de la falla a la inducción a la remisión (4 casos) radica en el grupo de pacientes en los cuales se detectan niveles bajos para GLI-3 y BMI-1, lo cual nos da la pauta a pensar que dicho patrón puede ser un factor de detección de los casos que no responderán a esta fase del tratamiento; mientras que el grupo de detección alta para GLI-3 y BMI-1 presenta una tendencia con la falla a IR en la supervivencia global en el grupo de estudio con un valor de 0% a 6 meses, así mismo dicha detección logra identificar a los pacientes que tendrán un impacto negativo en la supervivencia después de 18 meses de seguimiento. Lo que nos lleva a concluir que si bien no hay rasgos estadísticamente significativos en cuanto a una asociación directa entre la detección de la vía de SHH a y la respuesta a la fase de inducción a la remisión, la detección de la misma posee tendencias entre la detección de sus componentes principalmente de GLI-3 y BMI-1 en proporciones altas y la supervivencia de los pacientes, lo cual nos da la pauta a verlo aplicado posteriormente y con mayor refuerzo de la estadística como un factor pronóstico en los pacientes que presentan esta neoplasia.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo humano requiere la producción continua de los diversos tipos celulares que lo integran. Este evento es necesario para dar soporte a lo largo de toda la vida del individuo a los requerimientos estructurales que permiten que cada tejido ejerza sus funciones^[1]. El sistema hematopoyético (SH) se especializa en formar y madurar las diversas poblaciones celulares encargadas de mantener la homeostasis sanguínea (Figura 1)^[2]. Este sistema se encarga de la producción continua de cada estirpe celular y de la regulación de su producción para que estas se encuentren dentro de las concentraciones celulares normales. La producción de células hematopoyéticas se organiza en grupos de células especializadas o linajes celulares, que son: el linaje linfoide, mieloide^[3]. Este es un evento coordinado al que se le denomina Hematopoyesis, el cual se encarga de regular la complejidad de estímulos extracelulares que permiten generar las respuestas celulares para la proliferación, determinación, diferenciación y muerte celular, que concluye con la adquisición del fenotipo terminal de cada una de las estirpes que lo integran^[3]. Todo lo anterior a partir de una población sumamente inmadura, la célula troncal hematopoyética (CTH)^[2].

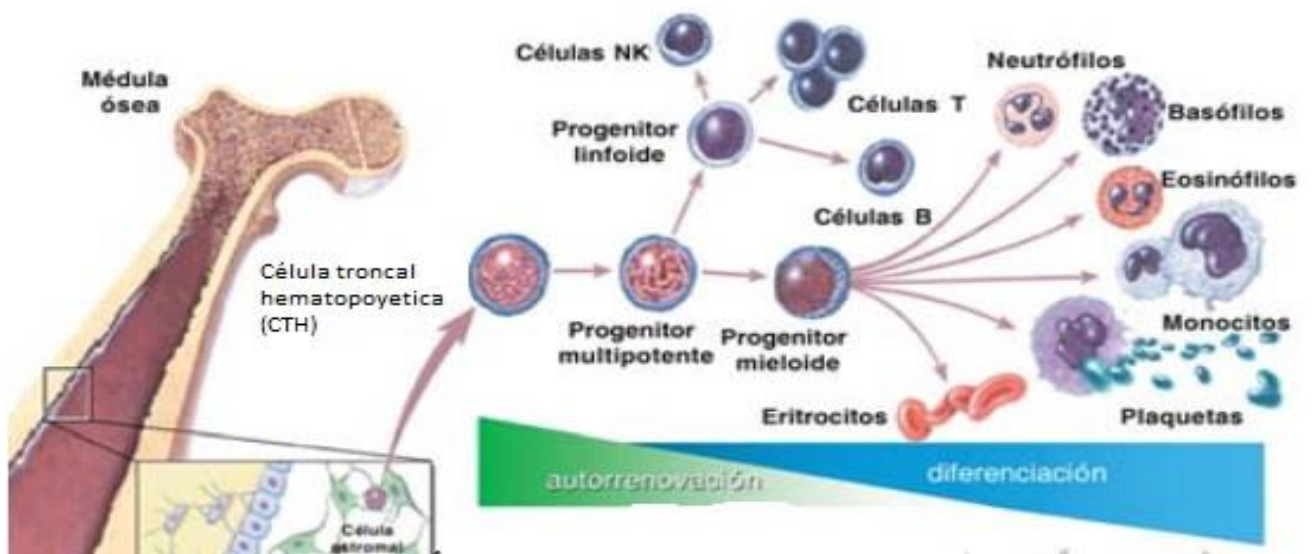


Figura 1. Esquema simplificado de la hematopoyesis. Una población de CTH genera de manera continua y regulada una progenie de células maduras, en el caso del linaje linfóide: células NK, T o B y en el caso del linaje mieloide: eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos o plaquetas, que pasan a la circulación sanguínea. La multipotencialidad del progenitor se va perdiendo a medida que las células se van diferenciando en los distintos linajes. Modificado de <http://stemcells.nih.gov>

EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO Y LA CÉLULA TRONCAL HEMATOPOYÉTICA

El SH es un sistema altamente jerarquizado en el que un número limitado de células madre soporta el mantenimiento de uno de los tejidos más dinámicos del cuerpo: la sangre. Además, bajo circunstancias especiales, estas mismas células pueden ayudar a regenerar otros tejidos distintos a la sangre, o formar parte de ellos^[1]. Este sistema se sustenta en la médula ósea en donde se originan y diferencian a partir de las CTHs, las cuales se originan en la vida fetal y poseen las siguientes tres características básicas:

- 1) Multipotencialidad: Se refiere a la capacidad que tienen la CTH de generar cada uno de los diferentes linajes hematopoyéticos (Figura 1).
- 2) Proliferación: es la propiedad de dividirse y producir un gran número de células maduras durante la vida del individuo.
- 3) Autorrenovación: Es la capacidad de generar nuevas células troncales idénticas, estableciendo para ello divisiones celulares de tipo simétrica y asimétrica de acuerdo a las necesidades del organismo (Figura 2)^[4].

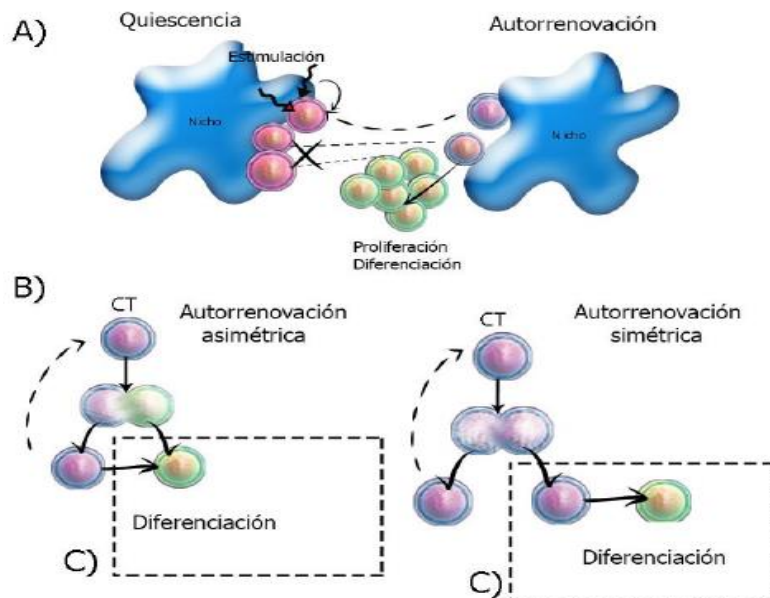


Figura 2. Evento de quiescencia y autorrenovación. Las células troncales (CT) son células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autorrenovación que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas, que normalmente se encuentran en estado de quiescencia. A) Las CTs reciben señales provenientes del nicho celular el cual regula la entrada y salida de las CT de la quiescencia. Se sabe que las CT quiescentes reemplazan las CT dañadas activas (flecha gruesa panel A), y que las CT activas pueden reemplazar las CT latentes que se pierden durante el recambio tisular (flecha punteada panel A), y que las CT activas (línea discontinua y/o su progenie (línea discontinua panel A) contribuyen al mantenimiento del pool de CT quiescentes por medio de regulación negativa al ciclo celular. B) Cuando las CT son activadas para la autorrenovación, este puede ocurrir de dos tipos: la asimétrica, la cual es el mecanismo clave para mantener el equilibrio entre la autorrenovación y diferenciación; y la simétrica, donde se producen dos células idénticas; C) en ambos casos una célula estará destinada a diferenciarse de acuerdo con los requerimientos del organismo. Tomado y editado de Fuchs et al, 2004

Esta última propiedad es muy importante debido a que múltiples situaciones producen daño celular sobre el organismo, lo cual incrementa la necesidad de algunas poblaciones celulares sanguíneas, de no ser por la capacidad de autorrenovación de las CTHs y su posterior compromiso hacia precursores más maduros, se verían reducidas esas poblaciones^[5]. Se sabe además que a medida que las CTHs maduran van perdiendo su potencial de autorrenovación, adquiriendo una alta capacidad mitótica que permite la expansión de una población precursora que dará origen a la totalidad de las células que se requiere^[6].

La CTH se identifica además de las características antes mencionadas por la expresión de diversos cúmulos de diferenciación (CD, del inglés cluster of differentiation), presentes en su membrana. Estos, han sido empleados como marcadores moleculares para distinguir a la progeie ^[7]. En función de estos marcadores, las CTH poseen un fenotipo **CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, CD45RA⁻ (isoforma de CD45), CD133⁺ y Lin⁻** ^[7]. Durante su diferenciación las CTHs adquieren una restricción en su capacidad para diferenciar, ya que el precursor más avanzado puede dar origen a menor diversidad celular, a la vez que va disminuyendo su potencial para proliferar. Esto se ve acompañado del inicio de la expresión o modificación del patrón de CDs a lo largo de los diferentes niveles jerárquicos del SH mientras se encamina a su fenotipo terminal^[6].

NICHO DE LAS CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

La médula ósea es un tejido graso y suave que yace al interior del hueso trabecular, y son en conjunto la trabécula y el estroma de la médula ósea los elementos que físicamente soportan y fisiológicamente mantienen el tejido hematopoyético ^[6]. El nicho de la célula troncal hematopoyética es el microambiente que soporta física y fisiológicamente a este tipo celular. Se encuentra en el hueso trabecular y el estroma de la médula ósea ^[8]. Se ha propuesto la existencia de tres compartimentos en el nicho:

1) una zona osteoblástica (localizada cerca de los osteoblastos): está conformado por osteoblastos cuya función principal es ser formadores de hueso induciendo la diferenciación de las CMHs en osteocitos. En este nicho se han identificado diversas moléculas de adhesión celular que favorecen la interacción de los osteoblastos con las CMHs, entre las que se encuentran la N-caderina que se expresa tanto en osteoblastos como

en las CMHs quiescentes, y la β -1 integrina que se une a la fibronectina y promueve la adhesión a las células estromales de la médula ósea^[9].

2) una zona medular de CTHs quiescentes y proliferantes: en donde las células progenitoras producen factores que inhiben la proliferación de las células madre adyacentes. Las células quiescentes ubicadas en primer lugar en el nicho osteoblástico, al recibir estímulos y señales que inducen su proliferación, maduración y diferenciación según los requerimientos del organismo, migran desde este primer nicho hacia el nicho medular y posteriormente, antes de ser liberadas a la circulación, se desplazan al nicho vascular para culminar los procesos de proliferación o diferenciación^[9].

3) una zona vascular que permite la salida a la circulación de las células maduras, este nicho además de suplir de oxígeno a las CTHs en división produce factores angiogénicos indispensables para el mantenimiento celular, como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial^[9].

Los procesos de auto-renovación y diferenciación de las CMHs son controlados por un conjunto de mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos en los nichos hematopoyéticos, que se pueden establecer a través de interacciones entre las células^[10]. Un ejemplo de ello son las interacciones de las células progenitoras hematopoyéticas con diferentes tipos celulares como los fibroblastos, los cuales actúan sobre los procesos de crecimiento y diferenciación; las células endoteliales, que facilitan la migración de los precursores hematopoyéticos desde la médula hacia el torrente sanguíneo, y los osteoblastos que mantienen la hematopoyesis gracias a la producción de factores estimulantes de colonias granulocíticas y monocíticas, y al igual que los fibroblastos y las células endoteliales, permiten la adhesión de células primitivas hematopoyéticas CD34⁺^[11].

Se ha descrito que muchas poblaciones de células troncales en general, como las células troncales mesenquimales, musculares, geminales y de CTH en particular son altamente heterogéneas^[12]. Cualquier célula, puede tener diferentes opciones durante su existencia, si se trata de una célula eucariota elegirá aquella que sea más conveniente para el individuo del cual forma parte. Dicha elección se hace en respuesta a las diferentes señales que se encuentran en el entorno celular. Estas opciones son proliferar, diferenciarse, permanecer en quiescencia o morir^[6].

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN PROCESOS DE AUTORRENOVACIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CTHS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

El destino de una célula y su existencia se regulan en base a su respuesta a las diferentes señales que se encuentran en el entorno celular, como en el caso de la autorrenovación para la cual las señales intrínsecas que la modifican son: la expresión de Bmi-1, Gfi -1, PTEN, STAT5, Tel/Atv6, p21, p18, MCL-1, Mel-18, RAE28 y HoxB4^[6]. Las señales extrínsecas son las proporcionadas por las vías de señalización Notch, Wnt, SHH y Tie2/Ang-1^[13]. Dependiendo del tipo de señal la célula puede proliferar, diferenciarse, permanecer en quiescencia o morir. En el caso de las CTHs la proliferación está relacionada con la capacidad de autorrenovarse. Se ha propuesto que esto genera un linaje celular por amplificación clonal ^[14]. En el caso del tejido sanguíneo el proceso de autorrenovación es crucial para que las células troncales persistan a lo largo de la vida de los individuos, mientras que el proceso de diferenciación es necesario para que se mantenga el número de células sanguíneas requeridas para el correcto funcionamiento del organismo. Estos dos procesos deben estar en equilibrio, de lo contrario pueden dar origen a enfermedades^[5].

VÍA DE SONIC HEDGEHOG

La vía de señalización de Sonic Hedgehog (SHH) se fue descubierta en 1980 por Nusslein-Volhard y Weischaus quienes estudiaban el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*^[15]. Trabajo subsecuente mostró a dicha vía de señalización altamente conservada en diversas especies y de vital importancia en el proceso de embriogénesis, realizando la función de establecer patrones posicionales durante las etapas tempranas del desarrollo a través de la expansión y contracción del número de células troncales. Mientras que en organismos adultos está involucrada en el mantenimiento y regeneración de tejidos mediante la regulación de: proliferación, apoptosis, modelado de cromatina y autorrenovación, actuando con otros estímulos y con el nicho de la célula troncal^[16].

En ambos casos la señal o ligando se une a las proteínas supresoras de tumor denominadas los receptores Patched (PTC). En vertebrados, hay dos genes homólogos PTC1 y PTC2 siendo PTC1 el que presenta una expresión y función similar al receptor PTC de HH en

Drosophila ^{[17][18][19]}. PTC es una proteína integral de membrana con doce dominios transmembrana. El primer paso en el proceso de señalización por HH es su unión física con PTC lo que, además de activar la vía de SHH, causa la internalización por endocitosis del complejo HH-PTC y su posterior degradación lisosomal ^{[20][21]}.

La internalización del complejo HH-PTC es fundamental para finalizar la señalización inducida por el morfógeno del medio extracelular, y contribuye notablemente al establecimiento y mantenimiento del gradiente de concentración del que depende la diversidad de sus actividades. La regulación de este gradiente es de gran importancia ya que se admite que la diferenciación de las células depende de su posición dentro del mismo. ^[22].

El sistema de transducción de la señal de HH implica a Smoothed (SMO), una proteína con siete dominios transmembrana emparentada con la familia de los receptores Frizzled de Wnt. En mamíferos solo hay un gen SMO ^[23]. La unión de HH a PTC y su posterior internalización libera a SMO. Este último se desplaza y acumula al interior de la célula dando paso al inicio de la cascada de señalización. PTC y SMO actúan mediante una cascada de transducción de señales que culmina con la modulación de la actividad de los factores de transcripción GLI de los que se han identificado tres: GLI-1, GLI-2 y GLI-3, estas proteínas pueden actuar como activadores o represores de la transcripción ^{[24][25]}.

Estudios genéticos y bioquímicos indican que GLI-1 funciona como un activador transcripcional de los genes diana de SHH mientras que GLI-2 y GLI-3 pueden actuar como activadores o represores de la vía de SHH según el contexto. GLI-2 y GLI-3 son los mediadores primarios de la vía de SHH mientras que GLI-1, cuya expresión es transcripcionalmente regulada por GLI-2 y GLI-3, actúa secundariamente para potenciar dicha vía ^[26].

Se ha demostrado que GLI-3, GLI-2 y GLI-1, sufren un procesamiento proteolítico que ocurre en ausencia de HH, en donde PTC reprime la actividad de SMO lo que se traduce en la fosforilación de GLI-1 ^[26] y su subsecuente procesamiento proteolítico. Esto origina una forma corta que se transloca al núcleo donde reprime la transcripción de los genes diana de HH. De forma contraria, la unión de HH a PTC libera a SMO resultando en la inhibición de la proteólisis de GLI-1. En estas condiciones, GLI-1 se transloca al núcleo donde actúa

como un activador transcripcional de los genes diana de HH. La transducción de la señal a partir de SMO, aunque no es completamente conocida, se sabe que implica a un complejo de proteínas de unión a microtúbulos que incluyen Fused (fu), el supresor de Fused [Su(fu)], costal2 (Cos2) y la proteína cinasa A (PKA) [26][27].

La presencia de SHH evita el procesamiento de la proteína GLI-3, con lo que ya no se genera la variante procesada que resulta ser un potente represor transcripcional. Por lo tanto, los dominios de expresión de GLI-3, son aquellos que presentan los mayores niveles de la forma represora, que a su vez corresponden con los niveles más bajos de SHH[27].

En resumen, la activación de la vía de HH conduce a la producción de factores de transcripción activadores (Figura 3), sin embargo, también inhibe la formación de factores de transcripción represores (Figura 4). Es la proporción entre las formas activadoras y represoras de GLI en el núcleo, lo que se ha dado en llamar el código GLI, lo que controla la expresión de los genes dianas de SHH mediante una combinación de variantes de activación y de represión[26].

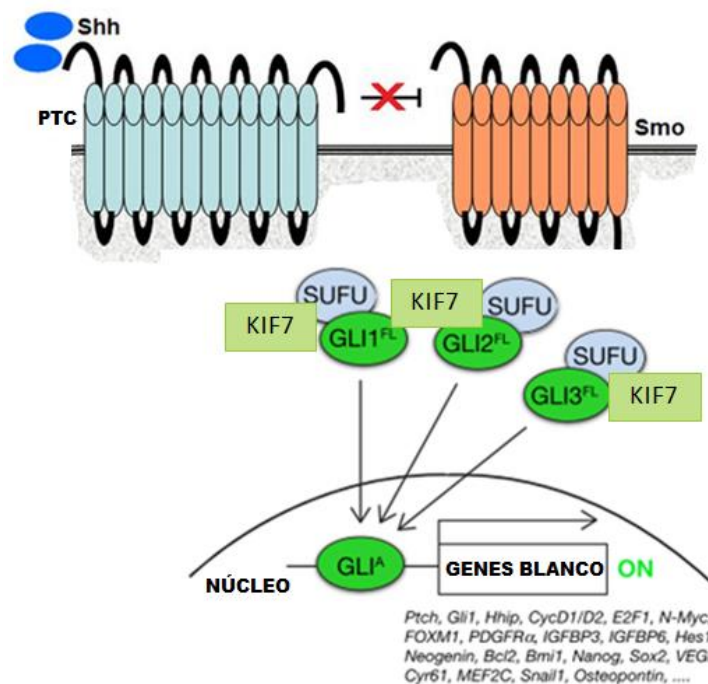


Figura 3. Activación de la vía de SHH. SMO promueve una cascada de señalización que en última instancia conduce a la translocación de formas de GLI activadas de longitud completa (GLIA, verde) en el núcleo, donde inducen la transcripción de genes blanco de HH, por acción de KIF7 sobre el represor SUFU. Modificada de Pandolfi et al, 2015.

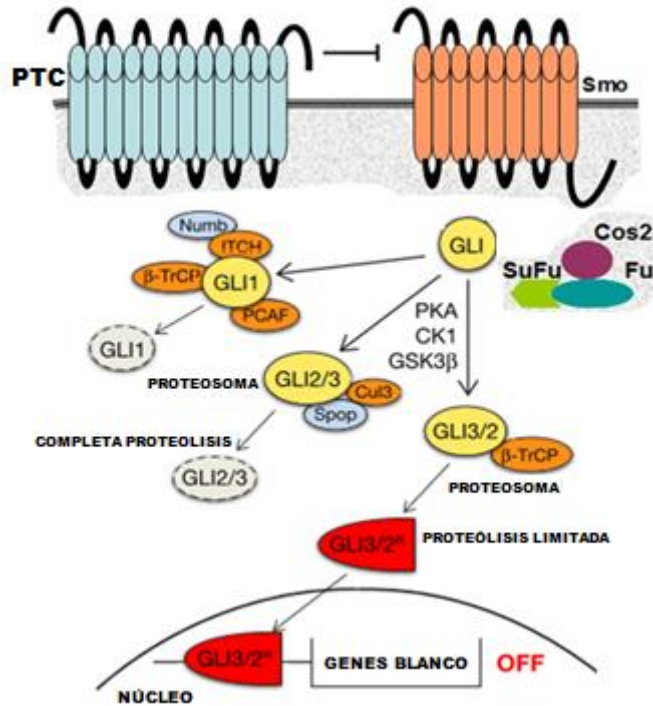


Figura 4. Vía de SHH inactiva. PTCH inhibe SMO. Las proteínas GLI están fosforiladas por PKA, GSK3β y CK1, que crean sitios de unión para la ubiquitinligasa β-TrCP, E3, GLI3 y, en menor medida, GLI2 experimentan degradación parcial del proteosoma, lo que lleva a la formación de formas represoras (GLI3 / 2R, rojo), que se translocan al núcleo donde inhiben la transcripción de genes blanco HH. GLI de longitud completa también puede ser completamente degradado por el proteosoma. Este proceso puede ser mediado por Spop y Cullin 3-basada en E3 ligasa para GLI2 y GLI3, mientras que GLI1 puede degradarse por β-TrCP, la ubiquitina ligasa Itch E3 activada por Numb y por PCAF. Abreviaturas: CK1, caseína quinasa 1; GSK3β, glucógeno sintasa quinasa 3β; HH, Hedgehog; PCAF, factor asociado a la proteína de unión a p300 / CREB (CBP); PKA, proteína quinasa A; PTC, Patched; SMO, Smoothened; Spop, proteína POZ de tipo speckle; SUFU, supresor fusionado; Proteína que contiene repetición β-TrCP, β-transducina. Modificada de Pandolfi et al, 2015.

Las dianas reguladas por la vía de HH varían según la especie y tipo celular y sólo se conocen parcialmente. Algunas de las dianas mejor establecidas y más universales son componentes importantes de la misma vía de señalización como PTC y GLI-1. La expresión de estos genes se utiliza como marcador de células que están activamente transduciendo la señal de HH^[28].

El hecho de que la función de los factores de transcripción GLI sea específico de tejido, estadio y especie, puede depender de su capacidad de formar complejos entre ellos y con otros factores de transcripción que modifican su actividad ^[26]. En este sentido debe mencionarse que se sabe que las proteínas GLI interactúan físicamente con las proteínas Zic1 y Zic 2 y con los productos de los genes HoxD. Como blanco del código GLI relativamente generalizadas se pueden citar Ciclina D1, c-myc, Bcl2, Bmi 1, Snail, GLI-1 y

SHH, entre otros genes blanco que dicha vía transcribe son los que se muestran en la siguiente figura [26].

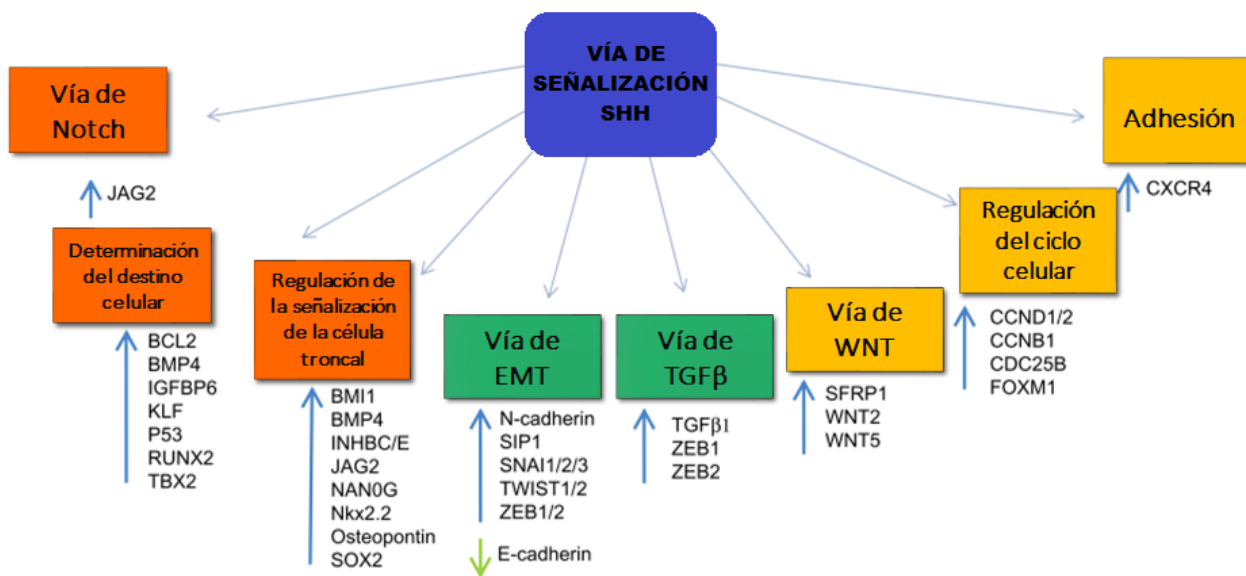


Figura 5. Genes blanco de la vía de SHH y los procesos o vías que en los que están involucrados. Modificado de Cambell et al, 2015.

Aunque la vía de señalización de Hedgehog (HH) se descubrió y estudió inicialmente debido al importante papel que desempeña durante el desarrollo embrionario, recientemente se ha puesto de manifiesto su implicación en una gran variedad de tumores y en el mantenimiento de las células troncales de varios tejidos. Esto hace que el identificar y comprender en lo posible la señalización HH en eventos patológicos sea de extrema importancia para la salud humana.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE TIPO B

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético. Son enfermedades neoplásicas que se deben a mutación somática de la célula progenitora, según su estirpe celular afectada, ya sea la línea mieloide o la linfoide, su evolución varía desde las que conducen rápidamente a la muerte hasta las que evolucionan con lentitud, y se les conoce como agudas o crónicas, respectivamente [29].

La leucemia linfoblástica aguda de tipo B (LLA-B), es una de las alteraciones con mayor malignidad en el SH. Presenta un riesgo muy alto entre la población infantil, ya que es

considerada la patología oncológica más frecuente entre individuos menores de 20 años. A nivel mundial se estima que más del 75% de la totalidad de las neoplasias malignas diagnosticada en esta población, corresponde a LLA-B ^[30].

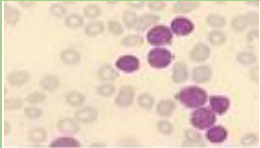

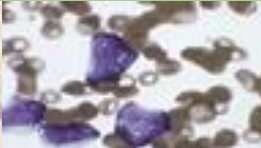
En México, tan sólo en el 2005, la LLA-B, representó el 83.3% del total de las neoplasias diagnosticadas en menores de 18 años. Por ejemplo, en el Hospital del Niño y del Adolescente Morelense de 1998 al 2010 se presentaron 190 casos de LLA-B con un promedio de 16 casos por año ^[31], siendo la primer causa de muerte oncológica en la población infantil morelense.

Esta patología radica se origina en los linfoblastos de células B, con alta proliferación de estas células transformadas. Además, del bloqueo en su diferenciación debido a mutaciones somáticas que afectan una o más de las vías de señalización intracelular que participan en la determinación, maduración y diferenciación. Esto, favorece a que se presente una infiltración de poblaciones inmaduras del linaje B en la médula ósea (MO) ^[30].

En los últimos años, se han incorporado técnicas de diagnóstico más certeras para la LLAB, que se basan en la morfología y la etapa en la cual se produce esta proliferación clonal, así como cambios en la integridad del genoma del paciente. Estas características son la base de la clasificación molecular de la enfermedad ^[32]. La clasificación propuesta por la Sociedad Franco-americano-británico (FAB), es una clasificación basada en la morfología de las células leucémicas. Bajo este sistema la LLA presenta tres variantes morfológicas L-1, L-2 y L-3. La evaluación del fenotipo inmunológico define el linaje celular comprometido y es fundamento para la clasificación actual de las entidades clínico-biológicas que plantea la OMS. Así mismo se han identificados anormalidades citogenéticas en las células de LLA, las cuales actualmente definen subtipos pronósticos y determinan el esquema terapéutico. (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros empleados para la clasificación FAB de las leucemias. Tomado y editado de Organización Mundial de la Salud, 2008; Sabbatini et al 2010; Campo et al, 2011.

CLASIFICACIÓN FAB DE LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS			
Característica	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande	Grande

Cromatina celular	Fina o en grumos	Fina	Fina
Forma nuclear	Regular, hendiduras	Irregular, hendiduras	Regular, oval y redondo
Nucléolo	Indistinguible	Grande, >1 por célula	Grande >1 por célula
Cantidad de citoplasma	Escaso	Moderado	Abundante
Basófilia citoplasmática	Leve	Leve	Prominente
Vacuolas citoplasmáticas	Ausentes	Ausentes	Presentes
Morfología			

CLASIFICACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Pre-B Temprana	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24
Pre B común	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10
Pre B tardía o transicional	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20
Pre B	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC
Células B o maduras	HLA-DR, TdT, CD19, CD22, CD24, CD10, CD20, IgC, IgS

TRANSLOCACIONES PRESENTES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

TRANSLOCACIÓN	GEN/ REARREGLO GENÉTICO
t (1;19) (q23, p13.3)	E2A/PBX1 o TCF3-PBX1
t (9;22) (q34; q11.2)	BCR/ABL
t (11q23), t (4;11) (q21; q23), t (11;19) (q23; p13.3)	MLL/AF4
t (8;14) (q24; q32)	MTC/1Gh
t (1;14) (p32; q11)	TTG2/TCR o TAL1
t (12;21) (p13; q22)	TEL/LMA1
t (5;14) (q31; q32)	IL3-IGH
t (10;14) (q24; q11)	HOX11
t (2;8) (p12; q24)	MYC
t (8;22) (q24; q11)	MYC

c/C, citoplasmático; S, membrana; t, translocación; q, brazo largo del cromosoma; p, brazo corto del cromosoma.

TRATAMIENTO DE LA LLA-B

Las asignaciones de tratamiento con base en la estratificación de riesgo de los pacientes es la principal estrategia terapéutica que se utiliza en niños con esta patología. Este enfoque permite que los niños quienes históricamente han obtenido muy buenos resultados con una terapia convencional no sean tratados con terapias más intensivas y tóxicas, las cuales pueden orillarlos a la muerte ocasionada por el mismo tratamiento; mientras que a la vez permite a los niños que históricamente han tenido menos probabilidades de supervivencia a largo plazo, el recibir terapias más intensivas que puedan aumentar sus probabilidades de curación^[33].

Un subconjunto de los factores pronósticos conocidos p. Ej., edad, recuento de glóbulos blancos (GB) al momento del diagnóstico, presencia de anormalidades citogenéticas específicas se usan en la estratificación inicial de los niños con LLA en grupos de tratamiento que constan con varios grados de riesgo de fracasar ante el tratamiento (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos de riesgo de pacientes con leucemia linfoblástica aguda al diagnóstico. Tomado y editado de la página del Instituto Nacional del Cáncer EUA y del Grupo de Oncología Infantil EUA.

ESTRADIFICACIÓN DE RIESGO DE LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICA AGUDA AL DIAGNOSTICO				
PARÁMETRO	RIESGO			
	BAJO	HABITUAL	ALTO	MUY ALTO
Edad	>1 año, <10 años	1-9 años	<1 año >10 años	>10 años
Sexo	Cualquiera			
Glóbulos blancos	<10000/uL	<50, 000/uL	>50,000 uL	-
FAB	L1	L1/L2	L3	-
Inmunofenotipos	LLA de precursores de células B CD10+	LLA de precursores de células B CD10+/-	LLA de células B maduras/LLA de células T	-

Ploidías	>53 Cromosomas dobles trisomías de los cromosomas 4 y 10; trisomías triples de los cromosomas 4, 10 y 17	-	<46 cromosomas	24 a 28 cromosomas 68 a 80 cromosomas >80 cromosomas
Anomalías genéticas	t (12;21)	-	t (9;22) t (8;14)	t (v;11q23), t (4;11) (q21; q23), t (11;19) (q23; p13.3)
E consuÍndice de DNA	>1.16	1-1.15	<0.8	<0.6

Muchos de los avances terapéuticos que han dado como resultado un aumento en la tasa de supervivencia de niños con LLA, han sido logrados a través de ensayos clínicos a nivel nacional, y resulta apropiado el ofrecerle tanto a niños como adolescentes con LLA-B, que participen en estos ensayos. Además, se requiere planificar un tratamiento que conste de un equipo multidisciplinario de especialistas en cáncer pediátrico con experiencia y habilidad en el tratamiento de las leucemias pediátricas para determinar e implementar el mejor tratamiento. El mejor lugar para llevar a cabo este tratamiento es en un centro oncológico pediátrico^[30].

El tratamiento de los niños con LLA se divide en etapas:

- **Inducción a la remisión:** En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de ADN, como vincristina, prednisona y L-asparginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina o mitoxantrona para adultos, éstos no producen daño a la médula ósea normal y actúan pronto; sin embargo, no son útiles para el tratamiento a largo plazo. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90%. El esquema de inducción con índice de remisión más alto incluye vincristina, dexametasona, daunorrubicina y ciclofosfamida con remisión del 91%.

Los programas de inducción cada vez son más agresivos, lo que aumenta la frecuencia de las remisiones y mejora la supervivencia de los pacientes. Si los glucocorticoides no se prescriben sino hasta el segundo mes de la inducción, disminuye la supervivencia libre de enfermedad; la resistencia a los glucocorticoides se vincula con resistencia a otros antineoplásicos. La administración de dexametasona durante la inducción y el mantenimiento tiene mejores resultados de supervivencia que quienes reciben prednisona. Si en esta fase se administran dexametasona o metilprednisolona en cursos cortos de cuatro días, se logra inducir la indiferenciación de blastos mieloides y la aparición de progenitores hematopoyéticos CD34, con acortamiento de la leucopenia inducida por la quimioterapia [30].

- Tratamiento post-remisión o consolidación: Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse pronto, después de la fase previa. En esta fase el objetivo es destruir las células residuales que han superado la etapa previa; se pueden emplear medicamentos que afectan la síntesis de ADN y que pueden destruir las células en reposo o fuera del ciclo G0 del ciclo celular. Aquí se administran altas dosis de metotrexato, con o sin 6-mercaptopurina, L-asparginasa y citarabina, o bien combinación de dexametasona, vincristina, L-asparginasa, doxorubicina y tioguanina, con o sin ciclofosfamida [30].

- Terapia de mantenimiento ó continuación: Conocido como mantenimiento o continuación de la remisión, tiene como objetivo destruir las últimas células residuales leucémicas. Por razones aún no entendidas debe darse tratamiento a largo plazo; quizá por la necesidad de eliminar las células leucémicas o la enfermedad mínima residuales, o detener su crecimiento hasta que suceda su apoptosis celular. Con la administración de medicamentos que intervienen en la síntesis de ADN, como mercaptopurina y metotrexato, se genera la mielosupresión. Estos fármacos son tolerados adecuadamente y se administran durante dos o tres años [30].

Cada una de estas etapas del tratamiento son esenciales para un resultado exitoso. En todos los pacientes se lleva a cabo una fase de intensificación de la terapia después de una inducción a la remisión. La intensidad, tanto de la terapia de inducción como postinducción

se determina mediante factores de pronósticos clínicos y biológicos que se utilizan para las asignaciones de tratamiento basadas en el riesgo.

Existen casos en los que aun cuando se concluye el tratamiento hay reincidencia de la leucemia, esta condición repercute negativamente en el pronóstico del paciente que la manifieste. Esta condición ha sido relacionada con la enfermedad mínima residual (EMR), que se define como la presencia de poblaciones residuales de células leucémicas en la MO una vez concluido el esquema de tratamiento. La identidad de esta población celular no ha sido del todo establecida, pero se ha reportado que estas poblaciones conservan marcadores CDs que han permitido identificar diferentes subpoblaciones que presentan grados muy variados de diferenciación, proliferación y capacidad de autorrenovación^[34].

Así mismo, estudios recientes indican que estas células están involucradas en la resistencia al tratamiento. Se ha propuesto que estas células se mantienen en quiescencia en sitios especializados, por lo que mediante modificaciones en el nicho hematopoyético y su interacción con otras moléculas se podría afectar su sobrevivencia. Lo anterior será de vital importancia para la detección y caracterización de sus perfiles de expresión y su eliminación, lo cual podría ser empleado para mejorar el éxito terapéutico^[35].

Gracias a que en las últimas décadas se han logrado avances significativos en el tratamiento de la LLA, además de su adecuada estadificación de riesgo del paciente, se ha logrado, que en países desarrollados los porcentajes de sobrevida libre de eventos alcance a los cinco años cerca del 80%^[36].

Sin embargo, en México la supervivencia global a los 4 años se encuentra alrededor del 65%; muy por debajo de los estándares en países desarrollados^[37]. Así mismo, se reporta que alrededor del 30% de los niños con LLA fallecen por causas relacionadas con la enfermedad o su tratamiento, por lo cual es necesario identificar nuevas vías de señalización que de manera selectiva se activen en la población transformada que permitan a futuro proponer nuevas alternativas de moléculas blanco para establecer tratamientos más precisos y contender con la principal falla, que es la presencia de resistencia al tratamiento convencional^[36].

La resistencia al tratamiento puede ser de tipo intrínseca o de novo. La primera se refiere a la que se desarrolla de forma natural en ausencia de mecanismos de selección, es decir, las células ya la presentan antes de ser sometidas a un tratamiento. Mientras que la resistencia de novo es adquirida o secundaria y se desarrolla bajo una presión selectiva, como lo es el tratamiento quimioterapéutico. Los mecanismos primarios que confieran a las células cancerígenas la capacidad de resistencia al tratamiento son los siguientes: alteración de los blancos terapéuticos, eflujo de los fármacos mediante la activación de las bombas de eflujo ABC, daño en la reparación de DNA, inhibición de apoptosis, transición epitelio mesénquima y cambios epigenéticos (Figura 6) [38].

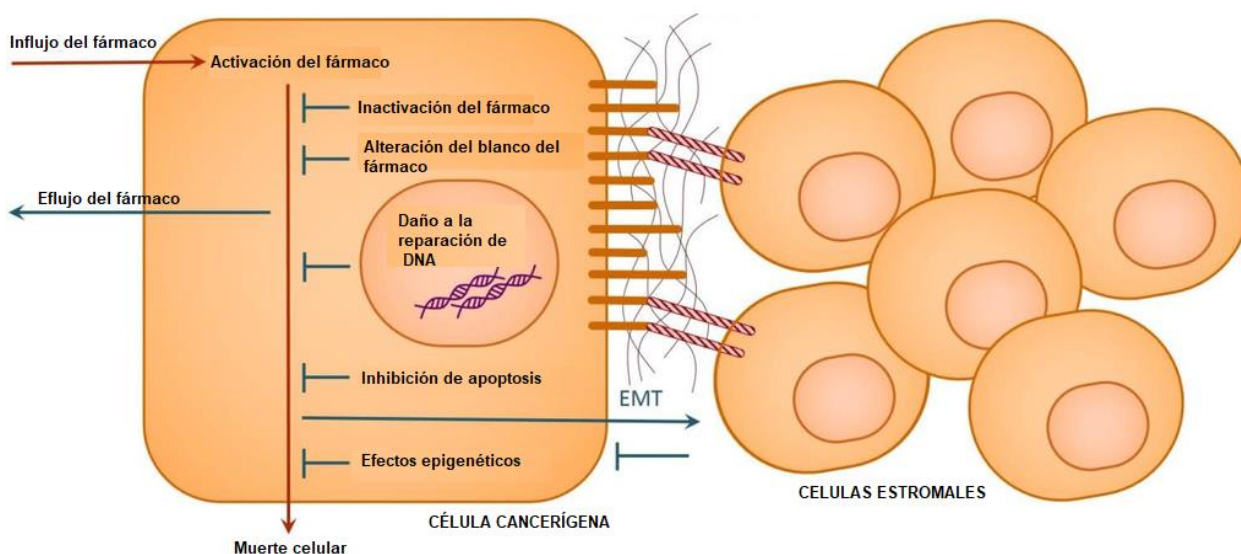


Figura 6. Representación de los mecanismos que confieren a las células cancerígenas la capacidad de resistencia al tratamiento. Modificado de Houssman et al, 2014.

Algunos de los mecanismos identificados en las células presentes en la falla terapéutica como elementos que permiten la sobrevivencia a la quimioterapia concuerdan con algunas características reportadas para las células troncales cancerígenas (CTC); que a su vez guardan relación con las propias de las células troncales naturales del tejido, que sin embargo, presentan alteraciones en su capacidad de respuesta a los estímulos de proliferación, diferenciación, supervivencia, presencia de transportadores ABC, que permiten mayoritariamente colocarlas en la fase G0 del ciclo celular [34].

En el caso de las leucemias éstas reciben el nombre de Células Troncales Hematopoyéticas Leucémicas (CTHLs), las cuales son una población celular que presenta aberraciones en la

expresión de: oncogenes, factores de crecimiento, receptores o ligandos involucrados en el control de la proliferación, supervivencia o diferenciación del linaje de las células del SH [39]. Las CTHLs están muy bien descritas para la Leucemia Mieloide Aguda, pero la presencia y relevancia de estas en LLA no es clara aún. Las CTHLs presentan subpoblaciones con fenotipos primitivos, manifestando los marcadores CD34+ y CD38+ y CD123. Este último es un marcador único de las CTHLs; pero faltando la expresión de CD90 y CD117^[40].

En los últimos años se ha reportado que las CTHLs presentan heterogeneidad en cuanto a la capacidad para repoblar a la MO y regenerar la leucemia, lo cual ha propuesto la existencia de distintas clases de CTHLs con diferente capacidad de autorrenovación, lo cual sugiere, que las vías que regulan los procesos normales de diferenciación y autorrenovación en células hematopoyéticas no están completamente inactivas en las CTHLs ^[40].

PAPEL DE LA VÍA DE SONIC HH EN LOS EVENTOS DE TRANSFORMACIÓN

Los genes blanco de la vía de SHH están involucrados en procesos de proliferación, autorrenovación, supervivencia y angiogénesis en CTH, células embrionarias y mesenquimales. Estos procesos se encuentran afectados debido a mutaciones en miembros clave de dicha vía, como por ejemplo la pérdida de la función de PTC-1 o sobreexpresión del gene activador de SMO, que resulta en una activación independiente de ligando HH, así como en activaciones dependientes del ligando HH por vías autócrinas o parácrinas. Los mecanismos de sobreactivación ocasionados por mutaciones en la vía de SHH se han evidenciado en más del 90% de los carcinomas de células basales y en el 30% de los meduloblastomas de adultos ^[41].

Así mismo la sobreactivación por mutaciones o cambios epigenéticos del regulador positivo SMO o reducción en la función de sus reguladores negativos PTCH y SUFU ^[42], se ha asociado con una amplia variedad de neoplasias como: carcinoma de piel ^[43], meduloblastoma ^[44], cáncer de pulmón ^[45], entre otros. La información obtenida en los últimos años ha establecido que existen diferentes mecanismos de acción por parte de la vía que se involucran en el proceso de transformación, los cuales son dependientes del tipo de cáncer que se presente.

Lo anterior se confirmó en un estudio en el que se evaluó la expresión de los genes que codifican para esta vía junto con las proteínas requeridas para su señalización (PTC-1, SMO, SHH, GLI-1, GLI-2 y GLI-3); como primer paso se aislaron subconjuntos celulares altamente purificados de células sanguíneas primitivas las cuales expresaban CD34+ y CD38+ , constituyendo una estirpe celular capaz de repoblar *in vivo*, un modelo de leucemia, junto con subconjuntos celulares comprometidos de linaje mielóide CD33+, CD19+ (Tipo B) y CD3+ (Tipo T) y células que comprenden el microambiente hematopoyético[46]. En las poblaciones analizadas se identificó la expresión de los receptores PTC y SM, así como de SHH en las células primitivas y maduras de linaje CD19+, CD33+ y CD3+. Además, en las células aisladas de médula ósea adulta (BM) y de cordón umbilical (HUVEC) se detectó la expresión de los mismos receptores (Figura 7), lo que sugiere que el microambiente de las células primitivas es capaz de transducir las señales de esta vía.

Con lo anterior también se demuestra que los tres factores de transcripción GLI están involucrados en la regulación de la señalización río abajo en la vía, las subpoblaciones primitivas, estromales y HUVEC expresaron estos tres factores, mientras que están ausentes en células comprometidas a linaje mielóide y linfóide, lo que sugiere que SHH no es esencial para la maduración de la célula hematopoyética. Se descubrió también que la adición exógena de SHH soluble puede regular la proliferación de células hematopoyéticas no comprometidas, lo que pone en evidencia que las señales de esta vía son críticas en este proceso (Figura 8) [46].

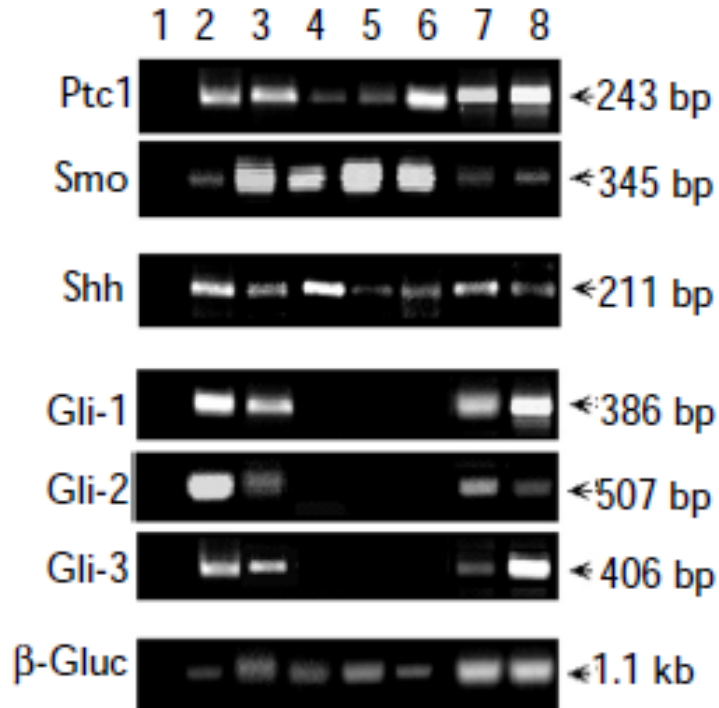


Figura 7. Análisis de la expresión de los genes que codifican para SHH, receptores y efectores en células hematopoyéticas humanas. En el carril 1 control negativo H₂O, carril 2 control positivo cDNA fetal humano, carril 3 Celulas primitivas lin CD34+, CD38+, carril 4 celulas mieloides lin CD33+, carril 5 células tipo B lin CD19+, carril 6 celulas aisladas de CB humano, carril 7 células estromales BM, carril 8 HUVEC, para la detección de PTC1, SMO, SHH, GLI 1/2/3. Tomada de Lin et al, 2010.

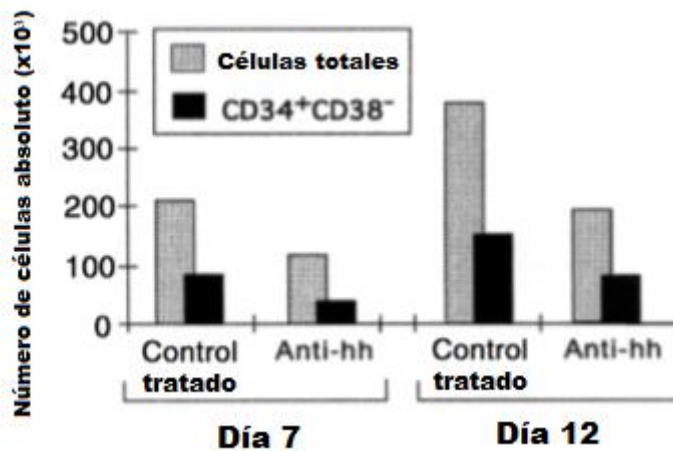


Figura 8. Gráfica de crecimiento celular. Se muestran las células totales barra gris y células CD34⁺CD38⁻ separadas en control tratado con citocinas que promueven la proliferación y el grupo tratado con antígenos contra HH a 7 y 12 días de cultivo, se observa una disminución del 20% de proliferación en el grupo tratado con anti-HH contra el grupo control a los 7 días y una disminución del 30% a los 12 días. Modificada de Lin et al, 2010.

A la fecha no se han detectado mutaciones en las moléculas que participan en la señalización de SHH en las neoplasias hematológicas, sin embargo, se han presentado eventos de modificación epigenética en poblaciones pediátricas de pacientes con leucemia

mieloblástica aguda ^[47]. Se ha resaltado además que muchos de los blancos vía abajo se sobreexpresan en leucemia mieloide aguda y crónica, cuya expresión se ha tratado de relacionar con la quimioresistencia y a la esperanza de vida en estas neoplasias.

Interesantemente los componentes de regulación vía arriba de la señal de transducción se han observado en precursores de LLA. En donde se ha observado que la inhibición de SMO reduce *in vitro* e *in vivo* la expresión de la autorrenovación ^[37]. El fenotipo de las células troncales leucémicas y los objetivos celulares para la transformación en LLA de células troncales leucémicas es aún controversial, además de que se ha reportado que solo una pequeña subpoblación de células actúan como células troncales leucémicas, las cuales pueden ser dianas importantes para los regímenes de tratamiento para los componentes que interfieren con la autorrenovación, lo que promete ser una mejora en la opción terapéutica del tratamiento LLA ^[37].

Algunas de las características que se relacionan con la mala respuesta al tratamiento y el seguimiento del paciente ,como lo son la cuenta de blastos elevados y clasificación de alto riesgo, correlacionan para leucemia mieloblástica aguda con la detección del factor de transcripción GLI-2 que se detectó incrementado en el 60% de los pacientes analizados en un estudio para el cual se aislaron las células CD34 a partir de muestras de médula ósea, en estas mismas muestras se detectaron los genes blanco GLI-1 y PTC-1 incrementados en el 60% de los pacientes^[48]. Evidencias de la falla terapéutica se demostraron en este mismo estudio en un experimento, en el que se generaron ratones con un modelo de leucemia mieloide aguda y con sobreexpresión de SMO y por consecuente sobreactivación de la vía. Esta estrategia evidenció una disminución drástica en la supervivencia (Figura 9), misma que se observó tanto en células de leucemia mieloblástica aguda y en las líneas celulares controles.

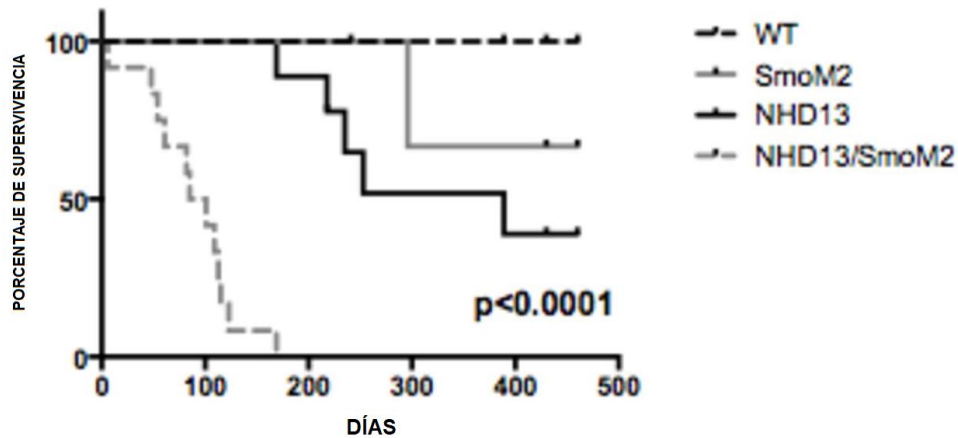


Figura 9. Gráfica de supervivencia elaborada a partir del seguimiento de ratones del tipo: WT, ratón wild type (sin modificaciones), SmoM2, ratón con mutación de inducción a SM, NHD13 ratón con modelo de leucemia mieloide aguda y NHD13/SmoM2, modelo de leucemia mieloide aguda y mutación de SMO. Se muestra una disminución con peso estadísticamente significativo en la supervivencia para el caso del modelo de leucemia mieloide aguda y la sobreexpresión de SMO y por consiguiente sobre activación de la vía de SHH. Modificada de Gondeck et al, 2014.

Por otra parte la expresión de *GLI-1* se relacionó directamente con riesgo citogenético y un evento de supervivencia reducido a los 5 años, la sobreexpresión del mismo predice una alta posibilidad a remisión y una disminución de la supervivencia global [49].

En un estudio realizado por Zhao *et al.* Se reporta que la activación de la vía de SHH se involucra también en el mantenimiento de las células troncales leucémicas de la Leucemia Mieloide crónica, mediante la experimentación de un modelo murino con delección de SMO el cual tuvo como resultado la disminución del pool de este tipo celular y en sentido inverso la sobreexpresión de SMO en un ratón deficiente de SMO con LMC incrementó de forma dramática el pool de este tipo celular [50].

Como se ha evidenciado anteriormente la señalización de SHH, juega un rol crítico en la autorrenovación de las células troncales leucémicas y su regulación, por lo tanto, la inhibición de esta interfiere con la característica troncal de estas células y las induce a diferenciar, lo que idealmente se persigue en el tratamiento contra el cáncer. Actualmente ya se han desarrollado múltiples inhibidores de esta vía que se utilizan para el tratamiento de algunas neoplasias, tal es el caso de la Vismogdegib que actúa sobre el activador SMO inhibiendo la vía en carcinoma de células basales, el cual en su fase 1 de prueba mostró que 18 de 33 pacientes con carcinoma avanzado o con metástasis presentaron respuesta ante este inhibidor. Entre los 15 pacientes restantes, 11 presentaron estabilidad en el proceso de

blanco PTC-1 y GLI-1, lo cual nos da la pauta de la activación de la vía estudiada (Figura 11) y que el inhibidor ciclopamina (IPI926) puede limitar el potencial de autorrenovación y la alta clonicidad de las células leucémicas *in vivo* e *in vitro*, de manera *in vivo* se realizó el análisis de supervivencia con el tratamiento del inhibidor de dicha vía, lo que nos mostró una mayor supervivencia en el seguimiento de los ratones tratados con esta droga (Figura 12) [37].

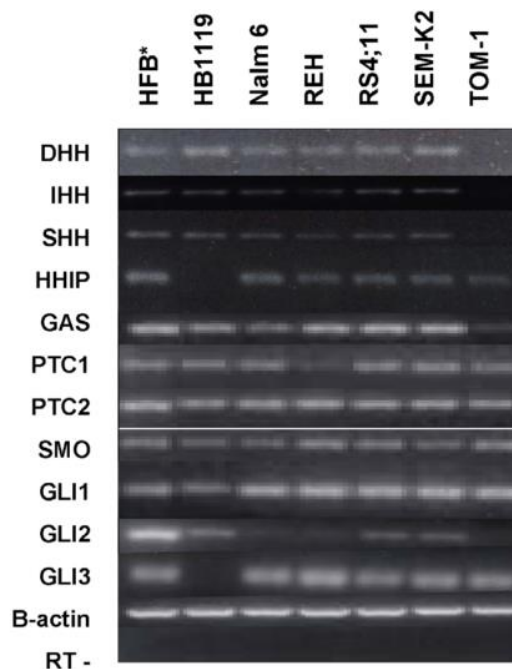


Figura 11. Expresión de los componentes de la ruta de Hh es común en las líneas celulares precursoras B-ALL. Análisis cualitativo de RT-PCR de la expresión génica de la vía Hh en líneas celulares precursoras B-ALL. HFB, cerebro fetal humano, usado como control positivo para todos los experimentos. Para cada línea celular, se realizaron reacciones de control positivo y negativo con cebadores de B-actina con (para demostrar cantidades iguales de plantilla de ADNc a través de cada línea celular) y sin (para descartar contaminación con ADN genómico) transcriptasa inversa. B-ACTIN-denota resultados de PCR a partir de reacciones de síntesis de cDNA que carecen de RT. Líneas celulares precursoras B-ALL: HB 1119 (t11; 19), Nalm6 (t2; 6), REH (t12; 21), RS4; 11 (reordenamiento del gen MLL); SEM-K2 (reordenamiento del gen MLL), TOM-1 (Ph +). La electroforesis se realizó con cada gen por separado a través del panel de líneas celulares. Tomada de Lin, et al, 2010

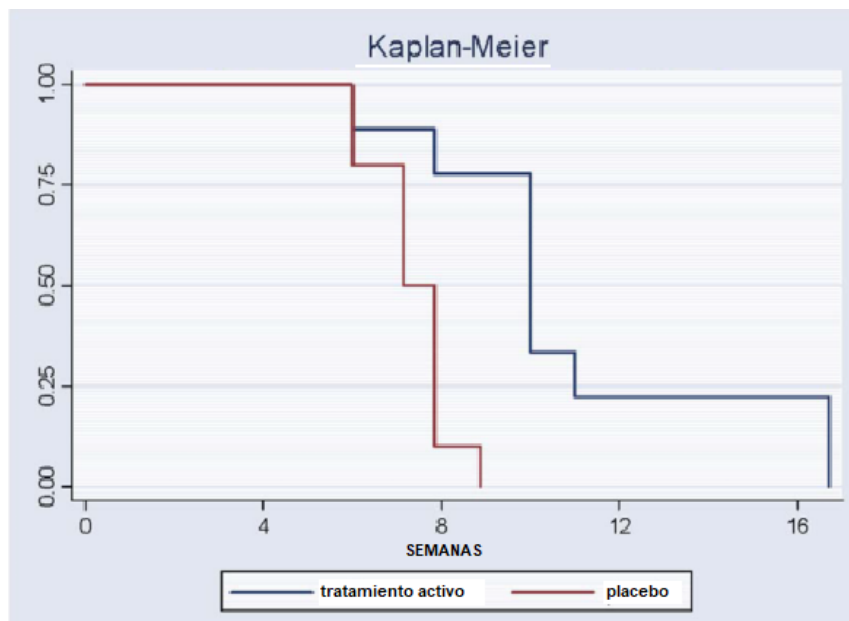


Figura 12. Supervivencia global prolongada de ratones receptores de células REH IPI-926 pretratadas. Los ratones NOD-Scid fueron inyectados por la vena de la cola con células REH que habían sido pretratadas con IPI-926 o vehículo *in vitro* antes de la inyección. Se siguió a los ratones para la progresión de los síntomas y la supervivencia global, y los ratones receptores de células pretratadas tuvieron una supervivencia global estadísticamente significativamente más larga (70 días frente a 50 días, p , 0,001). Modificada de Lin et al, 2010.

Además de esto se ha detectado la mutación G143S, mutación somática en la región de la proteína SHH que interactúa con PTC-1, en un paciente ^[52]. Dicha mutación puede tener un efecto en la desregulación de la vía llevando a la sobreexpresión de sus genes blanco ocasionando eventos de proliferación celular descontrolada. A pesar de todo esto se desconoce mucho del papel que posee la señalización de la vía de SHH en la LLA-B por lo que son necesarios más esfuerzos en el entendimiento de esta.

En cuanto a la identificación de la expresión de la vía SHH en pacientes con LLA se tiene como antecedente el análisis de microarreglos realizados en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría en colaboración con el Dr. Óscar A. Pérez Gonzáles del Laboratorio de Oncología Experimental a partir de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

Identificación de los casos de falla terapéutica a la ventana esteroidea y a la inducción a la remisión en la base de datos proporcionada por el Laboratorio de Oncología Experimental:

Se llevó a cabo el análisis de la base de datos clínicos y moleculares de pacientes con LLA-B proporcionada por el Laboratorio de Oncología experimental y se identificaron los casos

de falla terapéutica, tanto en el periodo de ventana esteroidea como en el periodo de inducción a la remisión; por medio del porcentaje de blastos en médula ósea.

Para el análisis de los microarreglos, se generaron 3 grupos para su análisis, los cuales se integraron de la siguiente forma.

- ❖ Grupo de respuesta a la ventana esteroidea: Integrado por los casos que no tuvieron respuesta a la ventana esteroidea contra los que tuvieron respuesta a la ventana esteroidea.

- ❖ Grupo de respuesta a la Inducción a la Remisión: Integrada por los casos con respuesta a la Inducción a la remisión y por los casos sin respuesta a la inducción a la remisión.

- ❖ Grupo por grado de riesgo: integrado por los casos de alto riesgo contra los casos de riesgo habitual.

Cada uno de estos grupos fue analizado en el programa para microarreglos Partek Genomic, en el cual se realizó el análisis por características de acuerdo con las variables planteadas anteriormente, se hizo el análisis de componentes principales de la misma forma, seguido de esto se realizó la detección de los genes diferencialmente expresados de acuerdo con cada variable, de la siguiente forma:

Se establecieron los grupos con las variables de contraste:

- ❖ Grupo de respuesta a la ventana esteroidea: Sin respuesta a la ventana esteroidea vs respuesta a la ventana esteroidea.

- ❖ Grupo de respuesta a la inducción a la remisión: Sin respuesta a la inducción a la remisión vs respuesta a la inducción a la remisión.

- ❖ Grupo de riesgo: Alto riesgo vs Riesgo Habitual.

Posteriormente se generó la lista de genes con el ajuste de los valores de p y FDR en valores significativos para tener diferencia significativa entre las variables establecidas en cada grupo. De cada grupo se crearon dos listas de genes una ajustada a los genes sobre expresados y otra a genes subexpresados.

A partir de la lista de genes obtenida se realizó un segundo análisis mediante el programa en línea David Bio Info, en el cual se deposita la lista de genes (sobre expresados y subexpresados), se seleccionaron los procesos celulares con valor de p más significativos, a partir de los cuales se realizó la búsqueda de los genes pertenecientes a la vía de Sonic HH. La información obtenida de la lista de genes de sobreexpresión se contrastó con la obtenida a partir de la lista de genes subexpresados, para cada grupo planteado inicialmente.

Se generaron tres grupos para el análisis de los microarreglos:

1. Grupo de respuesta a la ventana esteroidea:

Sin respuesta a la ventana esteroidea: 24 casos

Con respuesta a la ventana esteroidea: 2 casos

2. Grupo de respuesta a la Inducción a la Remisión:

Sin respuesta a la inducción a la remisión: 4 casos

Con respuesta a la inducción a la remisión: 22 casos

3. Grupo por grado de riesgo:

De alto riesgo: 20 casos

Riesgo habitual: 6 casos

Análisis de lista de genes sobre expresados y subexpresados de los grupos planteados en el programa David Bio info, a partir de las listas de genes analizadas para el grupo de Respuesta a la ventana esteroidea, se obtuvieron los siguientes resultados:

Para el Grupo de respuesta a la ventana esteroidea:

SUBEXPRESIÓN SIN RESPUESTA A LA VE		SOBREEXPRESIÓN SIN RESPUESTA A LA VE	
VALOR	GENES	VALOR	GENES
2.60E-104	SUFU	2.70E ⁻³⁹	PTCH1
9.00E-09	SUFU	2.70E ⁻⁰⁸	PTCH1

	GLI 3		
1.60E-07	SHH	4.00E ⁻⁰⁶	PTCH1
	GLI 3		

Los términos mostrados fueron en los que se lograron ubicar los genes de la vía de señalización de Sonic HH por un lado se tienen los genes subexpresados en los casos que no tuvieron respuesta a la ventana esteroidea en los cuales encontramos genes que participan en la inactivación de la vía como lo son el gen Suppressor of fused homolog (SUFU) y GLI 3 lo cual evidencia que la vía está expresada en los casos de falla a la ventana esteroidea, lo anterior se ve reflejado en la lista de sobreexpresión en la cual en estos mismos procesos encontramos sobre expresado el gen PTCH1, el cual participa en la activación de la vía actuando como receptor del ligando Sonic HH. El hecho de que el ligando Sonic HH esté en la categoría de los genes sub expresados nos da la pauta a pensar que en estos casos la vía se active de forma endógena.

Para el grupo de respuesta a la Inducción a la Remisión:

SUBEXPRESIÓN GRUPO SIN RESPUESTA A LA IR		SOBREEXPRESIÓN GRUPO CON RESPUESTA A LA IR	
VALOR DE P	GENES	VALOR DE P	GENES
1.60E ⁻¹³¹	SUFU	1.90E ⁻⁸²	PTCH1
			GLI-2
6.80E ⁻⁰²	GLI 3	6.10E ⁻²³	PTCH1
			GLI 1
7.50E ⁻⁰⁴	GLI-3	1.40E ⁻¹⁷	SHH
			PTCH1
			SMO
			GLI 2

Los genes sub expresados en los casos que no tuvieron respuesta a la inducción a la remisión fueron el gen SUFU y GLI 3 como en el grupo anterior lo cual evidencia que la vía está expresada en este grupo, mientras que en la lista de sobreexpresión encontramos genes que participan en la activación de la vía, lo que evidencia aún más la expresión de esta vía en los casos de falla en inducción a la remisión.

Para el grupo de riesgo:

SUBEXPRESION RIESGO		SOBREEXPRESIÓN RIESGO	
VALOR	GENES	VALOR	GENES
N/A	N/A	6.60E-51	PTCH 1
N/A	N/A	5.20E-08	PTCH 1
			GLI 3
N/A	N/A	2.40E-05	PTCH 1
	N/A		GLI 3

Para el grupo de alto riesgo no se logró encontrar una diferencia que nos indique en qué estado pueda estar expresada la vía ya que únicamente se logró identificar en los genes sobre expresados a PTCH 1 que es activador de la vía y a GLI 3 que funciona como un supresor, mientras que en los genes sub expresados no se logró identificar a ninguno de los genes de esta vía, lo que nos indica que la elección de este grupo y variable no son buena referencia en la búsqueda de la expresión de la vía de Sonic HH.

Con los resultados anteriores podemos asegurar que la vía de Sonic HH es un candidato funcional en los grupos analizados, sin embargo, se requiere de pruebas adicionales para corroborar la activación de esta vía en los grupos analizados.

Estos resultados poseen gran impacto para el proyecto en curso, ya que funge como antecedente al cumplimiento de uno de los objetivos planteados, el cual es asociar la falla terapéutica de los pacientes con LLA con la presencia de la expresión de los genes blanco

de la vía Sonic HH. Sin embargo, dicho antecedente requiere de pruebas adicionales para corroborar la activación de esta vía en los grupos que presentan falla terapéutica.

Por todo lo antes mencionado resulta ser importante estudiar la presencia de esta vía en la LLA tipo B, debido a su estudio limitado y análisis con el fin de encontrar la importancia de la activación de esta vía vinculada a la frecuente falta de respuesta al tratamiento manifestada en esta patología de alto impacto en la etapa pediátrica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LLA tipo B es una enfermedad de gran importancia en el sector infantil debido a su alta incidencia. Representando el 75% de la totalidad de las neoplasias malignas diagnosticadas en este sector de la población. La selección del esquema y el éxito del tratamiento de esta patología radica en la adecuada estratificación de riesgo en el que se posicione el paciente, lo cual está vinculado directamente con el grado de indiferenciación de la población en cuestión, así como de la presencia de factores genéticos (translocaciones) y celulares (tasa de proliferación, etapa preferente del ciclo celular).

Actualmente en México la tasa de éxito del tratamiento se encuentra alrededor del 65%. Este dato está por debajo de los estándares de éxito reportados en los países desarrollados. Por otro lado, se ha reportado que aproximadamente el 30% de los niños con LLA fallecen por falla terapéutica. Esta, es consecuencia de la falta de eficacia terapéutica en respuesta a los medicamentos en alguna de las fases del tratamiento. Por lo anterior, es necesario buscar nuevas moléculas blanco que permitan desarrollar tratamientos más efectivos. A nivel internacional el porcentaje de los pacientes que presentan una inducción a la remisión es del 80% de los casos, indicando que existen subpoblaciones de pacientes que siguen siendo insensible a la quimioterapia (20 %), mientras que en el caso de la población latina se requiere de un tratamiento prolongado e intenso para lograr la remisión, lo que origina riesgo de secuelas graves y un incremento en el gasto hospitalario. De esta manera, es necesario identificar y caracterizar los mecanismos que se presentan en el proceso de transformación de nuestra población e investigar si éstos están relacionados con la falta de respuesta terapéutica en alguna de las fases del tratamiento.

Nuestra propuesta es que el factor de mayor importancia en el desarrollo de resistencia al tratamiento podría radicar en los mecanismos que participan en su transformación como son: a) incremento de la autorrenovación, b) Inhibición del proceso de diferenciación, c) Favorecer un estado de quiescencia y d) Sobreactivación en las vías de señalización que participan de estos procesos. Una de las vías de señalización que se ha demostrado que participa en estas respuestas celulares es la vía de HH, que resulta ser característica distintiva de varias Células Troncales, y que en los últimos años se ha relacionado con las

CTHLs. La evaluación inmunofenotípica de las LLA ha permitido evidenciar la heterogeneidad celular en la LLAB, con lo que se propone la existencia de subpoblaciones de CL atípicas, mismas que se han reportado en nuestro grupo de investigación, que alcanzan un 25% a 30%, cuyo porcentaje se correlaciona con la fracción que manifiesta la falla terapéutica en México. Por lo que proponemos que la vía de Sonic HH en las subpoblaciones de células leucémicas, podría estar asociada a la falla de respuesta a la inducción de la remisión durante su tratamiento.

HIPÓTESIS

En los pacientes con leucemia linfoblástica B se asocia la falla de respuesta a la fase de inducción a la remisión con la activación de la vía de señalización de Sonic HH.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si los pacientes con LLA-B que presentan falla de respuesta en la fase de inducción a la remisión presentan la expresión de los genes blanco de la vía Sonic HH.

PARTICULARES

- Detectar la activación de la vía de señalización de SHH, mediante la presencia del RNAm de sus genes blanco.
- Integrar una base de datos con la información de translocaciones, y seguimiento de la respuesta terapéutica en pacientes con LLA-B.
- Evaluar si hay una asociación de la expresión de los genes blanco de la vía de SHH con los datos clínicos obtenidos en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda B en el Instituto Nacional de Pediatría.
- Evaluar si la activación de la vía de SHH se asocia con la falla de respuesta a la fase de inducción a la remisión en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda B.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

MUESTRAS:

Se procesarán muestras de aspirado de médula ósea (AMO) y/o sangre periférica (SP) de pacientes del Instituto Nacional de Pediatría (INP) con LLA de tipo B de nuevo diagnóstico, el muestreo se realizó como parte de la intervención médica para el establecimiento del diagnóstico el cual se realiza en base a la citomorfología e inmunofenotipo de las células leucémicas, procedimientos que son realizados a cargo del Servicio de Oncohematología.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Casos con diagnóstico de LLA de tipo B de nuevo diagnóstico.
- Muestras cuya calidad del ácido ribonucleico permita la amplificación del gen de GAPDH (gen constitutivo control) al menos a partir de 25 ciclos.
- Que se tengan los datos de la presencia de translocaciones, así como la clasificación de riesgo de cada uno de los casos.
- Que se cuente con el seguimiento clínico de los pacientes al menos hasta terminada la fase de inducción a la remisión.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Aquellas muestras que no correspondan al diagnóstico de LLA de tipo B de nuevo diagnóstico.
- Casos en los que se haya iniciado el tratamiento antitumoral antes de la toma del Aspirado de médula Ósea.
- Casos en los que no se cuente con los datos clínicos necesarios.

LÍNEAS CELULARES

En este proyecto se llevó a cabo la estandarización de la detección de los componentes de la vía de SHH (PTC-1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1) a partir de líneas celulares que se

encuentran disponibles en nuestro grupo de investigación. Inicialmente se realizó un PCR en condiciones basales (1.8 mM de MgCl₂ a 54°C para seleccionar aquellas líneas que expresaron el RNAm de cada uno de los componentes de SHH.

MÉTODOS

PURIFICACIÓN DE LEUCOCITOS DE MUESTRAS DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA Y/O SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA Y MUESTRAS CONTROLES

A partir de las muestras de MO, se purificó la población leucocitaria. Para esto se utilizaron 200 µL de AMO o sangre periférica a los cuales se les adicionó 3 mL de Solución de Lisis de Eritrocitos 1X a 4 °C. Esta se homogeneizó por inversión por un lapso de 2 min y se incubó a 25° C por 5 min. La solución 1X se preparó a partir de una Solución Stock de Lisis de Eritrocitos 10 X (NH₄Cl, 1.5 M; NaHCO₃, 100 mM; EDTA, 10 mM; pH 7.4). Posteriormente, la muestra se centrifugó a 300 g por 5 min a 25° C, transcurrido este lapso se retiró la fase acuosa cuidando de no despegar la pastilla celular del fondo del tubo. La pastilla celular se lavó dos veces en volúmenes variantes entre 2 y 5 mL de medio RPMI a 37 dependiendo del tamaño de la pastilla celular y posteriormente se centrifugo a 300 g por 5 min a 25° C. Después, se solubilizó una vez más la pastilla celular a 37°C con volúmenes diferentes (500 µL a 5 mL) de medio RPMI de acuerdo con el tamaño de la pastilla celular.

Para determinar el rendimiento celular y viabilidad del proceso de purificación de leucocitos se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión celular y se mezcló con 10 µL de solución de azul de Tripano 0.4% (Gibco®, Life Technologies; USA). Posteriormente, se realizó el conteo de las células con ayuda de una cámara de Neubauer. En este paso se realizó el conteo de las células refringentes (células vivas) y las células “azules” (células muertas) presentes en los 4 cuadrantes externos de la cámara, así como en el cuadrante central.

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA Y ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE AUTORRENOVACIÓN SONIC HEDGEHOG EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE LEUCOCITOS DE MUESTRAS DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA Y/O SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.

Posterior a la purificación de leucocitos de AMO y/o SP, estos se lisaron de 5 millones a 10 millones de muestras en 1 mL de Trizol® Reagents (Ambion®; Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), prosiguiendo a disgregar adecuadamente la pastilla celular, homogeneizando inmediatamente con ayuda de un Vortex a máxima velocidad, hasta no observar ningún grumo, esto se realizó muestra por muestra. Posteriormente previo etiquetado se guardó el lisado a - 80° C hasta su uso.

Para la extracción de ARN total se empleó el método de Guanidinio-Tiocianato-Fenol-Cloroformo. Para lo cual las muestras de leucocitos lisados en Trizol® Isolation Reagents (Ambion®; Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) se descongeló en hielo de agua. Posterior al descongelamiento, los lisados se homogenizaron con ayuda de un Vortex a máxima velocidad por 2 min, y se agregó por cada mililitro de Trizol® Isolation Reagents (Ambion®; Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), 200 µL de Cloroformo (100% v/v) (J. T. Baker; Avantor Performance Materials, EUA), el total se mezcla vigorosamente por inmersión durante 15 segundos y se incubaron a 25° C durante 3 min. El total se mezcló vigorosamente por inversión y se incubó por 3 min a 25° C. El contenido se centrifugó a 12 000 g durante 15 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y posteriormente se agregó por cada mililitro inicial de Trizol® Isolation Reagents (Ambion®; Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), 500 µl de Isopropanol (100 %v/v), (J.T. Baker; Avantor Performance Materials, EUA) a 4° C, se homogenizó con ayuda de un Vortex a máxima velocidad durante 30 segundos y se incubó durante 18 hrs a -20° C, esto con el fin de precipitar la mayor cantidad de ARN posible.

Posteriormente, las muestras se centrifugarán a 12 000 g por 10 min y se retiró la fase acuosa. La pastilla de ARN fue lavada con 1 mL de EtOH (75% v/v) (EMSURE®; Merck

KGaA, Alemania) a 4° C, para lo cual se empleó un Vortex a máxima velocidad. Subsecuentemente se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4° C, se retiró la fase acusa y se colocó el tubo boca abajo sobre una servilleta de papel, con el fin de eliminar el exceso de EtOH, posteriormente se cubrió la boquilla del tubo con papel Parafilm y con ayuda de una aguja se realizó pequeñas perforaciones en el mismo, para finalmente dejar secando la pastilla a 37°C en una incubadora por 15 min. Una vez transcurrido este lapso, se retiró el papel Parafilm del tubo y la pastilla se disolvió de acuerdo con el rendimiento con 20 µl a 80 µL agua Milli Q estéril filtrada y se homogenizó por 2 min con ayuda de un Vortex a máxima velocidad. Una vez disuelta la pastilla, se incubó en un baño seco a 60° C por 10 min y posteriormente en hielo de agua por el mismo tiempo.

Los ARNs fueron almacenados a -80° C hasta su uso.

TRATAMIENTO CON ADNsa I PARA LA ELIMINACIÓN DE ADN GENÓMICO

El ARN total se sometió a tratamiento enzimático para la degradación del ADN, empleando la enzima DNase I (Fermentas; Thermo Scientific, EUA). Para lo cual a cada muestra de ARN total le será incorporada la solución de degradación de DNA, el cual consiste en 1 X de Buffer de Reacción 10 X (Thermo Scientific, Thermo Scientific, EUA), 5 U de enzima DNase I libre de ARNasas (Thermo Scientific, Thermo Scientific, EUA) en un volumen final de 100 µL que será aforado con agua Milli Q estéril filtrada. Posteriormente se homogenizó en Vortex a máxima velocidad y se centrifugo por 5 segundos en una minufuga, para finalmente dejar la reacción incubando a 37° C por 30 min, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción inhibiendo la actividad de la DNase I (Thermo Scientific, Thermo Scientific, EUA) agregando Trizol® RNA Isolation Reagents (Invitrogen™ LifeTechnologies™, USA) a la reacción en una proporción de 3:1 Trizol: Mezcla de reacción. Posteriormente se prosiguió la metodología empleada para la extracción de ARN total con Trizol® RNA Isolation Reagents (Invitrogen™ LifeTechnologies™, USA) ajustando los volúmenes de los reactivos.

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE CONTAMINACIÓN DE ADN GENÓMICO EN EL ARN TOTAL

Se empleará la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en punto final para identificar las muestras de ARN que estaban contaminadas con ADN genómico. Para lo cual se preparó una solución de PCR al 1 X de Solución Amortiguadora 10 X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X 100) (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 0.2 mM de dNTPS al 10 mM (Invitrogen™, Life technologies; EUA), 0.002 µg/µl de cada oligonucleótido al 0.1 µg/µL diseñados para la detección del gen constitutivo GAPDH y 3.0 mM MgCl₂ (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 2.5 U de la enzima Amplificasa® (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 1.5 µL de ARN total, en un volumen de reacción final de 25 µL. En este procedimiento se empleará como control positivo 1.5 µL ADN genómico de leucocitos y 1.5 µL de agua Milli Q estéril filtrada, como control negativo.

Para llevar a cabo la reacción se empleó un termociclador Multigene Optimax (Labnet International Inc; EUA), para la amplificación del gen constitutivo que codifica para la Glicerinaldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH); con las condiciones indicadas a continuación:

Tabla 3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa usados para GAPDH

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa usados para GAPDH			
Tamaño de producto amplificado	[MgCl₂]	T_m de Alineamiento	Control
307 pb	1.8 mM	62°C	AND/ADNc
Condiciones del programa para la reacción en cadena de la polimerasa			
Fase	Temperatura		Tiempo
Inicio	94°C		5 min
Desnaturalización	94°C		30 seg
Alineamiento	De acuerdo con el diseño de cada par de		30 seg

	oligonucleótidos	
Extensión	72°C	30 seg
Elongación final	72°C	10 min

La reacción, se corrió de manera ininterrumpida hasta el ciclo 40.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis a 240 volts por 45 min en geles de agarosa al 2% p/v disuelta en TBE (del inglés *Tris-Borate-EDTA*) 0.5 X con 0.015 mg de Bromuro de Etídio; cargando en cada pozo del gel 9 μ L de productos de PCR y 3 μ L de solución de carga (0.25 % Azul de bromofenol; 0.25% Xilencianol, disueltos en Urea 10 M). Se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA) como referencia para la identificación de los productos de PCR en el gel.

Posterior al corrimiento electroforético se usó el transiluminador LMS-26 UV Benchtop UV (UVP®; EUA) a 302 nm de longitud de onda, para la visualización de las bandas de los productos de amplificación, las imágenes se adquirieron y procesaron con el programa BioDoc-It 220 (UVP®; EUA) en formato *tiff*.

Corroborada la eliminación del DNA de las muestras de RNA estas se cuantificaron usando el equipo Bio Drop, para determinar a partir de 1 μ L de ARN su absorbancia a 260 nm, así mismo se empleó como indicador de la pureza de las muestras la relación de absorbancia de 260 nm/280 nm: la cual indica la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que presentan resonancia cerca de 280 nm, presentes en la muestra, bajo este análisis muestras con una relación de absorbancia de 260 nm/280 nm próximas de 1.8 a 2, son consideradas como muestras puras; y la relación de absorbancias de 260 nm/230 nm, como un indicador de la presencia de contaminantes como iones fenolato, tiocianatos y otros compuestos orgánicos que presentan resonancia a 230 nm, teniendo en consideración lo anterior, muestras con relación de absorbancia de 260 nm/230 nm que presenten valores de entre 2 a 2.2, son consideradas muestras de adecuada pureza. Posterior a su cuantificación los ARNs serán almacenados a -80° C hasta su uso.

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ARN TOTAL POR ELECTROFORESIS:

Para visualizar la integridad del ARN total de aquellas muestras que contengan al menos 5 μg de ARN, se empleará la técnica de electroforesis ácida, usando un gel de condiciones desnaturalizantes de agarosa-urea-ácido cítrico. Los geles se prepararán a una concentración de 1.5 % p/v de agarosa (BioRad, EUA) disuelta en Urea 10 M (60 % v/v) (US Biological, EUA), Ácido cítrico 0.25 M pH 3.5 (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, EUA) (10 % v/v) y aforado al volumen deseado con agua Milli Q estéril. Para la separación electroforética, se usará 1 μg o en su defecto 10 μL de muestra de ARN el cual será homogeneizado en 10 μl de Azul de Bromofenol/Urea 10 M tras una incubación por 10 min en baño seco a 65° C, posteriormente serán colocados en hielo de agua por el mismo tiempo, para después proseguir a colocar los 20 μL totales en los pozos correspondientes previo montaje del gel en la cámara de electroforesis. Como solución de corrida se empleará Ácido cítrico 0.25 M pH 3.5 (10% v/v) (J.T. Baker, Avantor Performance Materials, EUA). El corrimiento electroforético se realizará empleando un voltaje de 80 V por un tiempo de 45 min.

Para la visualización del ARN se teñirá el gel con Bromuro de Etidio 1 X por 3 min, se retirará el excedente de Bromuro de Etidio y se visualizará el gel en el transiluminador LMS-26 UV Benchtop UV (UVP®; EUA) a 302 nm de longitud de onda, las imágenes se computarán y procesarán con el programa BioDoc-It 220 (UVP®; EUA).

SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Se usaron 1 μg de ARN total libre de ADN o en su defecto el volumen máximo permitido (11.2 μL) para muestras muy diluidas; por reacción como templado para la síntesis de ADNc; para tal procedimiento el ARN se incubará durante 5 min a 65° C en baño seco, transcurrido el tiempo se homogenizará con ayuda de un Vortex a máxima velocidad por 30 segundos; posteriormente se centrifugará en minifuga por 30 segundos y se colocará en hielo de agua. A la par, se preparará la mezcla para la reacción de síntesis que contiene por 1 μg de ARN total, 0.001 M de DTT al 0.1 M (InvitrogenTM, Life Technologies; EUA), 2.6 mM de Random Primer 10 mM (Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM; México), 0.5 mM de dNTPs al 10 mM (InvitrogenTM, Life Technologies; EUA), 1 X de Buffer First Strand 5X (InvitrogenTM, Life technologies;

EUA), 100 U de la enzima reverso transcriptasa M-MLV a 200 U / μ L (InvitrogenTM, Life technologies; EUA), en un volumen final de 30 μ L por reacción. Previa homogenización en Vortex a máxima velocidad por 10 segundos y centrifugación en minifuga por 10 segundos, se adicionarán 27 μ L de la mezcla de reacción de síntesis de ADNc a cada tubo se le añadirán 3 μ L de ARN que se empleará como templado, esto para cubrir el volumen total de la reacción de 30 μ L. Finalmente se homogenizará en Vortex por 10 segundos y se centrifugará en minifuga por el mismo tiempo, para posteriormente colocar los tubos en baño seco a 37° C por 1 h.

Transcurrido este tiempo, se colocaron las muestras en hielo de agua o bien se guardarán a -20° C hasta su uso.

EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Se evaluó la integridad del ADNc sintetizado a través de la amplificación del transcrito del gen GAPDH mediante PCR en curva de ciclos.

Para cual se empleó una solución de reacción de PCR, que contendrá 1 X de Solución Amortiguadora 10 X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 μ g/ml gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X 100) (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 0.2 mM de dNTPS al 10 mM (InvitrogenTM, Life Technologies; EUA), 0.002 μ g/ μ l de cada oligonucleótido al 0.1 μ g/ μ L y una concentración final de 3.0 mM de MgCl₂ (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 2.5 U de la enzima Amplificasa® (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México) y como templado 3 μ L de ADNc, en un volumen total de 50 μ L para cada reacción, aforando a dicho volumen con agua Milli Q estéril filtrada.

Para la realización de la PCR se empleó el termociclador Multigene Optimax (Labnet International Inc; EUA). La reacción se corrió de manera ininterrumpida hasta el ciclo 20, posterior a este ciclo se tomaron 9 μ L de la reacción de PCR de cada tubo los cuales se colocaron en un tubo nuevo y se guardaron a 4° C hasta su uso, se continua con el programa de PCR interrumpiendo la reacción cada 5 ciclos hasta llegar a 40 ciclos, tomando en cada ocasión 9 μ L del volumen de la reacción.

Finalmente, los productos de PCR se visualizaron mediante la técnica de electroforesis en geles del 2% p/v de agarosa licuada en TBE (Tris/Borate/EDTA) 0.5 X con 0.015 mg de Bromuro de Etídio. En todos los casos se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA), la electroforesis se realizó a 240 volts por 45 min. Posterior al corrimiento electroforético se empleó el transiluminador LMS-26 UV Benchtop UV (UVP®; EUA) a 302 nm de longitud de onda, para la visualización de las bandas de los productos de amplificación, las imágenes se adquirieron y procesaron con el programa BioDoc-It 220 (UVP®; EUA) en formato *tiff*.

REACCIÓN DE REVERSO TRANSCRIPTASA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) EN MUESTRAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Se llevó a cabo el análisis de los oligonucleótidos mediante el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), MFEprimer-2.0 (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/>) y Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html); en búsqueda de que las secuencias cumplieran las siguientes características:

Tabla 4. Características para el diseño de oligonucleótidos

PARAMETRO	CARACTERÍSTICAS
Longitud del oligonucleótido	18 - 25 pb
% GC	30 – 60
Tm	Optima de 58-60° C, la Tm de cada oligonucleótido no deben de variar más de 2° C entre ellas.
Producto de PCR	50-150 pb

Adicionalmente, se diseñaron evitando la complementariedad de los oligonucleótidos consigo mismos, así como entre ellos. Evitando que los extremos 3´ presenten empalme sobre sí mismos, el valor del dúplex fue menor de -5.5 kcal/mol; si el empalme se encontró en los extremos 5´, el valor estuvo entre -5.6 y -8.0 kcal/mol, evitando también la formación de horquillas con valor mayor de -8 kcal/mol y por último se omitió la presencia

de G/C en el extremo 3', así como la existencia de tres o más G/C contiguas en el oligonucleótido. Finalmente, se buscaron posiciones para los oligonucleótidos que permitieran amplificar el gen de interés, así como sus variantes en caso de poseerlas. Una vez que fue comprobado que dichas secuencias cumplieron con las características previamente indicadas, se procedió a su síntesis. Dichos oligonucleótidos fueron diseñados bajo las especificaciones de qPCR para ser empleados posteriormente en esta técnica.

Una vez que se contó con los oligonucleótidos se realizó la búsqueda de tejidos o líneas celulares empleados como controles positivos para los genes blanco PTC1, GLI-1, GLI-2, GLI-3, SMO y SHH. La primera fuente fueron las líneas celulares con las que se cuenta en nuestro grupo, para lo cual se evaluó bajo condiciones de baja temperatura y una concentración estándar de magnesio, con el fin de estandarizar posteriormente los oligonucleótidos para dichos genes en una curva de concentración de temperatura y magnesio. En la búsqueda de dichos controles se realizó la extracción de RNA, se evaluó la calidad e integridad del RNA de las diferentes líneas celulares con las que se cuenta en nuestro grupo, se obtuvieron muestras sin contaminación de genómico a través de la detección del transcrito de GAPDH. Finalmente, se seleccionaron los RNAs de la calidad más aceptable y de mejor integridad para realizar la síntesis de. De los cDNAs sintetizados se realizó la evaluación de su capacidad para amplificar un gen constitutivo, empleando para ello GAPDH, mediante un PCR punto final con curva de ciclos de la amplificación.

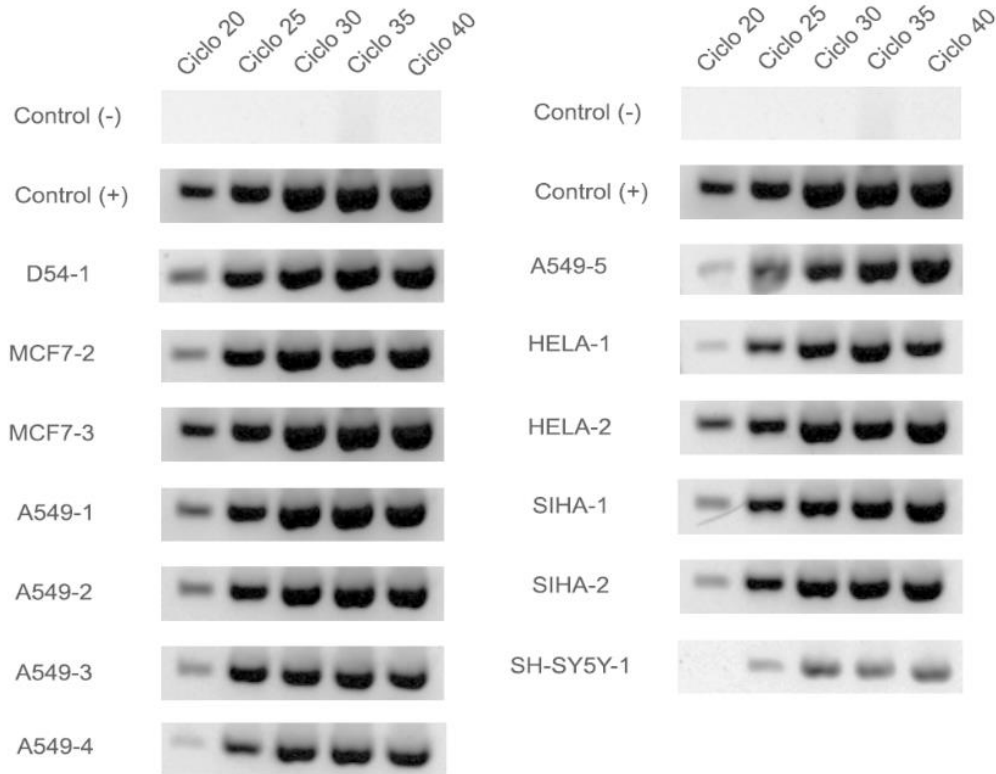


Figura 13. Evaluación de la calidad de cDNA de diversas líneas celulares

Como se observa en la figura 13, fue posible la detección del producto de amplificación que codifica para GAPDH en los cDNAs sintetizados, esto desde el ciclo 20, y van en incremento de acuerdo con los ciclos tardíos, con la excepción del cDNA elaborado a partir del RNA de la línea celular SH-SY5Y, lo que muestra poca cantidad de cDNA. el resto de las muestras presentan un comportamiento esperado de un cDNA de buena calidad. Por lo que se puede concluir que los cDNAs sintetizados tienen la capacidad de amplificación necesaria para ser utilizados como muestras potenciales para la estandarización de los genes que componen la vía de SHH.

De acuerdo con lo antes mencionado se llevó a cabo la identificación de las líneas que pudieran tener la capacidad de detectar alguno de los genes involucrados con la vía de señalización de SHH, como son: PTC1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1 mediante un PCR punto final en condiciones basales (véase Figura 14 para el caso de PTC-1 como ejemplo).

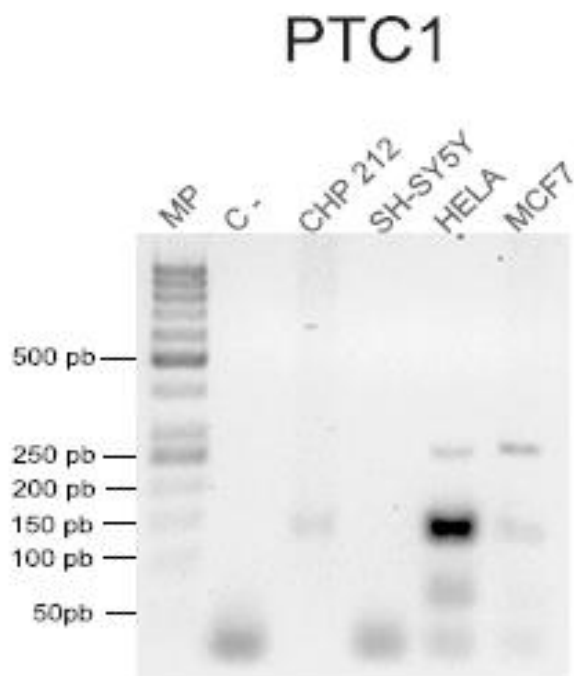


Figura 14. Identificación de líneas celulares para estandarización de la detección del transcrito de PTC1. La reacción de PCR se llevó a 40 ciclos, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2.5 % en TBE 0.5 X. Se tiñeron con bromuro de etidio y se tomó una foto en un fotodocumentador. Primer carril marcador de peso molecular; segundo carril control negativo, agua mili Q. El resto de los carriles se indica en la parte superior la línea celular evaluada. El producto esperado para PTC es de 133 pares de bases (pb)

Acorde a los resultados obtenidos en la figura 14, la línea celular HELA presentó un producto de amplificación del tamaño acorde al amplicon esperado para el gen PTC1, la banda obtenida presenta una intensidad aceptable para ser utilizada para estandarizar la reacción de PCR, de la misma forma se seleccionaron las líneas celulares que pudieran ser empleadas para estandarizar el resto de los marcadores: para GLI-1 fue seleccionada la línea celular A549, para GLI-2 la línea celular MCF-7, GLI-3 la línea celular HELA y para BMI-1 la línea celular HELA.

Una vez identificada la línea celular que presenta la expresión del marcador, y que podría ser empleado como muestra para la detección del transcrito de dichos genes, se procedió a determinar las condiciones óptimas de amplificación con respecto a temperatura y concentración de magnesio, para lo cual se realizó una curva de temperatura y concentración de $MgCl_2$ (véase la figura 15 para el caso de PTC-1 como ejemplo).

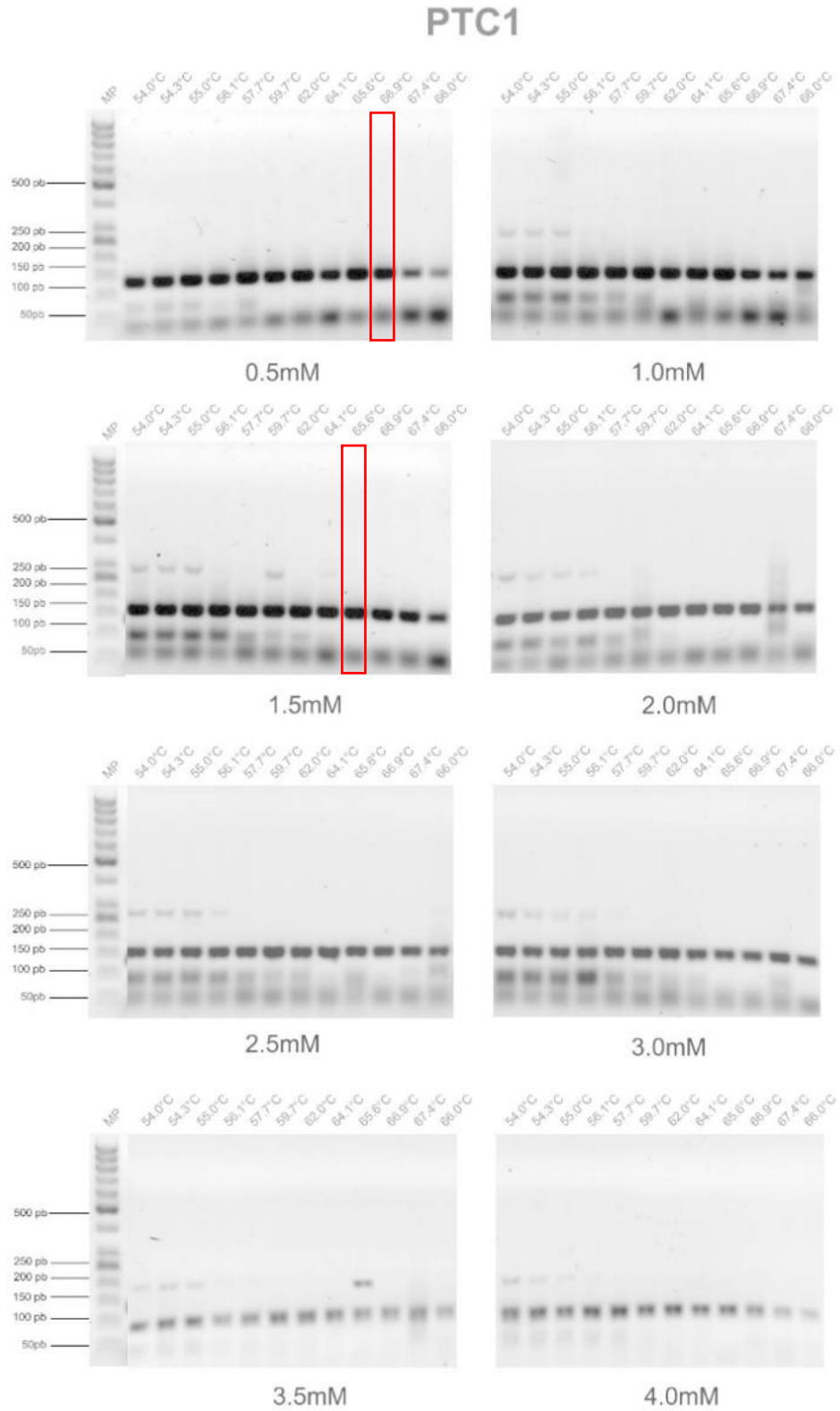


Figura 15. Curva de temperatura y concentración de $MgCl_2$, para la estandarización de oligonucleótidos correspondientes al gen PTC-1 (130 pb), en los rectángulos rojos podemos encontrar las dos condiciones de temperatura y concentración de $MgCl_2$.

Como se puede apreciar conforme se aumenta la concentración de magnesio hay una disminución en la cantidad de producto generado, observando que la mejor amplificación se presentó con las concentraciones de magnesio de 0.5, 1 y 1.5 mM. En lo que respecta a la temperatura se empleó un rango que va de 54 °C a 66 °C, se puede observar que a bajas temperaturas (54 a 58 °C) es posible detectar productos de amplificación no específicos (productos de un tamaño diferente al esperado), por otra parte también se observan dímeros de primer (productos aproximados de entre 50 a 70 pb), teniendo en cuenta estas observaciones se escogieron dos temperaturas con el menor número de productos inespecíficos y dímeros de primer. Para el caso de PTC-1, se seleccionó la condición de 66.9 °C con una concentración de MgCl₂ de 0.5mM así mismo, la temperatura de 65.6°C con una concentración de 1.5 mM de MgCl₂. Para demostrar cual podría tener la más alta sensibilidad se procedió a realizar la amplificación de PTC 1 con dichas condiciones bajo un PCR semicuantitativo (realizándolo a diferentes ciclos de amplificación). Este mismo procedimiento se realizó para el restante par de oligonucleótidos, así las condiciones seleccionadas para detectar los transcrito de GLI-1, GLI-2 y GLI-3 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones elegidas para la reacción en cadena de la polimerasa usados para cada par de oligonucleótidos.

CONDICIONES ELEGIDAS PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA USADOS PARA CADA PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS				
RNA_m de gen amplificado	Tamaño de producto amplificado	[MgCl₂]	T_m de alineamiento	Control
PTC-1	133 pb	1.5 m M	65.6 ° C	ADNc de HELA
GLI-1	262 pb	0.5 m M	57.2 ° C	ADNc de A549
GLI-2	76 pb	0.5 m M	54.6 ° C	ADNc de MCF-7
GLI-3	103 pb	2.5 m M	54 ° C	ADNc de HELA
BMI-1	105 pb	1.5 m M	54 ° C	ADNc de HELA

Para cada muestra que se empleó para detectar los marcadores, se realizó una mezcla de

reacción de PCR, que contenía 1 X de Solución Amortiguadora 10 X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl; 100 µg/mL gelatina, 1.5 mg/ml BSA; 1% Tritón X 100) (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México), 0.2 mM de dNTPS al 10 mM (Invitrogen™, Life Technologies; EUA), 0.002 µg/µL de cada oligonucleótido al 0.1 µg/µL, la concentración de MgCl₂ (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S.A. de C.V.; México), fue ajustada de acuerdo a los requerimientos de cada par de oligonucleótidos, PTC-1, GLI-1, GLI-2 y GLI-3; 2.5 U de la enzima Amplificasa® (Biotecmol, Biotecnologías Moleculares S. A. de CV; México) y como templado 1.5 µL de ADNc, en un volumen total 25 µL para el caso de RT-PCR punto final y 3 µL para un volumen de 50 µL para el caso de RT-PCR punto final en curva de ciclos y aforando a dichos volúmenes con agua Milli Q estéril filtrada.

Como controles positivos se emplearon, 1.5 y 3 µL de ADNc de las líneas celulares MCF7, HELA y A549, de acuerdo con lo establecido para cada gen y al volumen final de la reacción; y como controles negativos de 1.5 µL y 3 µL de la reacción sobrante de la mezcla general para la síntesis de ADNc y agua Milli Q filtrada de acuerdo con el volumen final de la reacción. La reacción de PCR se realizó en el termociclador Multigene Optimax (Labnet International Inc; EUA), con las condiciones indicadas para la amplificación de cada gen de interés.

Los productos de PCR se visualizaron mediante la técnica de electroforesis en geles del 2% al 3% p/v de agarosa disuelta en TBE (Tris/Borate/EDTA) 0.5 X con 0.015 mg de Bromuro de Etídio. En todos los casos se empleó el marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA), la electroforesis se realizó de 120 a 240 volts por 45 min. Posterior al corrimiento electroforético se empleó el transiluminador LMS-26 UV Benchtop UV (UVP®; EUA) a 302 nm de longitud de onda, para la visualización de las bandas de los productos de amplificación, las imágenes se computaron y procesaron con el programa BioDoc-It 220 (UVP®; EUA). Todos los anteriores serán empleados para evaluar la presencia y expresión de la vía de SHH por medio de la técnica de RT-PCR en curva de ciclos.

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO:

A partir de las imágenes obtenidas se realizó la densitometría primeramente de GAPDH de

cada uno de los casos esto a través del programa Image lab, se realizó el ajuste del fondo de cada una de las imágenes obtenidas para tener un valor fidedigno de la banda en la medición de densidad óptica (D.O). Del análisis de los valores de GAPDH se buscó el ciclo con D.O más homogénea para hacer el ajuste de cada uno de los genes y tener los valores de detección en D.O.

Se realiza la normalización de dichos valores empleando el programa de Excel mediante la siguiente estrategia:

El valor de GAPDH en D.O de cada caso se utilizó como referencia para normalizar el valor de DO. obtenido en cada uno de los genes detectados, de la siguiente forma: las D.O obtenidas en los genes analizados se dividirán entre el valor obtenido en el gen de referencia.

Con respecto al valor normalizado obtenido y en relación con el valor de referencia GAPDH se establece nivel bajo de detección cuando la detección va desde 0.1 hasta el valor de referencia y detección alta cuando se obtuvo un valor superior al valor de referencia en GAPDH.

Dichos resultados fueron empleados para realizar el análisis de supervivencia.

RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Los datos clínicos de cada paciente que fueron incluidos en este estudio se recopilaron a partir de la información y reportes presentes en la base interna de control de información del INP.

Los parámetros que fueron recopilados al momento del diagnóstico fueron: edad, sexo, conteo de blastos en medula ósea (MO), tipo de leucemia de acuerdo con el grupo FAB, Inmunofenotipo, presencia y tipo de translocaciones y estratificación.

Parámetros recopilados a los 29 días de tratamiento, conteo de blastos por BH y en MO, Inmunofenotipo, conteo de blastos por CF.

Toda la información se recopilará en una base de datos creada en Microsoft Excel versión 2013, en donde el nombre del paciente se mantiene oculto.

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Para llevar a cabo el análisis de supervivencia se empleó el programa SPSS para el cual se construyó una tabla de variables a analizar y posteriormente se llevó a cabo el análisis de supervivencia por medio de Kaplan Meier obteniendo así las gráficas de supervivencia global en función de las variables de presencia de translocaciones, clasificación de riesgo y respuesta a la inducción a la remisión, posteriormente se realizó la supervivencia global a partir de la detección de cada uno de los componentes de la vía propuestos a analizar en este estudio.

En función de los resultados obtenidos se establecieron dos grupos de detección que se establecieron en función del impacto en la supervivencia. Y por último en función de estos grupos se realizó el análisis de supervivencia ajustado a la respuesta a la inducción a la remisión.

RESULTADOS

La leucemia linfoblástica aguda es la neoplasia más frecuente en infantes y representa una de las patologías de mayor impacto. Gracias a que en las últimas décadas se han logrado avances significativos en su tratamiento, así como en la adecuada estadificación de riesgo del paciente, se ha logrado que en países desarrollados los porcentajes de supervivencia libre de eventos de recaída alcance a los cinco años cerca del 80%. En México, este porcentaje no ha podido ser alcanzado, ya que la supervivencia global a los 4 años se encuentra alrededor del 65%, mientras. Además, el 30% de los niños que la padecen fallecen por causas relacionadas con la patología o su tratamiento. Por lo anterior, es necesario comprender los mecanismos que participan en la transformación, lo que permitirá proponer moléculas blanco que puedan ser empleadas como receptores farmacológicos, o su empleo como biomarcador, lo que permitirá establecer diagnósticos y pronósticos más precisos, tratamientos más selectivos y disminuir en la proporción de pacientes que experimenta una falla terapéutica.

DETECTAR LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SHH, MEDIANTE LA PRESENCIA DEL RNAm DE SUS GENES BLANCO PTC-1, GLI-1 y BMI-1.

Algunos de los mecanismos de transformación identificados en las células presentes en los casos de falla terapéutica, son elementos que permiten la supervivencia a la quimioterapia, y concuerdan con algunos rasgos característicos reportados para las células troncales, por lo que se ha propuesto que las células que participan en la generación de las poblaciones celulares presentes en las leucemias son CTHLs; los mecanismos de transformación favorecen alteraciones en su capacidad de respuesta a los estímulos de proliferación, diferenciación, supervivencia y presencia de transportadores ABC. Dicha población celular presenta aberraciones en la expresión de oncogenes, factores de crecimiento, receptores o ligandos involucrados en el control de la proliferación, supervivencia o diferenciación del linaje del SH.

En los últimos años se ha reportado que las CTHLs presentan heterogeneidad en cuanto a la capacidad para repoblar y regenerar la leucemia, lo cual ha propuesto la existencia de distintas clases de CTHLs con diferente capacidad de autorrenovación, lo que sugiere, que

las vías que regulan los procesos normales de diferenciación y autorrenovación en células hematopoyéticas no están completamente inactivas en las CTHLs, como lo puede ser el caso de la vía de SHH, la cual se encuentra involucrada en procesos de proliferación, autorrenovación, sobrevivencia y angiogénesis, misma de la cual se han reportado ya mecanismos de sobre activación ocasionados por mutaciones, demostrado en más del 90% de los carcinomas de células basales y en el 30% de los meduloblastomas de adultos, por lo anterior resulta de interés conocer si esta vía se encuentra expresada en la LLA de tipo B.

En el presente proyecto se trabajó con un banco de muestras de ARN total de leucocitos de 30 muestras de médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda del INP. De las cuales se cuantificaron y evaluaron por espectrofotometría 26 muestras libres de ADN, mismas que fueron empleadas como templado para la síntesis de ADNc, de los cuales se llevó a cabo la evaluación de su capacidad de amplificación mediante el uso del gen constitutivo que codifica para la Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH).

Para demostrar la activación de la vía de señalización de SHH se llevó a cabo el diseño de diversos pares de oligonucleótidos y su estandarización mediante RT-PCR para la detección del transcrito de los genes blanco PTC-1, GLI-1 y BMI-1, así como los componentes de la vía SHH, GLI-2, GLI-3 en las 26 muestras a ser analizadas (figura 16).

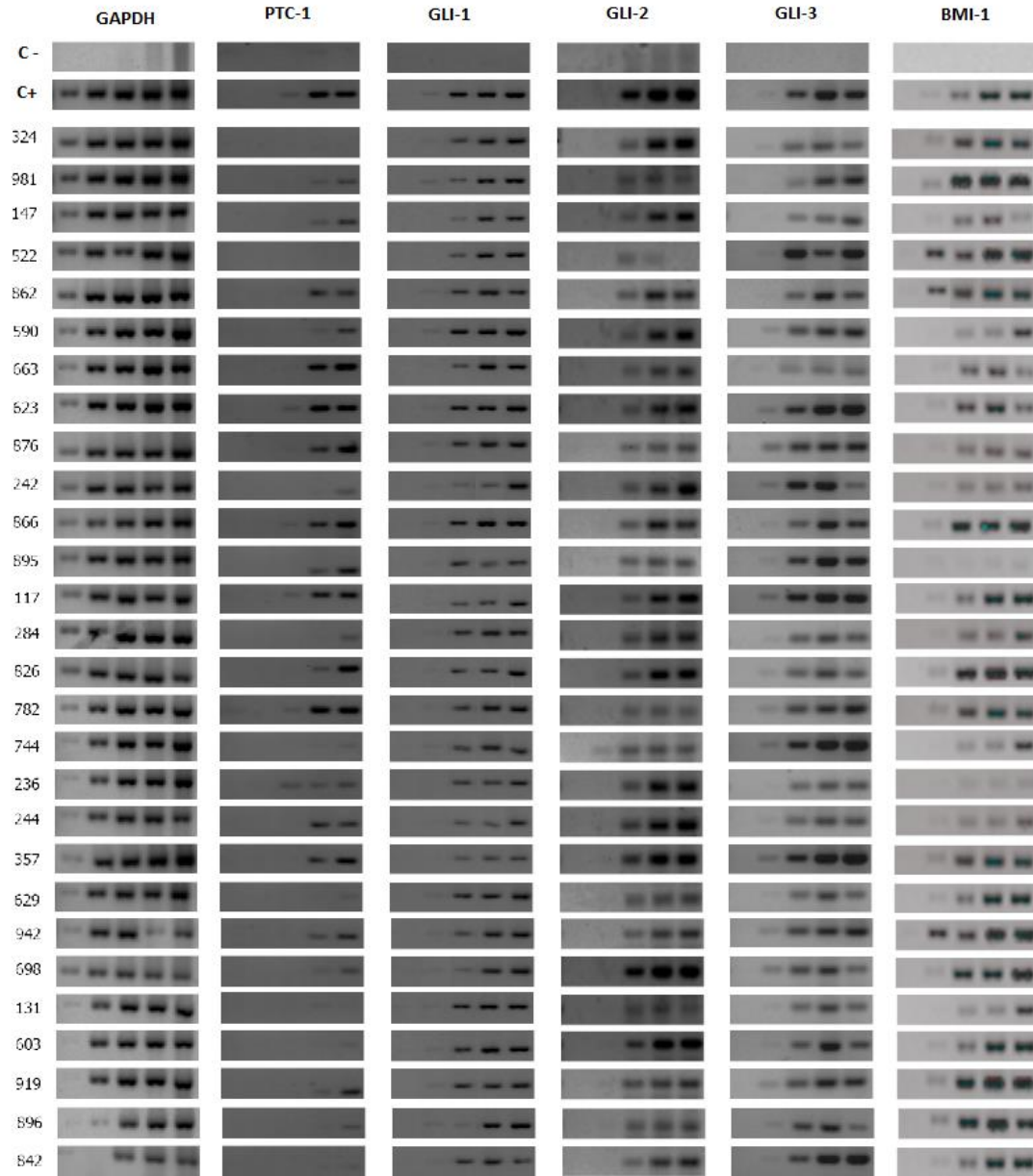


Figura 16. Detección de los componentes de la vía de SHH, PTC-1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1 en muestras de ND de LLA-B. Detección de los componentes de la vía de SHH, PTC-1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1 en muestras de ND de LLA-B. Carril 1 evaluación de GAPDH, carril 2 detección de PTC-1 por ciclos, carril 3 detección de GLI-1 por ciclos, carril 4 detección de GLI-2 por ciclos, carril 5 detección de GLI-3 por ciclos, carril 6 detección de BMI-1 por ciclos.

Para realizar el análisis se llevó a cabo la densitometría de la detección del gen de

referencia GAPDH con la finalidad de elegir el ciclo que resultara tener una detección más uniforme entre todos los casos analizados, el cual resultó ser el ciclo 30 con un valor promedio de 1.33 densidades ópticas (Figura 17), tomando como referencia el valor de GAPDH de cada caso se normalizó la detección del gen PTC-1, GLI-1 y BMI-1.

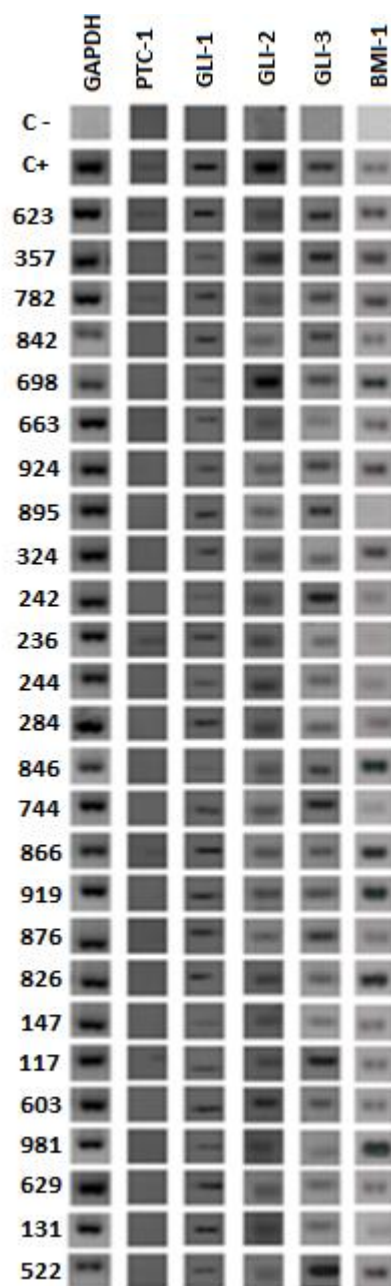


Figura 17. Detección de los componentes de la vía de SHH, PTC-1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1 en muestras de ND de LLA-B. Detección de los componentes de la vía de SHH, PTC-1, GLI-1, GLI-2, GLI-3 y BMI-1 en muestras de ND de LLA-B. Carril 1 evaluación de GAPDH, carril 2 detección de PTC-1 ciclo 30, carril 3 detección de GLI-1 ciclo 30, carril 4 detección de GLI-2 ciclo 30, carril 5 detección de GLI-3 ciclo 30, carril 6 detección de BMI-1 ciclo 30.

Con base en esta normalización se designaron valores de detección nulos cuando la D.O de la detección de los genes blanco fuera 0, detección baja cuando el valor detectado en cada caso superara el 0 y no alcanza el valor de D.O obtenido para GAPDH de dicha muestra y detección alta cuando la detección del gen blanco supera la D.O obtenida por el gen de referencia (GAPDH) (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de detección de genes blanco PTC-1, GLI-1 y BMI-1.

MUESTRA	PTC-1	GLI-1	BMI-1
623	N	B	B
357	N	B	B
782	N	B	B
842	N	A	A
698	N	N	A
663	N	B	B
924	N	B	A
895	N	B	N
324	N	B	B
242	N	B	A
236	N	B	B
244	N	B	A
284	N	B	B
846	N	B	A
744	N	B	B
866	N	B	A
919	N	B	A
876	N	B	B

826	N	B	A
147	N	B	B
117	N	B	B
603	N	B	B
981	N	B	B
629	N	B	B
131	N	B	B
522	N	B	B

N: detección nula; B: detección baja y A: detección alta.

Para establecer la proporción global de casos que manifestaron dicha vía activa, se consideró a todos los casos en los cuales se tenían valores bajos y altos, en la Tabla 7 se expresa como porcentajes del total de las muestras.

Tabla 7. Detección de genes blanco PTC-1, GLI-1, BMI-1 y los componentes GLI-2 y GLI-3 de la vía de SHH en las 26 muestras de LLA-B de ND.

DETECCIÓN EN MUESTRAS LLA-B ND (26)	
GEN	PORCENTAJE DE DETECCIÓN
PTC-1	0%
GLI-1	96.15%
GLI-2	100%
GLI-3	100%
BMI-1	96.15%

Los resultados por RT-PCR indican que el 100% de las muestras presentan la vía de SHH activa considerando la detección de GLI-1, BMI-1 en las muestras analizadas las

proporciones de detección de los genes blanco y los factores de transcripción GLI-2 y GLI-3, lo que no sucede así para el gen blanco y principal represor de la vía de SHH PTC-1 el cual no se detectó en ninguno de los casos analizados. Por lo que es posible proponer que las Leucemias Linfoblásticas Agudas B poseen un patrón de expresión activador de la vía de SHH y que podría ser una del mecanismo de transformación en la LLA B.

DATOS CLINICOS TRANSLOCACIONES, CLASIFICACIÓN DE RIESGO Y SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA TERAPÉUTICA EN PACIENTES.

Para tener un mejor conocimiento del comportamiento clínico de los 26 casos de este estudio se analizaron los datos clínicos y de seguimiento terapéutico, lo cual sería útil para tenerlos de referencia para su posterior análisis en comparación o correlación con la detección de los genes blanco y componentes de la vía de SHH.

En cuanto a la manifestación de translocaciones solo el 15% de los casos analizados las presentan, siendo 2 casos para la translocación 12:21 representando el 7.7% translocación, un caso para la 9;11 y también uno para la 9;22 lo que representa en frecuencia el 3.8% (Figura 18). Lo que no permite establecer ninguna asociación con la vía de SHH por el escaso número.

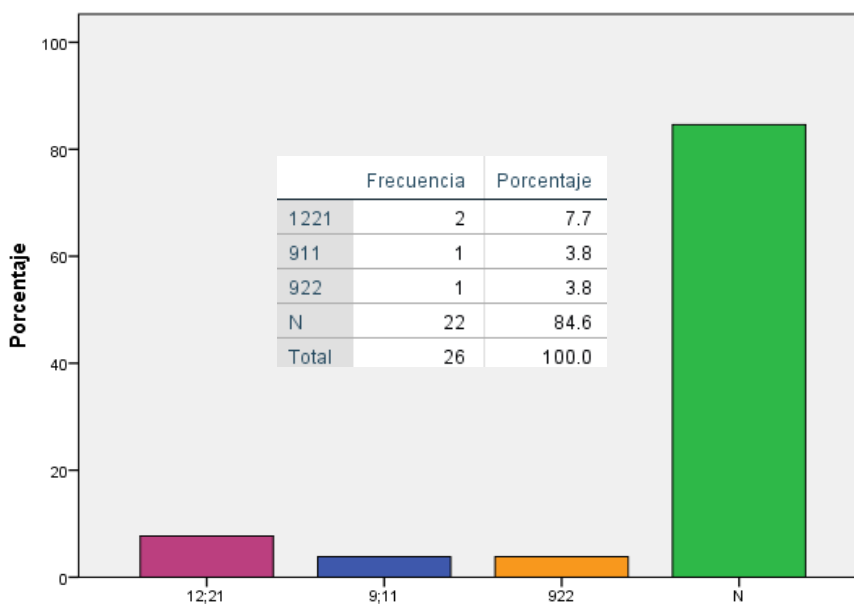


Figura 18. Estadística de las translocaciones manifestadas en los casos analizados de LLA-B de ND.

En lo que respecta a la clasificación por riesgo el 73.1% de los casos pertenecen a la clasificación de alto riesgo y 26.9% a riesgo habitual.

En lo que respecta a la respuesta a la fase de inducción a la remisión el 84.6% de los casos respondieron mientras que solo 4 casos que corresponden al 15.4% no tuvieron respuesta a esta fase de tratamiento (Figura 19).

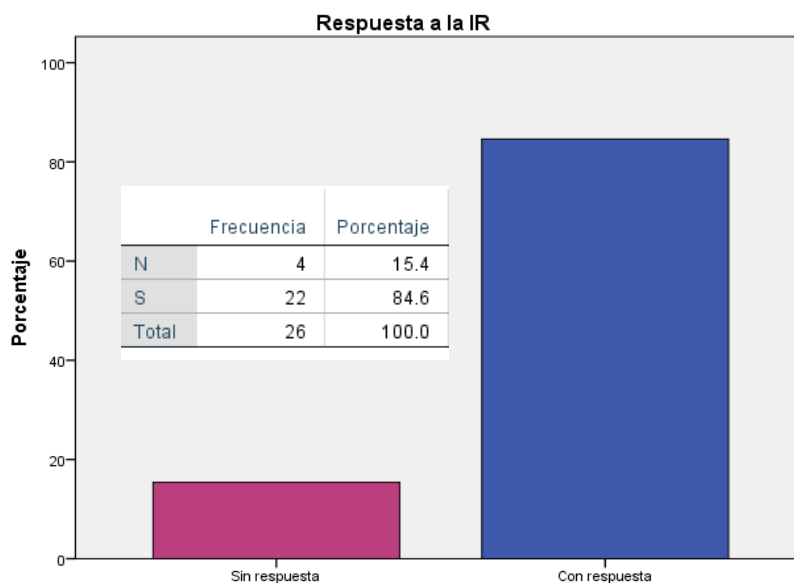


Figura 19. Estadística de la clasificación de riesgo que presentan los casos analizados de LLA-B de ND. AR: alto riesgo y RH: riesgo habitual.

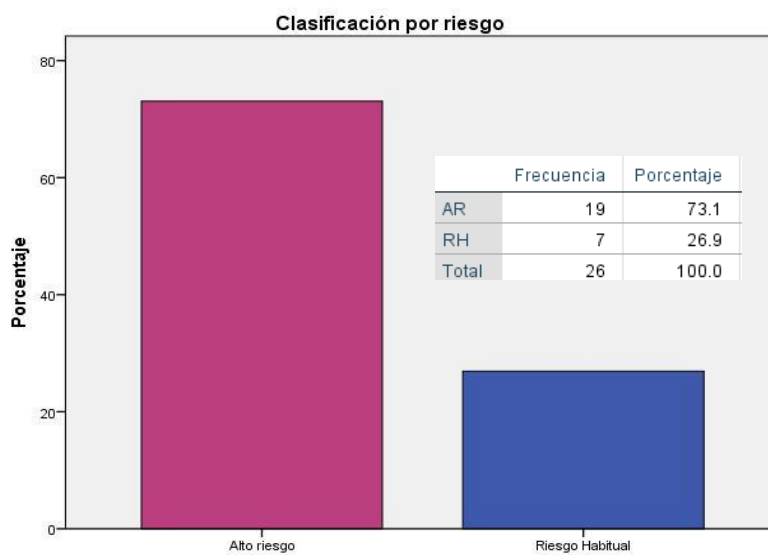


Figura 20. Estadística de la respuesta a la fase de inducción a la remisión (IR) en los casos analizados de LLA-B de ND. N: sin respuesta y S: con respuesta.

EVALUAR SI HAY UNA ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES BLANCO DE LA VÍA DE SHH CON LOS DATOS CLÍNICOS OBTENIDOS EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

Para llevar a cabo el análisis de la asociación de la expresión de los genes blanco y los datos clínicos de translocaciones, riesgo y respuesta a la inducción a la remisión se elaboró una gráfica de supervivencia global, otra para cada una de estas variables y otras en función de la detección del gen GLI-1 y BMI-1, en vista de que estos dos genes son los que se toman como genes blanco principales. Los resultados obtenidos son los siguientes:

La supervivencia global de los casos analizados a los 82 meses de seguimiento es del 84% (Figura 21) en contraste con esto tenemos la supervivencia que compete a la variable de translocaciones, la cual debido a la baja frecuencia de translocaciones en los casos analizados se obtiene una gráfica de supervivencia global en la que los casos que presentan cualquiera de las translocaciones (12;21, 9;22 y 9;11) tienen el 100% de supervivencia a los 54 meses (Figura 22).

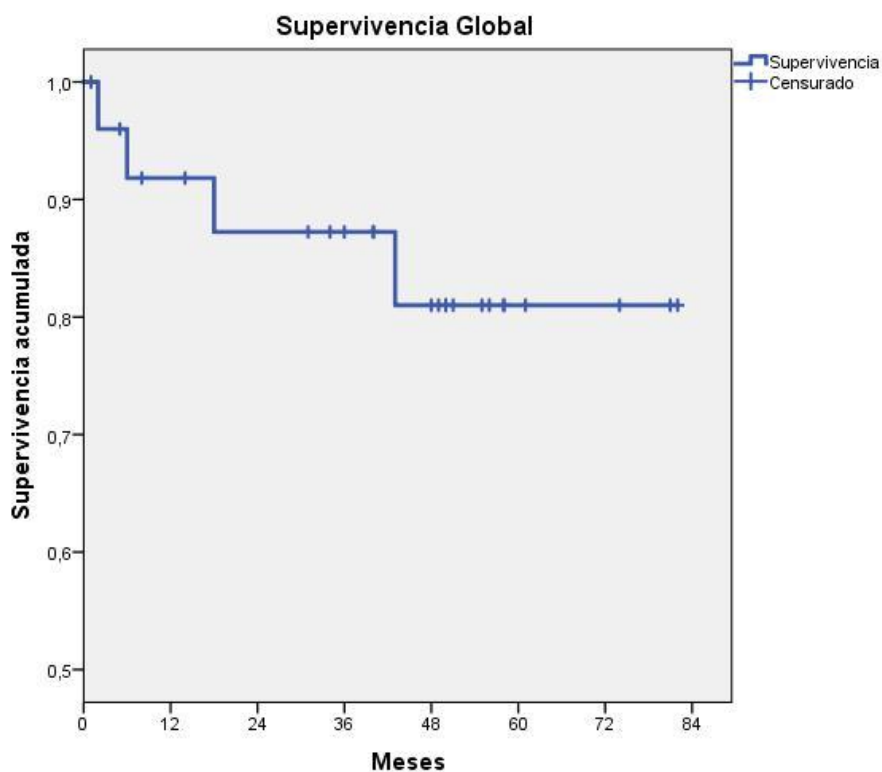


Figura 21. Gráfica de supervivencia global de los casos analizados de LLA-B de ND

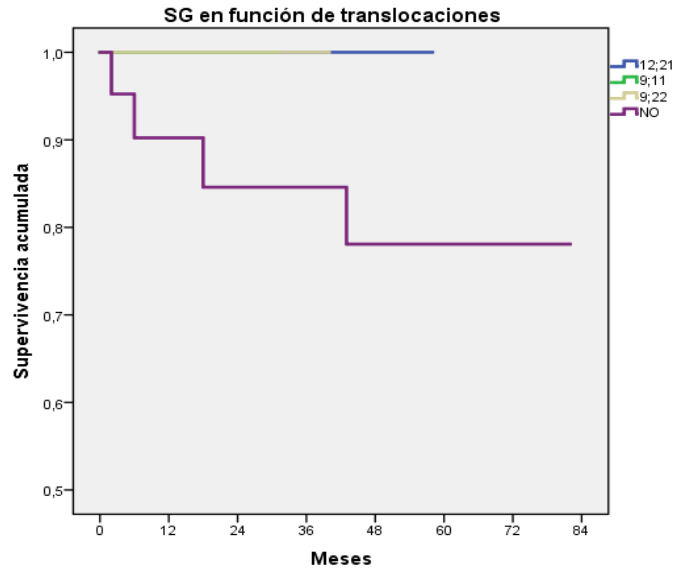


Figura 22. Gráfica de supervivencia global en función de translocaciones.

Debido a que la tendencia de la caída de la supervivencia es independiente a la presencia de las translocaciones en los casos analizados, no existe una asociación de su manifestación con la supervivencia. En cuanto a la clasificación de riesgo la supervivencia global es del 100% a los 82 meses cuando el riesgo del paciente es habitual, mientras que hay una caída en la supervivencia hasta el 74% a los 82 meses de seguimiento cuando los casos pertenecen al grupo de alto riesgo; comportamiento que es de esperarse debido a la agresividad que posee dicha patología bajo la clasificación de riesgo por parte del Children's Oncology Group (Figura 23).

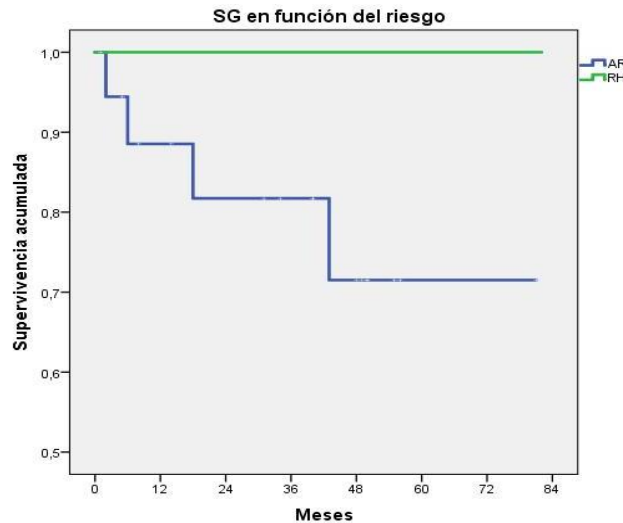


Figura 23. Gráfica de supervivencia global en función de la clasificación de riesgo. AR: alto riesgo y RH: riesgo habitual.

Para establecer una asociación entre la vía de Shh y el comportamiento clínico de los pacientes de LLA-B, se evaluó primero con la detección del gen blanco GLI-1, como se observa en la gráfica de Kaplan-Meier no se encuentra un desplazamiento de la curva teniendo en mente el valor obtenido (100% a 82 meses) por impacto en dicho análisis, la cual nos muestra los mismos valores que la gráfica obtenida a partir de la variable únicamente (Figura 24).

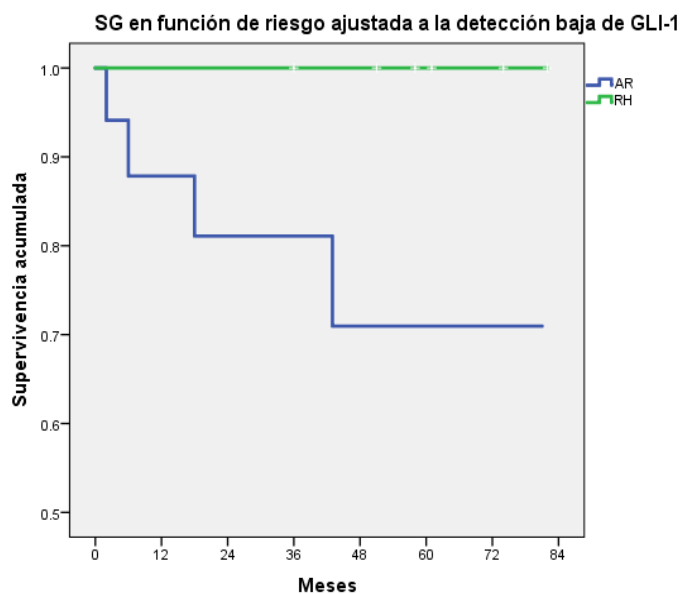


Figura 24. Gráfica de supervivencia global en función de la clasificación de riesgo ajustada a la detección baja de GLI-1. AR: alto riesgo y RH: riesgo habitual.

En cambio, al analizar la variable de riesgo frente a la detección obtenida del gen blanco BMI-1 encontramos un incremento en la mortalidad cuando la detección del gen es alta, con lo cual se alcanza un valor de 65% a los 82 meses, contra la detección baja de este gen blanco que es del 74% a 54 meses (Figura 25 y 26), que es la del promedio de supervivencia a los 5 años del grupo total de alto riesgo que es de 74 %.

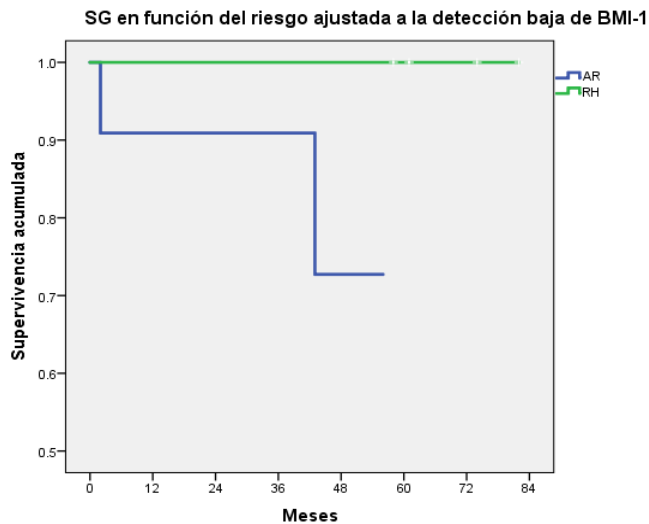


Figura 25. Supervivencia global en función de la clasificación de riesgo ajustada a la detección baja de BMI-1. AR: alto riesgo y RH: riesgo habitual.



Figura 26. Supervivencia global en función de la clasificación de riesgo ajustada a la detección alta de BMI-1. AR: alto riesgo y RH: riesgo habitual.

Para el análisis de la variable respuesta a la inducción a la remisión se obtuvo que los pacientes que tienen respuesta a esta fase del tratamiento poseen un 86% de supervivencia a los 82 meses en contraste con los pacientes que no tuvieron respuesta a dicha fase cuya supervivencia cae hasta un 50% a los 36 meses (Figura 27), lo cual está de acuerdo con el comportamiento del grupo.

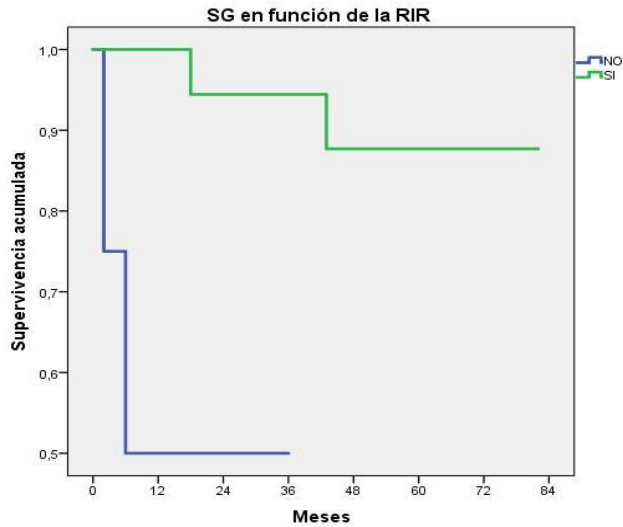


Figura 27. Gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión. No: sin respuesta a la inducción a la remisión y Si: con respuesta a la inducción a la remisión.

Al analizar la variable de respuesta a inducción a la remisión en función de la detección del gen blanco GLI-1, se observa un comportamiento semejante a los obtenidos en la gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión (Figura 28). Por lo que es posible establecer que Gli-1 no presenta efectos sobre este comportamiento.

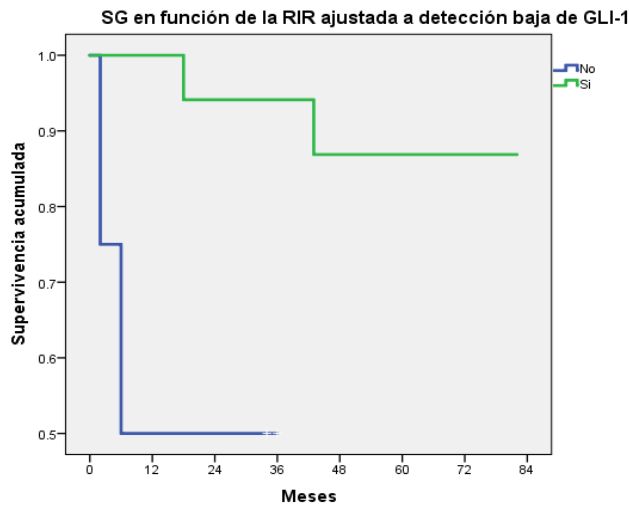


Figura 28. Gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión ajustada a la detección baja de GLI-1. No: sin respuesta a la inducción a la remisión y Si: con respuesta a la inducción a la remisión

Sin embargo, en lo que se refiere al análisis de dicha variable en función de la detección del gen BMI-1 encontramos una tendencia entre la falla de inducción a la remisión y la detección alta, debido a que la supervivencia cae al 0% a los 6 meses de seguimiento en contraste con la detección baja en la que también se encuentra un impacto en la

supervivencia la cual fue del 50% a los 2 meses de seguimiento (Figura 29 y 30). Si bien estos datos pueden estar influidos por el número escaso de casos (n= 4 de no respuesta a la IR y n= 22 de respuesta a la IR), sí es posible decir que los niveles de BMI-1 tienen una participación en predecir una disminución en la supervivencia de los pacientes en los primeros 12 meses de seguimiento.

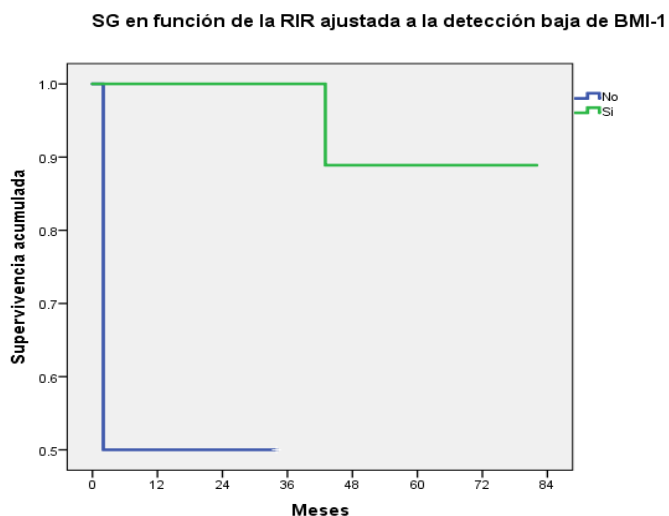


Figura 29. Gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión ajustada a la detección baja de BMI-1. No: sin respuesta a la inducción a la remisión y Si: con respuesta a la inducción a la remisión

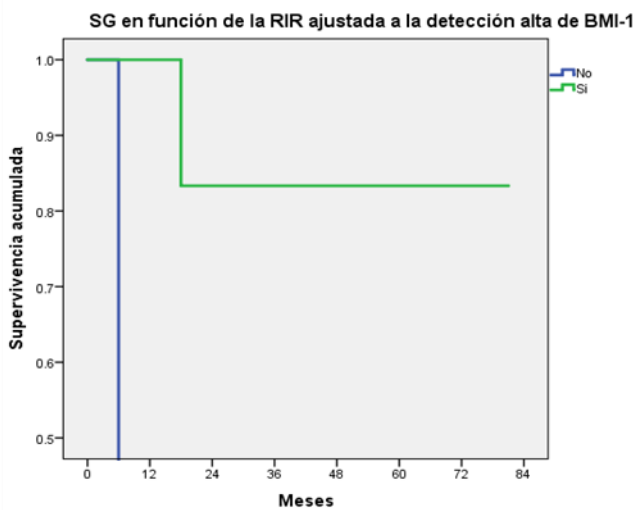


Figura 30. Gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión ajustada a la detección alta de BMI-1. No: sin respuesta a la inducción a la remisión y Si: con respuesta a la inducción a la remisión

EVALUAR SI LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SHH SE ASOCIA CON LA FALLA DE RESPUESTA A LA FASE DE INDUCCIÓN A LA REMISIÓN EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B

En busca de fortalecer la asociación de la activación de la vía de SHH con la falla de respuesta a la fase de inducción a la remisión, se elaboraron gráficas de supervivencia global de la detección de los genes blanco GLI-1 y BMI-1 así como de los componentes de GLI-2 y GLI-3 los resultados se presentan a continuación:

En cuanto a la detección del ARNm de GLI-1 y GLI-2 no presenta una diferencia entre la detección alta o baja de los mismos ya que las gráficas presentan el mismo comportamiento que la gráfica de supervivencia global (Figura 31 y 32).

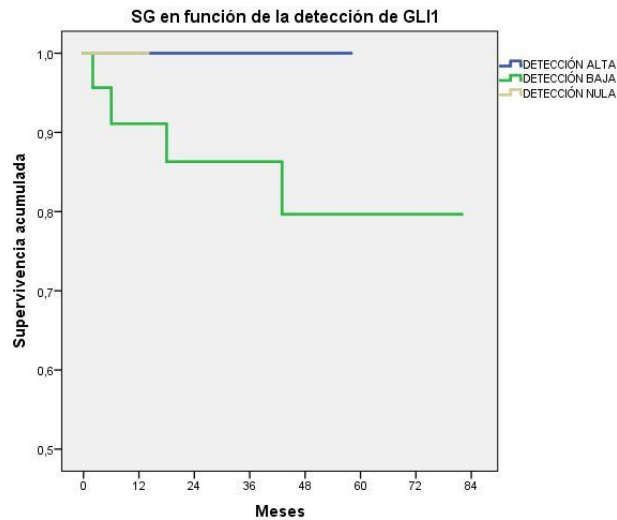


Figura 31. Gráfica de supervivencia global en función de la detección de GLI-1.

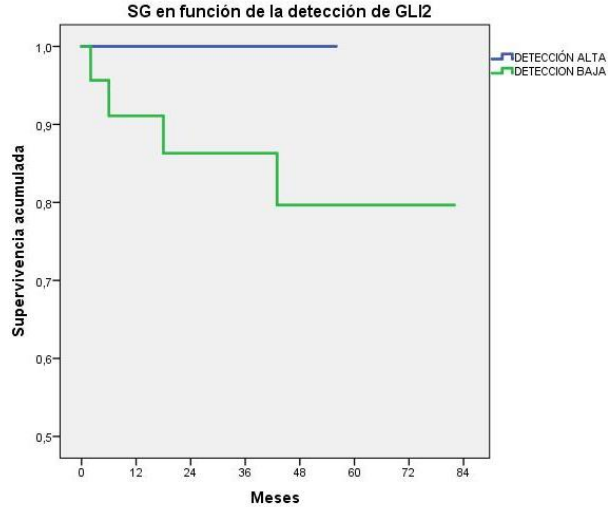


Figura 32. Gráfica de supervivencia global en función de la detección de GLI-2

Sin embargo, para el caso de la detección del ARNm del factor de transcripción GLI-3 presentó una caída en la supervivencia hasta el 50% a los 58 meses de seguimiento, cuando el nivel de expresión fue alto, mientras que en el caso de tener bajos niveles de expresión, la curva de supervivencia no muestra cambios significativos a la Gráfica global (Figura 33).

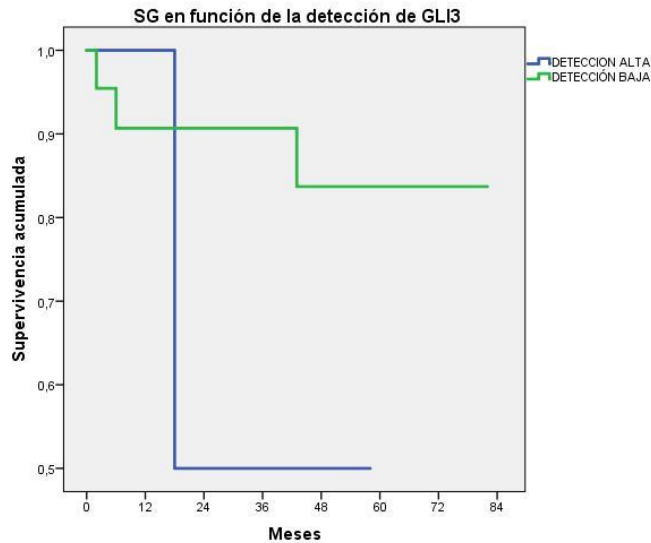


Figura 33. Gráfica de supervivencia global en función de la detección de GLI-3

De manera relevante, la detección del gen BMI-1 presenta un impacto en la supervivencia dependiente del incremento de expresión; en caso de no expresar BMI-1, se alcanza una

sobrevivencia a los 3 años, con un nivel de expresión bajo la supervivencia baja a 84 %, y finalmente cuando el nivel de detección del ARNm es alto la supervivencia cae al 50% a los 20 meses de seguimiento. Por otra parte, destaca un comportamiento bimodal, en el cual la detección baja del ARNm de BMI-1 identifica a los pacientes que no sobrevivirán en el primer año de seguimiento (Figura 34).

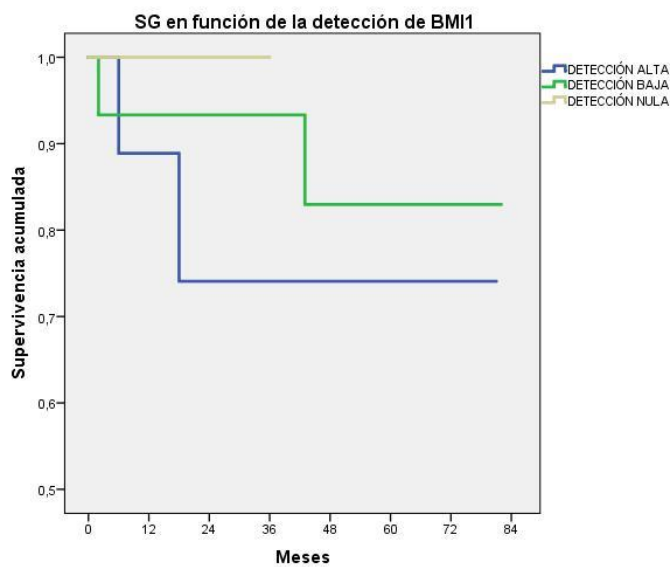


Figura 34. Gráfica de supervivencia global en función de la detección de BMI-1.

De esta manera, al determinar que los genes que guardan un mayor impacto sobre la supervivencia son GLI-3 y BMI-1, se consideró establecer grupos de acuerdo con los niveles de detección del ARNm. En función de esto se tomaron en cuenta los valores altos y bajos de detección de GLI-3 y BMI-1, estableciendo los grupos de análisis siguientes:

- Grupo B1: GLI-1, 2 alto/bajo, **GLI-3 bajo** y BMI-1 bajo/alto
- Grupo B2: GLI-1, 2 alto/bajo, **GLI-3 alto** y BMI-1 alto

Cada uno de los casos se incorporaron a dichos grupos como se muestra en la siguiente tabla:

MUESTRA	GLI-1	GLI-2	GLI-3	BMI-1	GRUPO B
623	B	B	B	B	B1
357	B	B	B	B	B1
782	B	B	B	B	B1
842	A	B	A	A	B2
698	N	A	B	A	B1
663	B	B	B	B	B1
924	B	B	B	A	B1
895	B	B	B	N	B1
324	B	B	B	B	B1
242	B	B	B	A	B1
236	B	B	B	B	B1
244	B	B	B	A	B1
284	B	B	B	B	B1
846	B	B	A	A	B2
744	B	B	B	B	B1
866	B	B	A	A	B2
919	B	B	B	A	B1
876	B	B	B	B	B1
826	B	B	B	A	B1
147	B	B	B	B	B1
117	B	B	B	B	B1
603	B	A	B	B	B1
981	B	B	B	B	B1
629	B	B	B	B	B1
131	B	B	B	B	B1
522	B	B	B	B	B1

A partir de la generación de estos grupos se realizó nuevamente el análisis de supervivencia global a partir de la cual se evidencia una caída en la supervivencia del 50% a los 18 meses del grupo de detección GLI-3 y BMI-1 altos, además se observa que a baja expresión de GLI-3 se identifican los casos que no llegan a sobrevivir dentro del primer año de seguimiento (Figura 35).

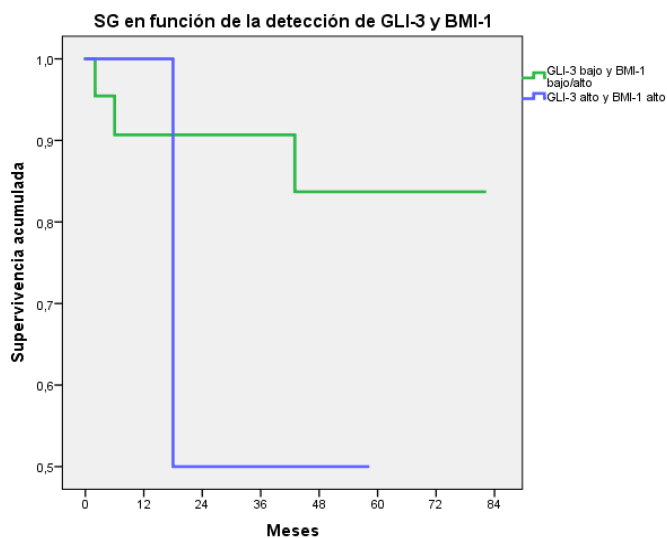


Figura 35. Gráfica de supervivencia global en función de la detección de GLI-3 y BMI-1.

Para conocer si el nivel de detección de GLI-3 y BMI-1 afectan la sobrevida en función de la respuesta a la inducción a la remisión, se elaboró una gráfica de supervivencia global de acuerdo con la respuesta a la inducción a la remisión en función de cada grupo de detección (B1 Figura 36 y B2 Figura 37).

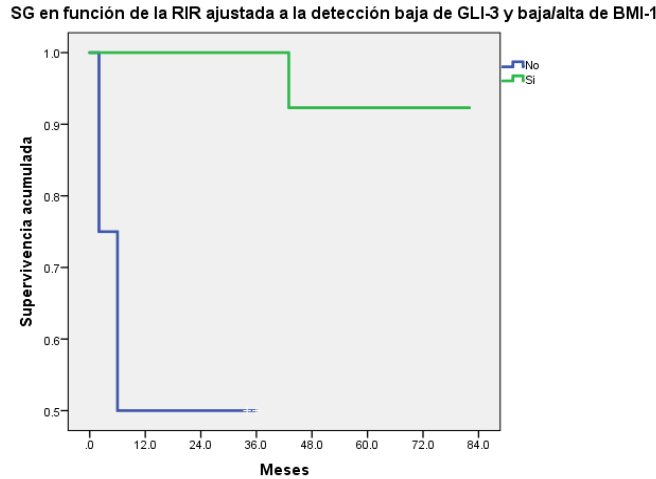


Figura 36. Gráfica de supervivencia global en función de la detección baja de GLI-3 y baja/alta de BMI-1. No: sin respuesta y Si: con respuesta

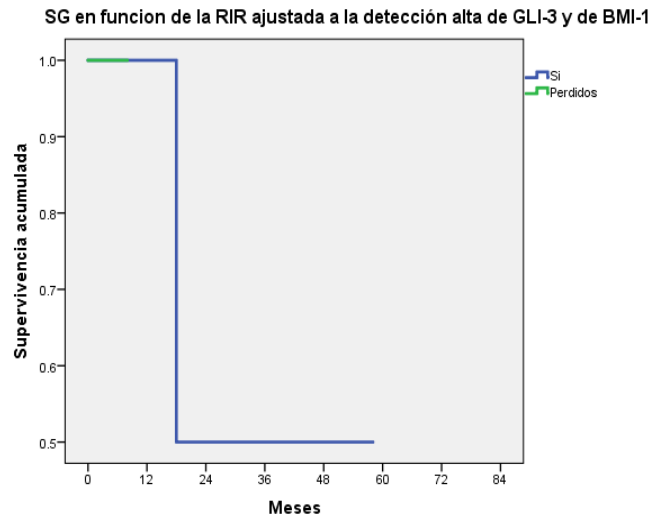


Figura 37. Gráfica de supervivencia global en función de la respuesta a la inducción a la remisión ajustada a la detección alta de GLI-3 y BMI-1. Si: con respuesta a la inducción a la remisión y Perdidos: ningún caso sin respuesta a la inducción a la remisión

Con base a la respuesta de inducción a la remisión y la detección baja de GLI-3 y alta/baja de BMI-1 podemos decir que dicho grupo identifica a los pacientes que no responderán a la fase de inducción a la remisión, además de establecer que presentarán una sobrevida del 50 % en menos de un año de seguimiento, mientras que el grupo de detección alta de GLI-3 y BMI-1 a pesar de que fueron casos que respondieron a la inducción, su sobrevida fue del 50 % a los 18 meses. Si bien es posible observar una tendencia entre la detección de GLI3 y BMI-1 con una menor supervivencia posterior al periodo de IR, teniendo en cuenta el valor promedio del grupo (84%), al realizar un análisis de cox, no fue posible presentar un valor

significativamente estadístico, sin embargo, se encuentra muy cercano al mostrar un valor de 0.062. Con lo cual, es posible considerar que hay una tendencia, la cual podría verse mejorada con un incremento en el número de los casos con falla de respuesta a la inducción a la remisión. Que es lo que muestra como limitación el grupo de estudio analizado en este trabajo.

DISCUSIÓN

En la LLA B el éxito del tratamiento radica en la estadificación del paciente, así como en la presencia de factores genéticos y fisiopatológicos, lo que permite determinar el esquema e intensidad del esquema terapéutico. Dado a que el éxito del tratamiento se encuentra alrededor del 65% de los casos en México resulta necesario comprender los mecanismos que participan en el proceso de transformación como la alteración de autorrenovación, proliferación, bloqueo de la diferenciación y estado de quiescencia de la población celular que predomina en esta patología.

Se han acumulado evidencias en donde se da soporte que en los procesos de transformación participan distintas vías de señalización como lo son: la vía de Wnt, Notch y SHH^[37]; esta última resulta ser una de las vías de señalización que regulan los mecanismos de autorrenovación y diferenciación^[28]. La desregulación de estas se ha documentado en las CTT^[37], se ha prestado especial atención a la vía de SHH, para la cual se han reportado eventos de sobreexpresión en sus componentes, particularmente lo que favorecen su activación (SMO y GLI-1), ocasionada por mutaciones en componentes de la vía de transducción, evidencias se han acumulado en donde se muestra que más del 90% de los carcinomas de células basales^[43] y en el 30% de los meduloblastomas de adultos muestran activación de la vía de señalización^[53].

En lo que se refiere al impacto que la activación de la cascada de señalización de SHH tiene sobre el éxito en la evolución del paciente con el tratamiento, se ha demostrado que mediante la activación del receptor de la vía (SMO), en un modelo de leucemia mieloblástica aguda, se ve comprometido el período de supervivencia pasando de un 40% a los 580 días a un 0% a 180 días, cuando se induce la activación de la vía de SHH^[48]. Debido a lo anterior resulta de interés conocer si esta vía se encuentra activa en LLA de tipo B en pacientes de nuevo diagnóstico, nuestra propuesta fue determinar si el seguimiento de la primera etapa de tratamiento llamada inducción a la remisión, período de suma importancia en el tratamiento de esta neoplasia, estaba siendo afectada por la activación de SHH, así como conocer el impacto que esta posea al término del tratamiento y en el seguimiento de los pacientes. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la vía de señalización se encuentra activa, preferentemente detectada por la expresión

de GLI-1 y BMI-1. Así mismo se observa que la expresión de BMI-1 y Gli-3 permite identificar a los pacientes que muestran el peor pronóstico, identificando los casos que no tendrán éxito para su inducción a la remisión y detectando al 50 % de los pacientes que no sobrevivirán al primer año y medio de tratamiento. Nuestros resultados, proponen a la vía de SHH como una cascada de señalización que agrava la condición clínica de los pacientes con LLA-B.

VÍA DE SHH EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La vía de SHH es una de las vías conservadas, junto con Wnt y Notch, que regulan con precisión la morfogénesis, estableciendo decisiones en cuanto al destino celular, como la autorrenovación y la diferenciación^[54]. Dicha vía se inactiva posteriormente en la mayoría de los tejidos adultos, pero con frecuencia se reactivan en una amplia gama de eventos de regeneración tisular, y se ha relacionado con la generación de tumores humanos. Se ha formulado la hipótesis de que la transformación maligna recapitula muchos procesos evolutivos, y las vías de señalización necesarias para el desarrollo normal de un tejido u órgano específico pueden activarse de manera aberrante en los procesos neoplásicos correspondientes al tejido de origen del tumor^[54]. El papel de las vías de señalización del desarrollo en la patogénesis y autorrenovación de las células de LLA-B no está claro, pero los datos recientes sugieren que la vía de señalización de SHH está involucrada en el desarrollo de precursores de células B a partir de células madre hematopoyéticas primitivas, así como autorrenovación y supervivencia celular en patologías de células B humanas.

Respecto a los estudios relacionados con LLA-B se ha detectado de manera heterogénea la expresión de componentes de dicha vía, sin embargo, a favor de esta propuesta es la expresión de los genes blanco PTC-1 y GLI-1 que sugieren que dicha vía está activa en líneas tumorales leucémicas, proponiendo la posible participación de su activación en forma aberrante en el desarrollo de esta patología^[37]. Resultados a favor de esta propuesta son los obtenidos por el análisis de microarreglos en pacientes con LLA- B del INP, en el que se demostró claramente la sobreexpresión de los genes PTC-1 y GLI-1, así como de los componentes que activan la vía, como son SMO y GLI-2.

En el presente proyecto se detectó la activación de dicha vía en el 100% de los casos de LLA B mediante la detección de los genes blanco GLI-1 y BMI-1 en un 96.15%, así mismo

se detectaron los factores de transcripción GLI-2 y GLI-3 en un 100%, mismos que se han reportado como factores activadores de dicha vía en procesos cancerígenos. Esta vía de señalización se encuentra regulada por múltiples eventos de señalización, incluyendo factores de crecimiento peptídicos (PGF), receptor tirosina quinasas (RTK), RAS, MEK, fosfoinositida-3 quinasa (PI3K) y AKT. PGF activa los RTK, que a su vez activan varias cascadas de transducción de señal que incluyen RAS-RAF-MEK y PI3K / AKT. Estas son vías clave de señalización implicadas en la regulación de la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación, activadas de manera aberrante debido a mutaciones en múltiples niveles se han relacionado como puntos clave en los mecanismos de transformación celular^[54].

VÍA DE SHH Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LLA B

La LLA B es reconocida como un trastorno heterogéneo con diversas variables clínicas que determinan su gravedad, entre las que destacan alteraciones citogenéticas. Aunque es posible estadificar a los pacientes en función de dichos indicadores clínicos, en nuestro país, seguimos presentando evaluación clínica de los pacientes no favorable. Por ello se ha considerado de suma importancia analizar procesos moleculares involucrados en el desarrollo de esta patología; como se han acumulado evidencias la activación de la vía de SHH tiene un papel importante en el proceso de autorrenovación, mismo que se ha comprobado como uno de los procesos involucrados en el mantenimiento a largo plazo de clonas malignas en Leucemia mieloide^[48]. Atendiendo a lo anterior y debido a que el porcentaje de éxito terapéutico obtenido en México es menor al alcanzado a nivel internacional, resultó importante analizar los criterios bajo los cuales se selecciona el tratamiento para estos pacientes, en el presente estudio se analizó la asociación entre la manifestación de translocaciones, estadificación del paciente y la respuesta a la IR con la activación de la vía de SHH.

A pesar de que ninguna de estas variables presentó significancia estadística en su asociación con la detección de los genes blanco detectados, tanto a la presencia de translocaciones, clasificación de riesgo y la no respuesta a la inducción a la remisión; se encontró una tendencia en la disminución de la supervivencia global entre la detección alta del gen BMI-1 y la clasificación de alto riesgo, siendo de la sobrevivencia de 65% a 82

meses de seguimiento, en contraste con la obtenida en pacientes de riesgo habitual la cual radica en el 100% a 82 meses.

Así mismo, se encontró una tendencia en la disminución de la supervivencia global entre la detección alta del gen BMI-1 y la no respuesta a la IR siendo del 0% a 6 meses de seguimiento, mientras que la obtenida en los pacientes con respuesta a la IR fue del 84% a 82 meses de seguimiento. La asociación que presenta BMI-1, gen conocido por su papel principal en el proceso de autorrenovación, entre su alta detección y factores que representan un mal pronóstico para los pacientes, nos deja proponer que la autorrenovación posee una relevancia significativa en la respuesta al tratamiento en esta patología.

En lo que respecta a la respuesta a la fase de inducción a la remisión es importante señalar que dicha fase tiene como objetivo erradicar más del 99% de las células leucémicas iniciales y restaurar una hematopoyesis normal y en consecuencia alcanzar un buen estado de salud, es por ello que se considera que el paciente que presenta remisión completa tendrá mejor evolución en las siguientes fases del tratamiento además de que representa un requisito indispensable para tener una supervivencia prolongada. En Estado Unidos se estima que el 96% de los casos debe presentar una respuesta adecuada a esta fase, sin embargo, no existen estudios que hayan analizado la relación de la activación de la vía de SHH y la respuesta a esta fase. En el presente estudio el 84.6% de los casos analizados presentaron respuesta adecuada a la fase de inducción a la remisión mientras que el 15.4% no respondió de manera adecuada, lo cual presenta un porcentaje elevado con respecto al antes mencionado, la supervivencia global de los 4 casos que no presentaron respuesta a la IR fue del 56% a 36 meses, mientras que la respuesta a la inducción a la remisión (22 casos) presenta una supervivencia mucho mayor siendo del 94.7% a 82 meses.

En lo que respecta a la asociación de la respuesta a dicha fase y la activación de la vía se establecieron dos grupos de acuerdo con códigos en función de los niveles de detección de GLI-3 y BMI-1, que manifestaron tener impacto en la supervivencia de los pacientes. El primero de ellos está constituido por casos con detección baja del factor de transcripción GLI-3 y baja/alta de BMI-1 que se presentó en el 88.4% de los pacientes; para este grupo la supervivencia global fue del 84.6% a 82 meses de seguimiento, mientras que la supervivencia en función a la respuesta a la fase de inducción a la remisión manifiesta que

cuando existe respuesta a dicha fase y se detectan estos dos componentes en las proporciones indicadas la supervivencia fue del 94.7% a 82 meses cifra que posee congruencia con el impacto positivo en la supervivencia al presentar remisión completa. Por otro lado, la carencia de respuesta a la IR en asociación en los casos de este grupo tiene un impacto negativo en su supervivencia, siendo del 50% a 36 meses, de esta manera, existe una diferencia con respecto a la supervivencia global, así existe una tendencia entre los niveles bajos de detección de GLI-3 y BMI-1 que identifican a los pacientes que presentan una mala evolución a los 3 años.

El segundo grupo generado es en el que se detectan altos niveles de GLI-3 y BMI-1 que representa el 11.6% de los casos, para los cuales la supervivencia global fue del 50% a 59 meses, mientras que la supervivencia en función a la respuesta a la fase de inducción a la remisión manifiesta que cuando existe respuesta a dicha fase y se detectan estos dos componentes en las proporciones indicadas, proporcionó una supervivencia del 60% a 59 meses para este grupo no se encontró falla a la inducción a la remisión, lo que nos permite identificarlo con un comportamiento bimodal, mediante el cual se pueden identificar los casos que tendrán respuesta a inducción a la remisión pero que posteriormente que fallecerán dentro del primer año y medio de evolución, dicho resultado nos señala que los niveles elevados de BMI-1 podrían poseer un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes a pesar de que presenten inicialmente una respuesta a la fase de inducción a la remisión.

Este gen blanco se ha detectado sobre expresado en varios tipos de cánceres humanos, incluidos cáncer de pulmón en el que dicha sobreexpresión induce a la inmortalización de las células cancerígenas [55], cáncer de ovario en donde se detecta dicha sobreexpresión en el 90.26% de los casos correlacionando con una actividad telomerasa positiva[56], cáncer de mama en el que la sobreexpresión correlaciona con los marcadores de pobre pronóstico así como su descripción por primera vez en correlación estadísticamente significativa de la disminución de supervivencia en estos pacientes[57], lo que indica que podría desempeñar un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer en este caso en específico atribuyéndolo a la importancia que posee en la regulación de la autorrenovación.

VIA DE SHH Y AUTORRENOVACIÓN: PAPEL EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON LLA-B

Se ha reportado que la actividad de la vía de SHH en LLA B regula la autorrenovación de las células altamente clonogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* y se han obtenido resultados que sugieren que la inhibición de la señalización de Hh puede mejorar los resultados a largo plazo en la B-ALL al ser afectadas las células clonogénicas responsables de la recaída de la enfermedad[37]. En esta patología las respuestas a las fases iniciales indican que la quimioterapia de inducción es efectiva para eliminar la mayoría de las células tumorales, pero la recaída posterior sugiere que se necesitan medios alternativos para inhibir las células leucémicas persistentes capaces de autorrenovarse a largo plazo. En varios cánceres humanos, se ha detectado que la persistencia a largo plazo pudiera estar restringida a distintas poblaciones de CTC que comparten atributos funcionales con sus contrapartes normales (CT), incluida la autorrenovación y la capacidad de dar origen a una progenie diferenciada que forma la masa tumoral.

Los enfoques terapéuticos que se dirigen a la autorrenovación pueden mejorar los resultados a largo plazo, pero se han desarrollado pocos enfoques que se centren en esta propiedad. Como se mencionó anteriormente BMI-1 es uno de los genes blanco de esta vía que se encarga de regular dicho proceso y cabe mencionar que el resultado obtenido refuerza la hipótesis de que la autorrenovación tiene un impacto en la supervivencia de los pacientes, ya que como se mostró el porcentaje a largo plazo disminuye hasta en un 50 % lo que si bien no es un dato que posea un peso estadístico atribuyendo lo anterior a la n manejada en este proyecto, nos da la pauta a extender los estudios sobre este gen y algunos otros genes blanco de esta vía como lo es SOX 2 y NANOG que están involucrados en el proceso de autorrenovación, para así sustentar de mejor forma la participación de este proceso y la activación de esta vía con miras a identificar a través de éstos a los pacientes que después de la fase de inducción a la remisión, se les proporcionen inhibidores para la activación de esta vía con el fin de mejorar la supervivencia y el éxito terapéutico de los mismos.

CONCLUSIONES

La vía de SHH se encuentra activa en el 100% de los casos con la detección de los genes blanco GLI-1 y BMI-1 en un 96.15%, así como sus factores de transcripción GLI-2 y GLI-3 en un 100%.

Se alcanza una supervivencia global del grupo analizado de 84.6% a los 82 meses de seguimiento.

Existe una tendencia entre la clasificación de alto riesgo y la detección alta del gen blanco BMI-1 en la supervivencia global del grupo de estudio con un valor de 65% a 82 meses.

Existe una tendencia entre falla a IR y la detección alta del gen blanco BMI-1 en la supervivencia global en el grupo de estudio con un valor de 0% a 6 meses.

Existe una tendencia entre los altos niveles de GLI-3 y BMI-1 que identifican a los pacientes que fallecen dentro del primer año y medio de evolución.

El nivel alto de detección del componente GLI-3 y el gen blanco BMI-1 manifiestan un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes después de 18 meses de seguimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Cumano and I. Godin, “Ontogeny of the Hematopoietic System,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 745–785, Mar. 2007.
- [2] A. Medvinsky, S. Rybtsov, and S. Taoudi, “Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions,” *Development*, vol. 138, no. 6, p. 1017 LP-1031, Mar. 2011.
- [3] M. Tavian and B. Peault, “Embryonic development of the human hematopoietic system,” *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 49, no. 2–3, pp. 243–250, 2005.
- [4] N. B. Ivanova, J. T. Dimos, C. Schaniel, J. a Hackney, K. a Moore, and I. R. Lemischka, “A stem cell molecular signature.,” *Science*, vol. 298, no. 5593, pp. 601–604, 2002.
- [5] S. Divisions, J. M. Bernitz, H. S. Kim, B. Macarthur, H. Sieburg, J. M. Bernitz, H. S. Kim, B. Macarthur, H. Sieburg, and K. Moore, “Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Article Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions,” *Cell*, pp. 1–14, 2016.
- [6] P. E. Boulais and P. S. Frenette, “Making sense of hematopoietic stem cell niches,” *Blood*, vol. 125, no. 17, p. 2621 LP-2629, Apr. 2015.
- [7] E. Passegué, C. H. M. Jamieson, L. E. Ailles, and I. L. Weissman, “Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100 Suppl, pp. 11842–9, 2003.
- [8] N. Panoskaltsis, A. Mantalaris, and J. H. D. Wu, “Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo.,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 1, pp. 28–35, 2005.
- [9] J. Barquinero, “Células madre hematopoyéticas,” pp. 59–81.
- [10] T. Suda, F. Arai, and A. Hirao, “Hematopoietic stem cells and their niche,” *Trends in Immunology*, vol. 26, no. 8. pp. 426–433, 2005.

- [11] R. Tamma and D. Ribatti, “Bone Niches , Hematopoietic Stem Cells , and Vessel Formation,” 2017.
- [12] J. Seita and I. L. Weissman, “Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, vol. 2, no. 6. pp. 640–653, 2010.
- [13] C. M. Reina, A. R. Lara, and S. R. Clavijo, “Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación,” *Rev. Ciencias la Salud*, vol. 5, no. 1, pp. 67–89, 2007.
- [14] D. R. Bell and G. Van Zant, “Stem cells, aging, and cancer: inevitabilities and outcomes.,” *Oncogene*, vol. 23, no. 43, pp. 7290–6, 2004.
- [15] J. J. Trowbridge, M. P. Scott, and M. Bhatia, “Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 38, pp. 14134–14139, 2006.
- [16] A. Ruiz, “Hedgehog Signaling and the Gli Code in Stem Cells , Cancer , and Metastases,” vol. 4, no. 200, pp. 1–11, 2011.
- [17] D. Carpenter, D. M. Stone, J. Brush, A. Ryan, M. Armanini, G. Frantz, A. Rosenthal, and F. J. de Sauvage, “Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 23, pp. 13630–4, 1998.
- [18] V. Marigo and C. J. Tabin, “Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, pp. 9346–9351, 1996.
- [19] F. Rahnama, R. Toftgård, and P. G. Zaphiropoulos, “Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling.,” *Biochem. J.*, vol. 378, no. Pt 2, pp. 325–334, 2004.
- [20] C. Torroja, N. Gorfinkiel, and I. Guerrero, “Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction.,” *Development*, vol. 131, pp. 2395–2408,

2004.

- [21] A. Gallet and P. P. Therond, “Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment,” *Dev. Biol.*, vol. 277, no. 1, pp. 51–62, 2005.
- [22] A. Callejo, J. Culi, and I. Guerrero, “Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 3, pp. 912–7, 2008.
- [23] B. L. Allen, T. Tenzen, and A. P. McMahon, “The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development,” *Genes Dev.*, vol. 21, no. 10, pp. 1244–1257, 2007.
- [24] W. Zhang, J. S. Kang, F. Cole, M. J. Yi, and R. S. Krauss, “Cdo Functions at Multiple Points in the Sonic Hedgehog Pathway, and Cdo-Deficient Mice Accurately Model Human Holoprosencephaly,” *Dev. Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 657–665, 2006.
- [25] W. Zhang, Y. Zhao, C. Tong, G. Wang, B. Wang, J. Jia, and J. Jiang, “Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of cubitus interruptus,” *Dev. Cell*, vol. 8, no. 2, pp. 267–278, 2005.
- [26] A. Ruiz i Altaba, C. Mas, and B. Stecca, “The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer,” *Trends in Cell Biology*, vol. 17, no. 9, pp. 438–447, 2007.
- [27] B. Stecca and A. Ruiz I Altaba, “Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals,” *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 84–95, 2010.
- [28] S. Pandolfi and B. Stecca, “Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy,” *Expert Rev. Mol. Med.*, vol. 17, no. February, p. e5, 2015.
- [29] D. L. Longo, S. P. Hunger, and C. G. Mullighan, “Acute Lymphoblastic Leukemia in Children,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 16, pp. 1541–1552, 2015.

- [30] Á. Lassaletta Atienza, “Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda,” *Pediatría Integral*, vol. 12, no. 6, pp. 551–558, 2008.
- [31] J. M. Bennett, D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, and C. Sultan, “Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group,” *Br J Haematol*, vol. 33, no. 4, pp. 451–458, 1976.
- [32] T. Miyazaki, K. Nishikawa, Y. Noma, N. Tsukaguchi, K. Nakagawa, Y. Kobayashi, and T. Kohsaka, “[CD45 gating for flow cytometric analysis of acute leukemia],” *Rinsho Ketsueki. Japanese J. Clin. Hematol.*, vol. 37, no. 3, pp. 214–220, 1996.
- [33] A. Lassaletta Atienza, “Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda,” *Pediatr. Integr.*, vol. 20, no. 6, pp. 380–389, 2016.
- [34] J. Sims-Mourtada, J. G. Izzo, J. Ajani, and K. S. C. Chao, “Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport.,” *Oncogene*, vol. 26, no. 38, pp. 5674–5679, 2007.
- [35] C. H. Pui and W. E. Evans, “A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia,” *Semin. Hematol.*, vol. 50, no. 3, pp. 185–196, 2013.
- [36] C. O. Ramos-Peñañiel, A. Martínez-Tovar, I. Olarte-Carrillo, H. Castellanos-Sinco, C. Martínez-Murillo, G. León-González, and E. Rozen-Fuller, “Experiencia del tratamiento de la leucemia linfocítica aguda en recaída en el Hospital General de México,” *Rev. Médica del Hosp. Gen. México*, vol. 73, no. 4, pp. 263–267, 2010.
- [37] T. L. Lin, Q. H. Wang, P. Brown, C. Peacock, A. A. Merchant, S. Brennan, E. Jones, K. McGovern, D. Neil Watkins, K. M. Sakamoto, and W. Matsui, “Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926,” *PLoS One*, vol. 5, no. 12, pp. 10–14, 2010.
- [38] G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, K. Lapinska, M. Longacre, N. Snyder, and S. Sarkar, “Drug Resistance in Cancer: An Overview,” *Cancers (Basel)*, vol. 6, no. 3, pp. 1769–1792, Sep. 2014.
- [39] L. N. Abdullah and E. K.-H. Chow, “Mechanisms of chemoresistance in cancer stem

cells.,” *Clin. Transl. Med.*, vol. 2, no. 1, p. 3, 2013.

- [40] D. R. Pattabiraman and R. A. Weinberg, “Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 7, pp. 497–512, 2014.
- [41] M. L. W. Viktor Martyanov, “HHS Public Access,” *Curr Opin Rheumatol*, vol. 28, no. 1, pp. 83–88, 2016.
- [42] I. Slade, A. Murray, S. Hanks, A. Kumar, L. Walker, D. Hargrave, J. Douglas, C. Stiller, L. Izatt, and N. Rahman, “Heterogeneity of familial medulloblastoma and contribution of germline PTCH1 and SUFU mutations to sporadic medulloblastoma,” *Fam. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 337–342, 2011.
- [43] J. Xie, M. Murone, S. M. Luoh, a Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J. M. Bonifas, C. W. Lam, M. Hynes, a Goddard, a Rosenthal, E. H. Epstein, and F. J. de Sauvage, “Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma.,” *Nature*, vol. 391, no. January, pp. 90–92, 1998.
- [44] D. M. Berman, S. S. Karhadkar, A. R. Hallahan, J. I. Pritchard, C. G. Eberhart, D. N. Watkins, J. K. Chen, M. K. Cooper, J. Taipale, J. M. Olson, and P. A. Beachy, “Medulloblastoma Growth Inhibition by Hedgehog Pathway Blockade,” *Science (80-.)*, vol. 297, no. 5586, pp. 1559–1561, 2002.
- [45] S. P. Thayer, M. P. di Magliano, P. W. Heiser, C. M. Nielsen, D. J. Roberts, G. Y. Lauwers, Y. P. Qi, S. Gysin, C. Fernández-del Castillo, V. Yajnik, B. Antoniu, M. McMahon, A. L. Warshaw, and M. Hebrok, “Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis.,” *Nature*, vol. 425, no. 6960, pp. 851–6, 2003.
- [46] G. Bhardwaj, B. Murdoch, D. Wu, D. P. Baker, K. P. Williams, K. Chadwick, L. E. Ling, F. N. Karanu, and M. Bhatia, “Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation.,” *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 2, pp. 172–180, 2001.
- [47] M. H. Saied, J. Marzec, S. Khalid, P. Smith, T. A. Down, V. K. Rakyan, G. Molloy, M. Raghavan, S. Debernardi, and B. D. Young, “Genome wide analysis of acute

myeloid leukemia reveal leukemia specific methylome and subtype specific hypomethylation of repeats.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33213, Jan. 2012.

- [48] L. P. Gondek, Y. Lim, H. Makishima, Q. Wang, J. P. Maciejewski, P. D. Aplan, A. E. DeZern, and W. Matsui, “Aberrant Hedgehog Pathway Activity Marks Clinical MDS Progression and Accelerates Leukemic Transformation in Vivo,” *Blood*, vol. 124, no. 21, p. 528 LP-528, Dec. 2014.
- [49] S. Gupta, N. Takebe, and P. Lorusso, “Targeting the Hedgehog pathway in cancer,” *Ther Adv Med Oncol*, vol. 2, no. 4, pp. 237–250, 2010.
- [50] C. Zhao, A. Chen, C. H. Jamieson, M. Fereshteh, A. Abrahamsson, J. Blum, H. Y. Kwon, J. Kim, J. P. Chute, D. Rizzieri, M. Munchhof, T. VanArsdale, P. A. Beachy, and T. Reya, “Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia,” *Nature*, vol. 460, no. 7255, pp. 652–652, 2009.
- [51] S. Aditya and A. Rattan, “Vismodegib: A smoothed inhibitor for the treatment of advanced basal cell carcinoma,” *Indian Dermatol. Online J.*, vol. 4, no. 4, p. 365, 2013.
- [52] V. Y. Chang, G. Basso, K. M. Sakamoto, and S. F. Nelson, “Identification of somatic and germline mutations using whole exome sequencing of congenital acute lymphoblastic leukemia,” *BMC Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 55, 2013.
- [53] L. L. Rubin and F. J. de Sauvage, “Targeting the Hedgehog pathway in cancer.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 12, pp. 1026–33, 2006.
- [54] F. Aberger and A. Ruiz i Altaba, “Context-dependent signal integration by the GLI code: The oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 33, pp. 93–104, 2014.
- [55] S. Vonlanthen, J. Heighway, H. J. Altermatt, M. Gugger, A. Kappeler, M. M. Borner, M. van Lohuizen, and D. C. Betticher, “The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression,” *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 10, pp. 1372–1376, May 2001.
- [56] F. Zhang, L. Sui, and T. Xin, “Correlations of Bmi-1 expression and telomerase

activity in ovarian cancer tissues,” *Exp. Oncol.*, vol. 30, no. 1, pp. 70–74, 2008.

- [57] J. Silva, V. García, J. M. García, C. Peña, G. Domínguez, R. Díaz, Y. Lorenzo, A. Hurtado, A. Sánchez, and F. Bonilla, “Circulating Bmi-1 mRNA as a possible prognostic factor for advanced breast cancer patients,” *Breast Cancer Res.*, vol. 9, no. 4, pp. R55–R55, Aug. 2007.